



УДК 577.151.042 : 577.325.3 : 577.152.321+541 (64+183.12)

ДВУХСТАДИЙНЫЙ МЕХАНИЗМ ИНГИБИРОВАНИЯ
β-ГАЛАКТОЗИДАЗЫ *E. COLI* ПОЛИКАТИОНАМИ

Цыганков А. Ю., Орловский А. Ф., Гладилли К. Л.

Институт биохимии им. А. Н. Баха Академии наук СССР, Москва

Установлено, что комплексообразование β-галактозидазы *E. coli* с поликатионами сопровождается двухстадийным ингибированием. Первая стадия связана с конформационными перестройками фермента и изменением рН-зависимости активности, вторая — с постепенными дальнейшими конформационными изменениями, приводящими к полной инактивации. Показано, что эффект поликатионов зависит от степени полимерности, плотности заряда и химической природы ионогенных групп.

Исследование взаимодействия ферментов с полиэлектролитами вызвано необходимостью получения характеристик влияния на них заряженной матрицы при иммобилизации [1, 2], а также моделирования их физиологического окружения [3–5]. В ряде работ было показано, что полиэлектролиты могут значительно модифицировать такие кинетические характеристики ферментативных реакций, как каталитическая константа (k_{cat}), наблюдаемая константа Михаэлиса (K_m) и константа ингибирования (K_i) [1–9]. Эти эффекты связаны со сдвигом рН-зависимости активности фермента и изменением локальной концентрации субстратов и эффекторов при взаимодействии с заряженной матрицей [1–4, 9], стерическим блокированием фермента в результате образования им комплекса с полиэлектролитом [6], предотвращением диссоциации субъединиц и рядом других факторов [7]. Однако механизм влияния полиэлектролитов на кинетические свойства ферментов все еще недостаточно изучен. Так, до настоящего времени остается невыясненным вопрос о конформационных изменениях молекул ферментов при образовании фермент-полиэлектролитного комплекса и роли этих изменений в модификации кинетических характеристик. Задачей данной работы являлось исследование механизма влияния комплексообразования β-галактозидазы (КФ 3.2.1.23) с полиэлектролитами на кинетику ферментативного гидролиза *o*-нитрофенил-β-*D*-галактопиранозида (далее Np-галактозид).

Ранее нами было показано, что гистон существенно ингибирует β-галактозидазу, причем зависимость активности фермента от концентрации гистона имеет вид кривой с насыщением [9]. Аналогичные зависимости, полученные при изучении действия протамина и разветвленного полиэтиленimina со средней степенью полимерности (\bar{n}), равной 1630, на β-галактозидазу, также демонстрируют наличие насыщения (рис. 1). Исходя из полученных данных, большую часть экспериментов по влиянию полиэлектролитов на фермент проводили при достаточной для насыщения концентрации.

Значения k_{cat} и K_m для гидролиза Np-галактозида в присутствии различных эффекторов (табл. 1) свидетельствуют о том, что влияние на активность оказывают только поликатионы; полианионы и незаряженные полимеры не изменяют величины k_{cat} и K_m . Это, по всей вероятности, связано с тем, что взаимодействие между полиэлектролитами и β-галактозидазой является электростатическим, а при физиологических значениях рН фермент в целом заряжен отрицательно; в его аминокислотном составе преобладают дикарбоновые аминокислоты [10], что обуславливает pI 4,6

Сокращения: ПАК — полиакриловая кислота, ПЭГ — полиэтиленгликоль, ПЭИ — полиэтиленимин.

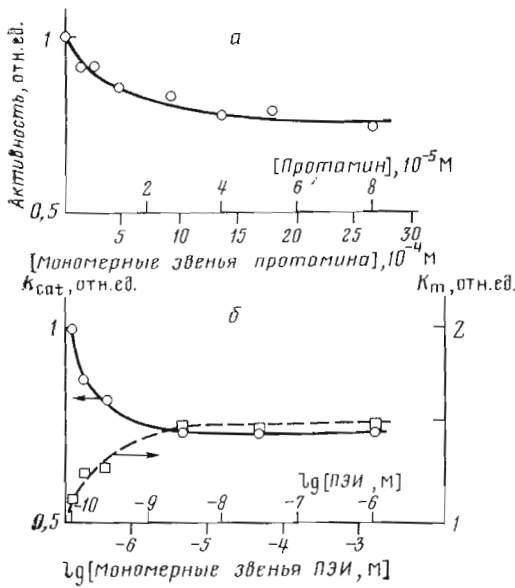


Рис. 1

Рис. 1. Ингибирование β -галактозидазы протамином (а), полиэтилениминном разветвленным ($\bar{n}=1630$) (б). $[S]_0=1,5$ мМ

Рис. 2. Влияние NaCl на активность β -галактозидазы в свободной форме (1) и в присутствии 1 мМ суммарного гистона (2). $[S]_0=2,5$ мМ

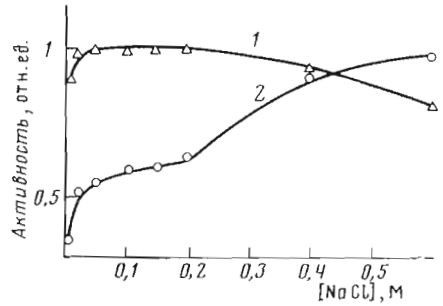


Рис. 2

[11]. Большое влияние на способность ингибировать β -галактозидазу оказывает молекулярная масса эффектора. Зависимость ингибирования от молекулярной массы прослеживается в ряду полиэтилениминов, а также при сравнении эффекта полипептидов, сходных по составу, но различающихся по степени полимерности. Ни один из аналогов мономерных звеньев использованных поликатионов (лизин, аргинин, бензоиларгининамид, диметиленэтилендиамин) не оказывает существенного влияния на активность фермента. Это может объясняться изменением числа точек связывания в комплексе: эффекторы, имеющие размеры молекул, сравнимые с размерами фермента, могут взаимодействовать со значительной долей поверхности его глобулы, в то время как небольшие — только локально. Изменением числа точек связывания может объясняться и тот факт, что линейные полиэтиленимины понижают активность β -галактозидазы значительно сильнее, чем разветвленные той же молекулярной массы.

На степень ингибирования влияет также характер ионогенных групп полимера: поликатионы, несущие гуанидиновые группы и первичные аминогруппы, пространственно удаленные от главной цепи (полилизин, полиаргинин, протамин, гистон), ингибируют β -галактозидазу сильнее, чем полиэтиленимины той же степени полимерности, несущие вторичные и третичные аминогруппы в главной цепи, несмотря на меньшую плотность заряда. Ионен, заряд которого обусловлен четвертичными аммониевыми группами в главной цепи, не влияет на фермент. Возможно, это связано с необходимостью наличия у положительного заряда «ножки», которая позволяет ему в достаточной степени приблизиться к группам, контролирующим активность β -галактозидазы.

Исследование зависимости активности от времени в присутствии некоторых поликатионов выявило вторую стадию ингибирования β -галактозидазы: активность в этом случае зависит от времени предынкубации с поликатионом. Реакция инактивации при этом имеет первый порядок по ферменту. Наблюдается ускорение инактивации в присутствии поликатионов с высокой плотностью заряда, содержащих первичные аминогруппы и гуанидиновые группы, пространственно удаленные от главной цепи полимера (табл. 2). При сравнении действия на фермент поликатионов разной молекулярной массы и их мономерных аналогов видно также, что скорость инактивации зависит от степени полимерности эффектора.

Две стадии ингибирования β -галактозидазы различаются также по возможности обращения эффекта повышения концентрации NaCl, которое может приводить к разрушению комплекса фермент — полиэлектролит. Та-

Влияние полимеров и их мономерных аналогов на кинетические характеристики гидролиза Np-галактозида β-галактозидазой *

Эффектор	K_m , отн. ед.	k_{cat} , отн. ед.	k_{cat}/K_m , отн. ед.
—	1,00 **±0,03	1,00 ***±0,02	1,00±0,05
Лизин	1,04±0,04	1,12±0,07	1,08±0,11
Полилизин, $\bar{n}=16$	1,26±0,03	0,66±0,03	0,52±0,04
$\bar{n}=390$	1,27±0,04	0,52±0,03	0,41±0,04
Аргинин	0,93±0,03	1,03±0,04	1,11±0,08
Бензоиларгининамид	1,10±0,04	1,05±0,04	0,95±0,07
Протамин	1,31±0,02	0,79±0,02	0,60±0,02
Полиаргинин	—	0,0	—
Гистон суммарный	1,22±0,03	0,62±0,02	0,51±0,03
Н1	1,11±0,04	0,93±0,03	0,84±0,06
Н2В	1,68±0,08	0,72±0,05	0,43±0,05
Н2А+Н3+Н4	1,21±0,03	0,47±0,03	0,39±0,04
Диметилэтиленидиамин	0,99±0,04	0,91±0,03	0,92±0,07
ПЭИ линейный, $\bar{n}=120$	1,17±0,03	0,92±0,02	0,79±0,04
$\bar{n}=350$	1,70±0,06	1,00±0,04	0,59±0,04
ПЭИ разветвленный, $\bar{n}=230$	1,15±0,03	0,84±0,04	0,73±0,05
$\bar{n}=930$	1,45±0,04	0,95±0,03	0,66±0,04
$\bar{n}=1630$	1,62±0,07	0,79±0,02	0,49±0,03
Ионен	0,98±0,02	1,00±0,02	1,02±0,04
Полицитриловая кислота	0,91±0,03	0,95±0,02	1,04±0,06
Полифосфат	0,89±0,06	0,94±0,02	1,06±0,10
Полиглутаминовая кислота	0,98±0,02	0,96±0,03	0,98±0,05
Гуммиарабик	1,03±0,03	1,01±0,02	0,98±0,05
ПАК	1,05±0,05	1,06±0,06	1,01±0,07
Декстран	1,13±0,08	1,01±0,02	0,89±0,08
ПЭГ	1,07±0,04	1,02±0,02	0,95±0,05

* Концентрация всех веществ — 2 мМ (по остаткам; здесь и далее концентрацию полимеров выражали числом молей их мономерных звеньев на 1 л раствора).

** 1,00=0,11 мМ.

*** 1,00=1000 с⁻¹.

кое явление наблюдается только для стадии быстрого ингибирования (рис. 2, табл. 3). Восстановления активности фермента после предынкубации с полиаргинином и протамином при повышении ионной силы не происходит. Постепенная инактивация фермента при концентрации NaCl 0,5 М только замедляется, что говорит о высокой прочности комплекса β-галактозидазы — аргининбогатый поликатион.

Разрушение полиэлектролитного комплекса может происходить не только при повышении ионной силы, но и в результате макромолекулярной реакции замещения [12, 13]. Внесение в систему β-галактозидазы — протамин избытка полиакриловой кислоты, 12-кратного по ионогенным группам (по отношению к протамину), приводит к некоторому повышению

Таблица 2

Влияние структуры полимерных эффекторов и их мономерных аналогов на скорость инактивации ими β-галактозидазы *

Эффектор	$k_i \cdot 10^3$, мин ⁻¹	Эффектор	$k_i \cdot 10^3$, мин ⁻¹
—	0,1±0,04	ПЭИ ($\bar{n}=1630$)	0,4±0,15
Лизин	0,1±0,05	Гистон суммарный	0,5±0,12
Аргинин	0,7±0,11	Полилизин, $\bar{n}=16$	23±1,5
Бензоиларгининамид	0,5±0,10	$\bar{n}=390$	37±1,9
ПЭГ	0,1±0,05	Протамин	8,8±0,95
ПАК	0,1±0,03	Полиаргинин	3400±300
Гуммиарабик	0,1±0,02		

* Концентрации всех эффекторов, кроме полиаргинина, 2 мМ (по остаткам); [полиаргинин]=1 мМ; [S₀]=1,5 мМ.

Влияние ионной силы на активность β -галактозидазы (отн. ед.) в присутствии полиэлектролитов

Эффектор	Дополнительное внесение NaCl до 0,5 М					
	—		перед добавлением эффектора		перед измерением активности	
	3 мин	6 ч	3 мин	6 ч	3 мин	6 ч
—	1,00±0,02 (510 ед./мг)	1,00±0,03 (479 ед./мг)	1,00±0,02 (454 ед./мг)	1,00±0,02 (393 ед./мг)	1,00±0,02 (464 ед./мг)	1,00±0,02 (418 ед./мг)
ПЭИ ($\bar{n}=1630$)	0,65±0,02	0,59±0,03	0,94±0,03	0,89±0,05	0,95±0,04	0,88±0,04
Протамин	0,82±0,02	0,28±0,02	0,92±0,03	0,40±0,02	0,92±0,04	0,31±0,03
Полиаргинин	0,0	0,0	0,1±0,02	0,0	0,0	0,0

Примечание. $[S]_0=2,5$ мМ. Концентрация эффекторов 2 мМ. Исходная концентрация NaCl 0,1 М. Измерение активности проводили после предыдущей с эффектором в течение 3 мин или 6 ч.

активности и прекращению дальнейшей инактивации. При этом отношение активностей до и немедленно после добавления полиакриловой кислоты ($0,91\pm 0,02$) приблизительно равно отношению активностей β -галактозидазы сразу после внесения протамина и в свободной форме ($0,92\pm 0,02$) (рис. 3). Восстановления активности до исходного уровня не происходит даже при инкубации с полиакриловой кислотой в течение суток, что говорит о необратимом характере медленной инактивации. Некоторое увеличение активности β -галактозидазы непосредственно после внесения полианиона объясняется, по всей вероятности, тем, что молекулы фермента, еще не подвергшиеся необратимой инактивации, вытесняются из комплекса и восстанавливают свои кинетические характеристики.

Приведенные данные позволяют сделать вывод о наличии двух механизмов ингибирования β -галактозидазы поликатионами: быстрого обратимого, связанного с образованием комплекса фермент — поликатион, и медленного необратимого, связанного с инактивацией фермента в составе такого комплекса.

Постоянство K_m для Np-галактозида в ходе медленной инактивации (табл. 4) позволяет сделать вывод, что в этом случае происходит не постепенное изменение свойств всех молекул фермента, а переход все новых и новых молекул в полностью неактивное состояние.

Образование комплекса β -галактозидаза — поликатион сопровождается изменением рН-зависимости активности (рис. 4). Наблюдаемое значение

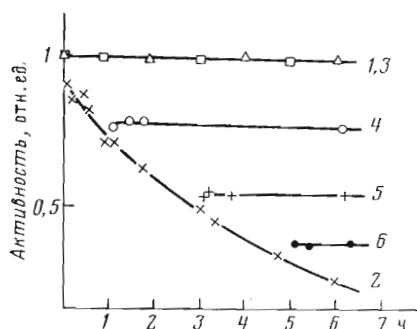


Рис. 3

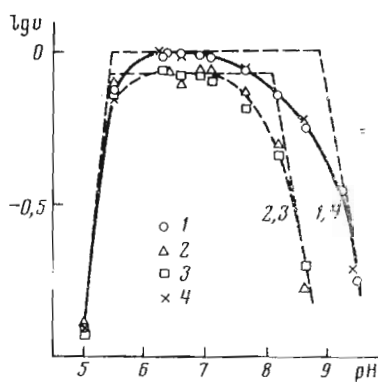


Рис. 4

Рис. 3. Зависимость активности β -галактозидазы от времени в свободной форме (1), в присутствии 0,07 мМ протамина (2) или 0,6 мМ ПЭК (3), а также после добавления ПЭК в систему β -галактозидаза — протамин через 1 (4), 3 (5) и 5 ч (6) инкубации. $[S]_0=1,5$ мМ

Рис. 4. Зависимость логарифма скорости ферментативного гидролиза Np-галактозида (отн. ед.) от рН в отсутствие эффекторов (1) и в присутствии 0,6 мМ протамина (2), 0,0033 мМ полиэтиленимина ($\bar{n}=1630$) (3) или 2 мМ ПЭК (4). $[S]_0=1,5$ мМ

Зависимость кинетических параметров гидролиза
 Нр-галактозида от времени предынкубации β -галактозидазы
 с протамином (1 мМ)

Время предынку- бации, мин	K_m , отн. ед.	k_{cat} , отн. ед.
0	1,00±0,03	1,00±0,02
1	1,26±0,03	0,80±0,02
5	1,35±0,06	0,77±0,02
30	1,29±0,04	0,42±0,03
60	1,28±0,04	0,25±0,03

pK ионогенной группы, контролирующей активность фермента в щелочной области, сдвигается с 8,7 до 8,0. Подобный сдвиг $pK_{свж}$ наблюдался ранее для комплексов фермент—полиэлектролит и ферментов, ковалентно иммобилизованных на полиэлектролитной матрице [1—4, 9].

Сдвигом рН-зависимости, однако, не ограничиваются изменения, происходящие с β -галактозидазой при образовании комплекса с полиэлектролитом. Методом КД зарегистрированы также конформационные перестройки молекулы фермента. Для контроля возможных артефактов, вызываемых появлением светорассеяния в образцах, содержащих комплексы [14—16], по спектрам мутности определяли размер частиц, образующихся при добавлении поликатионов к β -галактозидазе. Оказалось, что их средний диаметр равен 0,03—0,05 мкм. Образование частиц такого размера не влияет на спектры КД компонентов их составляющих [16]. В присутствии полиэтиленimina наблюдался сдвиг отрицательного максимума спектра на 4 нм в ближнюю УФ-область и заметное понижение амплитуды (рис. 5а). В дальнейшем спектр КД фермента в составе комплекса не изменялся, так же как и ферментативная активность. В случае образования комплекса с полиаргинином, который вызывает необратимую инактивацию, спектр испытывает как сдвиг отрицательного максимума приблизительно на 5 нм, так и постепенное уменьшение амплитуды (рис. 5б), которое коррелирует с падением ферментативной активности. Взаимодействие β -галактозидазы с протамином не приводит к заметному смещению спектра, но по мере инактивации происходит понижение амплитуды, как и в случае с полиаргинином (рис. 5в). Отсутствие сдвига отрицательного

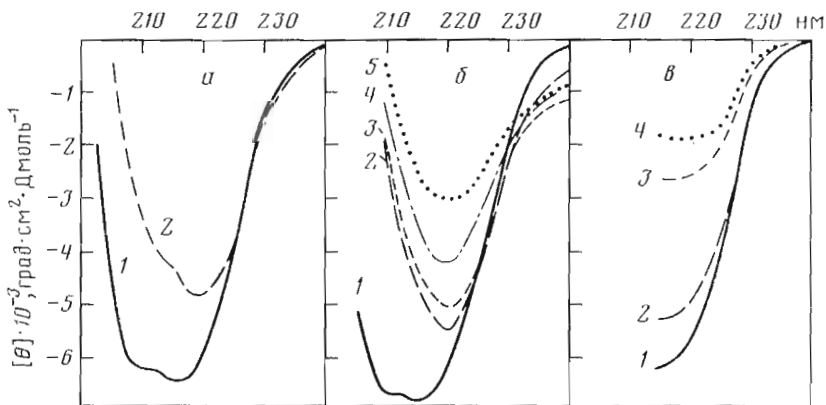


Рис. 5. Влияние поликатионов на спектры КД β -галактозидазы: а — свободный фермент (15 мкг/мл) (1) и фермент в присутствии 0,38 мМ ПЭИ ($\bar{n}=1630$); б — свободный фермент (20 мкг/мл) (1) и фермент, инактивированный под действием 0,25 мМ полиаргинина до остаточной активности 65 (2), 39 (3), 22 (4), 4% (5); в — свободный фермент (20 мкг/мл) (1) и фермент, инактивированный под действием 1,4 мМ протаминна до остаточной активности 80 (2), 43 (3), 33% (4). За 100% остаточной активности принимали активность фермента непосредственно после внесения эфффектора

максимума, по-видимому, может объясняться относительно малым эффектом протамина на стадии обратимого ингибирования.

Одной из вероятных причин ингибирования β -галактозидазы поликатионами могла явиться диссоциация тетрамерного фермента на субъединицы, не обладающие активностью [11]. Однако гель-хроматография комплекса полиэтиленимином— β -галактозидаза не показала наличия пика, соответствующего протомеру. Ультрацентрифугирование β -галактозидазы в присутствии протамина также не показало появления свободного протомера, даже при полной инактивации. Напротив, чрезвычайно быстрое осаждение комплекса позволяет оценить его коэффициент седиментации не менее чем в 150—200S.

На основании всех приведенных данных можно заключить, что ингибирование β -галактозидазы в присутствии поликатионов происходит в две стадии. Первая стадия, быстрого ингибирования, связана с образованием полиэлектролитного комплекса, в котором фермент имеет иную, нежели в свободном состоянии, конформацию и величину рК ионогенных групп, контролирующих активность. Следствием этого является изменение кинетических характеристик фермента. При образовании комплекса возникают надмолекулярные агрегаты, диаметр которых равен 300—500 Å. Такие частицы могут содержать порядка 10—20 молекул β -галактозидазы (если принять ее радиус равным 70 Å [17]), что согласуется с данными ультрацентрифугирования. При разрушении комплекса β -галактозидаза полностью восстанавливает свои свойства.

В ходе второй стадии ингибирования, необратимой инактивации в составе комплексов, образованных β -галактозидазой и поликатионами с высокой плотностью заряда, несущими гуанидиновые группы и первичные аминогруппы, пространственно удаленные от главной цепи полимера, происходят дальнейшие конформационные перестройки, приводящие к полной потере ферментативной активности.

Экспериментальная часть

В работе использовали поли-*L*-лизин со средней степенью полимерности $\bar{n}=16$ и $\bar{n}=390$, поли-*L*-аргинин ($\bar{n}=300$), поли-*L*-глутаминовую кислоту ($\bar{n}=180$) (Sigma, США), полицитидиловую кислоту ($\bar{n}=89$ по энзиматическому анализу концевых групп [18]) (Reanal, ВНР), полифосфат ($\bar{n}=290$), любезно предоставленный М. С. Крицким (Институт биохимии АН СССР, Москва), протамин (Spofa, ЧССР), очищенный переосаждением 0,7 объема этанола (M_r 4,2·10³, $\bar{n}=31$ по аминокислотной последовательности [19]), полиэтиленгликоль ($\bar{n}=450$) (Ferak, Зап. Берлин), декстран ($\bar{n}=430$, Loba-Chemie, Австрия), гуммиарабик (M_r (200—300)·10³, $\bar{n}=1300$ —1950 [20], Merck, ФРГ), суммарный гистон из тимуса теленка и его фракции, выделенные по методу Джонса [21] (M_r ~14 000, $\bar{n}=140$ по первичной структуре [22]), полиакриловую кислоту ($\bar{n}=2500$), 2,5-ионен ($\bar{n}=40$ по числу атомов азота) и полиэтиленимин (разветвленный: $\bar{n}=230$, $\bar{n}=930$ и $\bar{n}=1630$ и линейный: $\bar{n}=120$ и $\bar{n}=350$), любезно предоставленные проф. А. Б. Зезиным и сотрудниками кафедры высокомолекулярных соединений химического факультета МГУ. Использовали также *L*-лизин, *L*-аргинин, N^α -бензоил-*L*-аргининамид (Reanal, ВНР), *o*-нитрофенил- β -*D*-галактопиранозид (Fluka, Швейцария), триэтаноламин (Serva, ФРГ), трис (Sigma, США), сефадексы G-50 Fine, G-200 Superfine, DEAE A-25 и сефарозу 6В (Pharmacia, Швеция), β -меркаптоэтанол (Loba-Chemie, Австрия), казеиновый гидролизат (Ferak, Зап. Берлин). Остальные реактивы отечественного производства квалификации ос. ч. и х. ч.

Выделение β -галактозидазы. Клетки *E. coli* ML 308 выращивали на минимальной среде M 63 [23], содержащей 0,4% глицерина и 0,05% казеинового гидролизата, в ферментере Electrolux (Швеция). Биомассу сепарировали в ранней стационарной фазе и замораживали.

Для одного выделения брали приблизительно 15—25 г сырой массы клеток; добавляли 2 объема 0,2 М трис-HCl-буфера (рН 7,6 при 4° С), со-

державшего 0,2 М NaCl, 0,01 М MgSO₄, 5% глицерин и 0,01 М β-меркаптоэтанол; гомогенизировали и разрушали с помощью френч-пресса. Все дальнейшие операции проводили при 4° С. Грубый экстракт центрифугировали 30 мин при 5000g, к супернатанту добавляли сульфат аммония до 40% насыщения, через 2–3 ч осадок отделяли центрифугированием (30 мин, 20 000g), растворяли в 0,01 М трис-HCl-буфере (рН 7,4 при 4° С), содержащем 0,01 М MgSO₄ и 0,01 М β-меркаптоэтанол (буфер А), наносили на колонку (2,6×100 см) с сефарозой 6В и элюировали тем же буфером со скоростью 25 мл/ч. Фракции (5 мл) с максимальной удельной активностью объединяли, концентрировали ультрафильтрацией через мембранный фильтр XM-100 А (Amicon, США) до концентрации белка ~2 мг/мл и наносили на колонку (1,6×35 см) с DEAE-сефадексом А-25, уравновешенным буфером А. Элюировали фермент раствором NaCl в буфере А (линейный градиент 0→0,4 М, общий объем 500 мл) со скоростью 30 мл/ч. Фракции (5 мл) с максимальной удельной активностью объединяли и хранили в 50% глицерине при –20° С. Выход составлял 20–25% по активности. Удельная активность фермента равнялась приблизительно 500 ед./мг белка. Концентрацию белка в ходе выделения определяли по методу Варбурга и Кристиана [24], а на последней стадии — по $E_{0,1\%}^{280} = 2,09$ [25]. Выделенные препараты были гомогенны по электрофорезу в системе Лэммли [26] (5% ПААГ). Молекулярную массу тетрамерного фермента принимали равной $465 \cdot 10^3$ [10].

Активность β-галактозидазы определяли по гидролизу Np-галактозида при 37° С в 0,01 М триэтаноламиновом буфере (рН 7,4), содержащем 0,1 М NaCl и 1 мМ MgSO₄ (буфер В). Концентрация субстрата ([S]₀) и эффекторов указана в подписях к иллюстрациям.

При исследовании рН-зависимости измерения проводили при 37° С, используя в области рН от 5 до 6,3 0,03 М натрий-ацетатный буфер, а при рН от 6,3 до 9,5 — 0,03 М триэтаноламиновый. Оба буфера содержали 0,1 М NaCl. Концентрация MgSO₄ была 1 мМ при рН > 6 и 10 мМ при рН < 6, чтобы предотвратить вытеснение Mg²⁺ из активного центра протона [27]. Концентрация фермента в пробах составляла 0,08 мкг/мл ($1,7 \cdot 10^{-10}$ М). Время предынкубации фермента с эффектором перед внесением субстрата, если не оговорено особо, составляло 1 мин.

При выделении β-галактозидазы активность определяли при 28° С в 0,1 М натрий-фосфатном буфере (рН 7,0), содержащем 1 мМ MgSO₄, 0,05 М β-меркаптоэтанол и 2,3 мМ Np-галактозид. Реакцию останавливали добавлением раствора Na₂CO₃ до концентрации 0,4 М.

Скорость реакции определяли по нарастанию поглощения *o*-нитрофенола: при 373 нм (изобестическая точка) для исследования рН-зависимостей и при 420 нм в остальных случаях. Оптическую плотность измеряли на спектрофотометрах Hitachi-356 и Ultrospec (ЛКВ, Швеция).

За единицу активности фермента принимали его количество, которое приводит к освобождению 1 мкмоль *o*-нитрофенола в 1 мин.

Определение K_m и k_{cat} проводили, линеаризуя зависимости начальной скорости реакции от концентрации Np-галактозида в координатах ($1/[S]$; $1/v$), ($[S]$; $[S]/v$), ($v/[S]$; v) и находя среднее значение K_m и V_{max} . Значение k_{cat} находили как отношение V_{max} к молярной концентрации протонера (M_r 116,3·10³ [10]). Концентрацию Np-галактозида изменяли в пределах от 0,05 до 1,0 мМ.

Определение $pK_{нак}$ групп, контролирующих ферментативную активность, проводили по пересечению касательных к графику зависимости логарифма активности от рН [28].

Определение k_i проводили по графику $\ln(A/A_0) = -kt$ (A_0 — активность в точке $t=0$, A — активность в момент t), варьируя время предынкубации фермента с эффектором. Инактивацию полиаргинином измеряли непосредственно в ходе определения активности.

Статистическая обработка кинетических данных. Приведенные значения K_m , k_{cat} и k_i представляют среднее не менее чем трех независимых результатов. Полуширину доверительного интервала определяли методом малых выборок [29] для доверительной вероятности 95%.

Спектры КД снимали на дихрографе Jasco-40AS в 1 мМ натрий-фосфатном буфере (рН 7,4), содержащем 0,1 М NaCl и 1 мМ MgSO₄, в 5-мм кюветках при 20° С. Перед измерением β-галактозидазу переводили из 50% глицеринового раствора в используемый буфер пропусканием через колонку с сефадексом G-50 Fine. Концентрацию фермента определяли по $E_{0,1\%}^{280}$, среднюю молекулярную массу остатка принимали равной 114 [10].

Спектры поглощения и мутности снимали на спектрофотометрах Hitachi-356 и Hitachi-EPS 3T при 20° С. Мутность находили по разности поглощения комплекса и его компонентов. Размер частиц и долю дисперсной фазы определяли по [30], принимая показатель преломления частиц комплекса равным показателю преломления агрегатов полиглутаминовой кислоты [16].

Гель-хроматография комплекса β-галактозидаза — полиэтиленимин. Вводили радиоактивную метку в молекулу β-галактозидазы, инкубируя фермент с 0,5 мМ иод[¹²⁵С]ацетамидом (СЕА, Франция; удельная активность 28 мКи/ммоль) в 50 мМ натрий-фосфатном буфере (рН 7,4), содержащем 1 мМ MgSO₄. Ферментативная активность в ходе мечения не уменьшалась. Пробу, содержащую 60 мкг/мл фермента и 1 мМ полиэтиленимин разветвленный ($\bar{n}=1630$) в буфере В, наносили на колонку (0,5×15 см) с сефадексом G-200 Superfine и элюировали буфером В, содержащим ту же концентрацию полиэтиленимина, со скоростью 0,6 мл/ч. Радиоактивность фракций (0,1 мл) определяли на счетчике Intertechnique SL-4000 (Франция).

Аналитическое ультрацентрифугирование проводили в буфере В, содержащем 0,25 мг/мл протамина, при концентрации фермента 0,03 мг/мл на ультрацентрифуге Spinco E (Beckman, США) с абсорбционной оптикой. Скорость вращения ротора 44 000–60 000 об./мин, температура 20° С. Перед экспериментом β-галактозидазу переводили в используемый буфер хроматографией на колонке с сефадексом G-50 Fine.

Авторы считают своим долгом выразить глубокую благодарность канд. биол. наук Т. Е. Павловской (Институт биохимии им. А. Н. Баха АН СССР) за постоянное внимание и обсуждение работы, проф. А. Б. Зезину и сотрудникам кафедры высокомолекулярных соединений химического факультета МГУ за предоставленные препараты, а также П. В. Калмыкову (Межфакультетская научно-исследовательская лаборатория им. А. Н. Белозерского, МГУ) за ценную помощь в экспериментах по ультрацентрифугированию.

ЛИТЕРАТУРА

1. Katchalski E., Silman I., Goldman R. *Advances Enzymol. and Relat. Areas Mol. Biol.*, 1971, v. 34, p. 445–536.
2. Имобилизованные ферменты/Ред. Березин И. В., Антонов В. К., Мартинек К. М.: Изд-во МГУ, 1976, т. 2, с. 58–71.
3. Стрельцова З. А., Браудо Е. Е., Толстогузов В. Б. *Биоорганическая химия*, 1975, т. 1, № 2, с. 267–272.
4. Margolin A. L., Izumrudov V. A., Svedas V. K., Zezin A. B., Kabanov V. A., Berezin I. V. *Biochim. et biophys. acta*, 1981, v. 660, № 2, p. 359–365.
5. Марголин А. Л., Шерстюк С. Ф., Изумрудов В. А., Шведас В.-Ю. К., Зезин А. Б., Кабанов В. А. *Докл. АН СССР*, 1983, т. 272, № 1, с. 230–233.
6. Марголин А. Л., Изумрудов В. А., Шерстюк С. Ф., Зезин А. Б., Шведас В. К. *Молекулярная биология*, 1983, т. 17, № 5, с. 1001–1008.
7. Elbein A. D. *Advances Enzymol. and Relat. Areas Mol. Biol.*, 1974, v. 40, p. 29–64.
8. Liebel M. A., White A. A. *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, 1982, v. 104, № 3, p. 957–964.
9. Цыганков А. Ю., Гладилун К. Л. *Докл. АН СССР*, 1983, т. 268, № 4, с. 1003–1006.
10. Fowler A. V., Zabin I. *J. Biol. Chem.*, 1978, v. 253, № 15, p. 5521–5525.
11. Wallenfels K., Weil R. In: *The Enzymes*/Ed. Boyer P. D., 3rd ed. N. Y.—L.: Acad. Press, 1972, v. 7, p. 617–663.
12. Kabanov V. A., Zezin A. B., Mustafaev M. I., Kasaikin V. A. In: *Polymeric amines and ammonium salts*/Ed. Goethals E. J. N. Y.: Pergamon Press, 1980, p. 173–182.
13. Панисов И. М., Некрасова Н. А., Паутов В. Д., Кабанов В. А. *Докл. АН СССР*, 1974, т. 214, № 4, с. 861–864.
14. Adler A. J., Greenfield N. J., Fasman C. D. *Methods Enzymol.*, 1973, v. 27, p. 675–735.
15. Ji T. H., Urry D. W. *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, 1969, v. 34, № 4, p. 404–411.

16. Gordon D. J. *Biochemistry*, 1972, v. 11, № 3, p. 413–420.
17. Бреслер С. Е. Введение в молекулярную биологию. Л.: Наука, 1966, с. 119.
18. Симен Э. В кн.: Методы исследования нуклеиновых кислот. М.: Мир, 1970, с. 97–98.
19. Ando T., Yamasaki M., Suzuki K. Protamines, isolation, characterisation, structure and function. Heidelberg: Springer, 1973, p. 72.
20. Лургенсонс Б. Природные органические макромолекулы. М.: Мир, 1965, с. 199.
21. Johns E. W. *Biochem. J.*, 1964, v. 92, № 1, p. 55–59.
22. Van Holt C., Stricland W. N., Brand W. F., Stricland M. S. *FEBS Lett.*, 1979, v. 100, № 2, p. 201–218.
23. Cohen G. N., Rickenberg H. V. *Ann. Inst. Pasteur*, 1956, t. 91, № 5, p. 693–720.
24. Warburg O., Cristian W. *Biochem. Z.*, 1941, B. 310, № 6, S. 384–421.
25. Craven C. R., Steers E., Jr., Anfinsen C. B. *J. Biol. Chem.*, 1965, v. 240, № 6, p. 2468–2477.
26. Laemmli U. K. *Nature*, 1970, v. 227, № 3, p. 680–685.
27. Tenu J.-P., Viratelle O. M., Garnier G., Yon J. *Eur. J. Biochem.*, 1971, v. 20, № 3, p. 363–370.
28. Диксон М., Уэбб Э. Ферменты. Т. 1. М.: Мир, 1982, с. 199–234.
29. Румицкий Л. З. Математическая обработка результатов эксперимента. Справочное руководство. М.: Наука, 1971, 122 с.
30. Практикум по коллоидной химии/Ред. Воюцкий С. С., Панич Р. М. М.: Химия, 1974, с. 33–43.

Поступила в редакцию
21.VI.1984
После доработки
12.XI.1984

TWO-STAGE MECHANISM OF INHIBITION OF *E. COLI* β -GALACTOSIDASE BY POLYCATIONS

TSYGANKOV A. Yu., ORLOVSKY A. F., GLADILIN K. L.

*A. N. Bach Institute of Biochemistry, Academy of Sciences
of the USSR, Moscow*

Formation of the *E. coli* β -galactosidase complex with polycations was found to be followed by a two-stage inhibition. The first stage is connected with conformational transitions and variation of pH-dependence of the activity, whereas in course of the second stage gradual conformational changes occur resulting in the complete inactivation. Effect of polycations was shown to depend on the degree of polymerisation, charge density, and chemical nature of the ionogenic groups.