



На правах рукописи

Дыбовская Юлия Николаевна

**ПРИМЕНЕНИЕ РАСЧЕТОВ ЭЛЕКТРОСТАТИЧЕСКОГО ПОЛЯ
БЕЛКОВ ДЛЯ АНАЛИЗА ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ
ПОЛИЭЛЕКТРОЛИТОВ С БЕЛКАМИ**

03.00.02 – биофизика

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата физико-математических наук

14 МАР 2009

Пушино 2009 г.

Работа выполнена в лаборатории кристаллофизики и рентгеноструктурных исследований Учреждения Российской академии наук Института теоретической и экспериментальной биофизики РАН

Научные руководители: кандидат физико-математических наук
Сивожезов Виктор Семенович,

доктор биологических наук
Сабурова Екатерина Андреевна

Официальные оппоненты: доктор физико-математических наук, профессор
Хечинашвили Николай Николаевич,

доктор физико-математических наук, профессор
Акатов Владимир Семенович

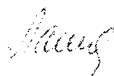
Ведущая организация: Институт биохимии им. А. Н. Баха РАН

Защита диссертации состоится «27» мая 2009 г. в 15-30 на заседании совета Д 002.093.01 по защите докторских и кандидатских диссертаций при Учреждении Российской академии наук Института теоретической и экспериментальной биофизики РАН по адресу: 142290, г. Пушкино Московской обл., ул. Институтская, 3, ИТЭБ РАН.

С диссертацией можно ознакомиться в Центральной библиотеке ИЦБИ РАН
г. Пушкино

Автореферат разослан « 27 » апреля 2009 г.

Ученый секретарь
кандидат физико-математических наук



Ланина Н. Ф.

Актуальность проблемы.

В связи с успехами белковой инженерии, математическое моделирование взаимодействий белков с различными лигандами, низкомолекулярными или полимерными цепями представляется особенно важным как для понимания регуляции биологических процессов, связанных с образованием макромолекулярных комплексов, так и для создания белковых ансамблей с заранее заданными свойствами.

Моделирование полиэлектроит-белковых взаимодействий актуально при рассмотрении ДНК-белковых взаимодействий, при исследованиях иммунологических образований комплексов антиген-антитело, при исследованиях гормональных взаимодействий с рецепторами.. Моделирование полиэлектролит-белковых комплексов помогает понять механизм катализа, в ряде случаев, довольно сложный для отдельных ферментов.

Функции низкомолекулярных метаболитов и соответственно ферменты их метаболизма изучены к настоящему времени достаточно подробно, однако этого нельзя сказать о высокомолекулярных эндогенных полиэлектролитах. Успехи клеточной биологии постепенно приводят к пониманию того, что полиэлектролиты, образуют динамические комплексы как с отдельными белками, так и с клеточными компартментами, что определяет их решающую роль во внутриклеточных процессах.

Изучение функции полиэлектролит-белковых комплексов особенно важно для понимания медицинских аспектов, связанных с заболеванием, причиной которых является размножение и выживание бактерий и в частности *Helicobacter pylori* за счет экзогенно выделяемых ферментов. Функционирование этих бактериальных ферментов в комплексе с внутренними мембранами клеток млекопитающих и другими эндогенными полиэлектролитами, сопровождается нарушением кислотно-щелочного баланса, индуцированного изменением содержания продуктов реакции, катализируемых этими ферментами.

Сродство ферментов к этим полызаряженным компонентам клетки независимо от их агрегатного состояния есть функция присутствия моно- и дивалентных ионов, находящихся в составе любого компартмента живой клетки. Изучение влияния солевого состава среды на функциональные особенности ферментов в комплексе с полиэлектролитами может позволить решать проблемы, связанные с возможностью регуляции биологических процессов в живых организмах.

Выявление природы сил, формирующих полиэлектролит-белковый комплекс, а также изучение каталитических и структурных его характеристик особенно важно в связи с полифункциональностью многих ферментов. В частности показано, что

растительные уреазы, исследуемые в настоящей работе, кроме уреалитической функции обладают инсектицидной активностью, не менее важной для выживания растений в борьбе с паразитами - насекомыми, грызунами т.д.. Многое выявлено в механизме действия этих ферментов на физиологическом уровне [Follmer 2008], однако полное знание как участков присоединения фермента, так и механизмов, инициирующих это присоединение, в настоящее время отсутствует. Так или иначе, в основе инсектицидного действия ферментов лежит образование полиэлектrolит-белкового комплекса, преобразующего свойства самого фермента и матрицы, с которой он связывается.

Ключевым вопросом в изучении влияния полиэлектrolитов на структуру и функции белков является определение физико-химического механизма, который лежит в основе их влияния на активность ферментов при образовании с ними комплексов и определение параметров среды, влияющих на эффективность образования таких комплексов.

Электростатическое поле белковой молекулы является одной из важнейших ее физико-химических характеристик, влияющей на устойчивость пространственной структуры белка, а также определяющей скорость образования, конфигурацию и стабильность комплексов белков с клеточными компонентами разной степени полимеризации. В настоящей работе мы рассмотрели роль электростатического поля во взаимодействиях белков с полиэлектrolитами, т.е. роль поля за пределами белковой глобулы на расстоянии $5,5 \text{ \AA}$ от атома. Такой подход к рассмотрению электростатического поля в ближайшем окружении белка и его визуализации, предложенный Сивожелезовым В. С., основан на том, что расстояние от точки наблюдения потенциала до ближайшего заряда, принадлежащего белку, составляет около 7 \AA . При этом значения вычисляемых нами потенциалов таковы, что соответствующие энергии взаимодействия существенны на фоне энергии теплового движения.

Настоящая работа представляет исследование взаимодействия полиэлектrolитов с ферментами, чтобы на основе теоретической (расчетной) и экспериментальной информации понять природу сил, лежащих в основе полиэлектrolит-белковых взаимодействий.

Цель исследования.

Изучение физико-химических механизмов взаимодействия полиэлектrolитов с мультисубъединичными белками и с помощью расчетов электростатического потенциала на поверхности белков выявление общих закономерностей в формировании таких комплексов, определяющих их функциональное состояние.

Задачи работы.

1. Провести расчеты распределения электростатического потенциала на поверхности односубъединичных белков в широком интервале значений рН и ионной силы с целью выявления условий, при которых усредненные значения рК титруемых аминокислотных остатков могут заменить истинные значения рК, когда они отсутствуют.

2. Провести расчеты электростатического потенциала на поверхности мультисубъединичных белков – лактатдегидрогеназы, глутаматдегидрогеназы, глюкозооксидазы, уреазы в широком интервале значений рН, и интерпретировать экспериментальные данные по ингибиторному действию полиэлектролитов на эти белки.

3. Произвести сравнительные расчеты электростатического потенциала на поверхности двух белков, имеющих близкую пространственную конфигурацию цепи, но с разным числом субъединиц – миоглобина и гемоглобина с целью объяснения экспериментально полученных различий в комплексообразовании этих белков с полиэлектролитом.

4. Экспериментально провести исследования влияния различных солей в широком интервале значений ионной силы на изменение ферментативной активности ЛДГ при образовании комплекса с ПСС методом стационарной кинетики.

5. Провести расчеты распределения электростатического потенциала на поверхности ЛДГ в широком интервале значений ионной силы с целью интерпретировать аномальный ход зависимости функционального состояния полиэлектролит-белкового комплекса от ионной силы.

Научная новизна работы.

Впервые выявлены структурно-функциональные особенности белков, обуславливающие разрушающее действие на них полиэлектролитов. Расчет распределения электростатического потенциала на белках помог правильно выбрать модель для описания взаимодействий белков с полиэлектролитами и интерпретировать изменения функциональных свойств ферментов в комплексе с полиэлектролитом.

Практическая значимость

Результаты теоретического и экспериментального анализа механизма полиэлектролит-белковых взаимодействий полезны для понимания роли полиэлектролитов в регуляции внутриклеточных метаболических процессов, позволяют выявить условия их токсичности и соответственно позволяют вести

направленный выбор нетоксичных полиэлектролитов для приготовления капсулированных фармакологических лекарственных средств.

Апробация работы. Материалы диссертации были представлены на отечественных и международных конференциях: «Ломоносов 2006». (Москва, 2006. Секция «биоинженерия и биоинформатики»), «Ломоносов 2006». (Москва, 2006. Секция «Биология»), «Structural chemistry of partially ordered systems, nanoparticles and nanocomposites», (St-Peterburg, 2006), «Биология наука 21 века» (Пушино, Московская обл. 2006), «Теоретическая и экспериментальная химия жидкофазных систем». (Иваново, 2006, 2007), «Современные проблемы науки о полимерах» (С-Петербург, 2007), «Биология - наука XXI века» (Пушино, Московская обл. 2007), «Математика компьютер образование» (Дубна, Московская обл, 2008, Пушино 2009).

По материалам диссертации опубликовано 14 печатных работ, в том числе 6 статей.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, обсуждения результатов, выводов и списка литературы. Работа изложена на 106 страницах, содержит 10 таблиц и 32 рисунка.

Методы расчета. В работе рассчитывали распределение электростатического поля (РЭП) на поверхности белков численным методом по уравнению Пуассона-Больцмана. Рассчитанный электростатический потенциал изображался на поверхности, отстоящей на $5,5 \text{ \AA}$ от их Ван-дер-Ваальсовой поверхности ($5,5 \text{ \AA}$ -эквилидистантная поверхность, рис. 1). Координаты 3D-структуры белков взяты из Protein Data Bank.

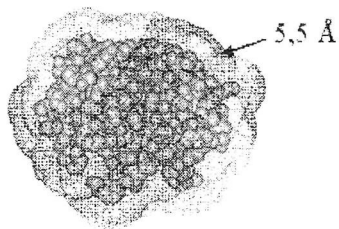


Рис. 1. РЭП на поверхности РНК-азы А, отстоящей на $5,5 \text{ \AA}$ от ее Ван-дер-Ваальсовой поверхности, обозначенной шариками ($5,5 \text{ \AA}$ -эквилидистантная поверхность обозначена сеткой)

Поля со значением потенциала $>+0,5 kT/e$ - черный цвет; - в интервале $[-0,5; +0,5] kT/e$ - серый цвет и $<-0,5 kT/e$ - белый, где k - постоянная Больцмана, e - заряд электрона.

Площади пятен на $5,5 \text{ \AA}$ -эквилидистантной поверхности белка рассчитывали интерполяцией двумерными сплайнами с угловым шагом 10^0 .

Результаты и обсуждение.

Глава 1. Расчет РЭП низкомолекулярных белков с учетом локального окружения заряженных аминокислотных остатков (смещения величины pK).

Локальное окружение для каждого заряженного аминокислотного остатка в белке вызывает смещение ее pK на величину, иногда превышающую две единицы pH .

Экспериментально измерить величины pK всех заряженных остатков в белке - задача сложная и поэтому в настоящее время такие данные имеются лишь для небольшого количества низкомолекулярных белков. Задачей настоящего исследования была оценка влияния отклонения величин pK аминокислотных остатков от стандартно используемых в расчетных программах на РЭП на поверхности белков.

Произведен расчет РЭП на поверхности шести низкомолекулярных белков: рибонуклеазы IFS3, ксиланазы IXNB, миоглобина IIP6, лизоцима 2LZT, α -химотрипсина 2CHA, инсулина ITRZ при значениях pH 4, 5, 6, 7 и 8 и ионной силе 0,1 М и в качестве примера приведен для рибонуклеазы (РНК-азы) на рис. 2.

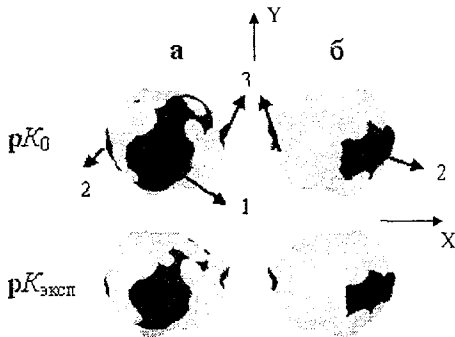


Рис. 2. РЭП на поверхности РНК-азы при pH 4, используя экспериментальные значения $pK_{\text{эксп}}$ и стандартные pK_0 (для полностью доступных растворителю аминокислотных остатков). (а) и (б) - две проекции молекулы, полученные поворотом вокруг оси u на 180°

Протяженные области положительного потенциала на поверхности белков определяют высокое связывание анионных полиэлектролитов в случае образования с ними комплексов, возможный ингибиторный эффект и разрушение структуры белка. Величины площадей пятен с положительным потенциалом численно рассчитаны нами для всех шести белков и в качестве примера представлены для РНКазы, ксиланазы и лизоцима в таблице 1.

Таблица 1. Расчётные площади потенциальных участков связывания отрицательно заряженных полиэлектролитов на ферментах, полученные с использованием истинных значений $pK_{\text{эксп}}$ аминокислотных остатков (с учетом окружения) - $S_{\text{учет}}$ и стандартных (полностью доступных растворителю остатков) pK_0 - S_0 . Величина $f = S_0 / S_{\text{учет}}$

Фермент	pH	№ пятна	$S_0, \text{Å}^2$ pK_0	$S_{\text{учет}}, \text{Å}^2$ $pK_{\text{эксп}}$	f	
Ксиланаза	4.0	1	2660,8	653,5; 366,2; 273,7;	1,7	
		2	348,8	224,5	2,5	
		3	159,2	131,8	16	
	5.0			<10		
		1	2220	694; 602; 191,2	1,5	
		2	308,3	286	1,1	

	6.0	1	1402,3	575,8; 332,7; 219,2;	1,08
		2	236	155,2 217,6	1,08
	7.0	1	484; 168; 95	480; 167; 95	1,00
2				5	
	8.0	1	340;124,5	340;124,5	1,0
		2	194	194	1,0
РНКазы А	4,0	1	4715,5;	3703,3	1,3
		2	447,5	359	1,2
		3	37,5	23,43	1,6
	5,0	1	2002; 1095,7	1300; 901; 238,4	1,3
		2	262	234,2	1,1
	6,0	1	1227,1; 825,7; 107,5	1156,8; 745; 103,5	1,07
		2	185	180	1,03
	7,0	1	904; 590	838; 503,2;	1,1
		2	127	124	1,02
	8,0	1	901.2; 591,5	892.3; 585.6	1,01
2		95,6	94,8	1,01	
Лизоцим	4,0	1	5463,2	4173,6	1,3
		2	554,9	277,3	2,0
	5,0	1	3018	2741	1,1
		2	213	148,4	1,4
	6,0	1	2560,4; 556,2; 373	2440;550,2; 366,8	1,04
		2	135,4	130,7	1,04
	7,0	1	2070; 546; 338	1953; 541; 337	1,05
		2	116	112	1,03
	8,0	1	2150,7; 537,2; 339,1	2150,7; 537,2; 339,1	1,0
		2	116,4	116,4	1,0

Расчеты, сделанные нами для α -химотрипсина, миоглобина и инсулина, аналогичные представленным в таблице 1, приводят к такой же зависимости величины f от pH.

В результате расчета РЭП, площадей с разноименным потенциалом и оценки величин f показано, что учет окружения заряженных аминокислотных остатков изменяет РЭП на поверхности ферментов, но в ограниченной области pH 3–5. Это вызвано спецификой смещений величины pK преимущественно кислых аминокислотных остатков, определяемой расположением их преимущественно в изолированной от растворителя области. В области pH 6–8 учет окружения аминокислотных остатков для рассмотренных белков при расчете РЭП можно не осуществлять. Выполненные расчеты позволили применить полученные результаты к белкам с высоким молекулярным весом, для которых отсутствуют точные экспериментальные значения величин pK .

Глава 2. Расчеты электростатического потенциала на поверхности лактатдегидрогеназы и глутаматдегидрогеназы

В нашей лаборатории были проведены эксперименты по влиянию ряда полиэлектролитов на структурные и каталитические характеристики лактатдегидрогеназы (ЛДГ, КФ.1.1.1.27) и глутаматдегидрогеназы (ГДГ, КФ. 1.4.1.3). Оба фермента являются NAD-зависимыми дегидрогеназами, имеют близкую конфигурацию полипептидной цепи согласно рентгеноструктурным данным, но разное число субъединиц. В растворимой фракции клетки они контактируют со многими эндогенными полиэлектролитами – полифосфатом, полиглутаматом, полинуклеотидами и т.д. и поэтому физико-химический механизм их взаимодействия с полиэлектролитами важно исследовать.

Методами флуоресцентной спектроскопии, кругового дихроизма и стационарной кинетики было показано, что присоединение отрицательно заряженных полиэлектролитов - полистиролсульфоната, полиметакриловой кислоты и полифосфата к этим белкам разрушает третичную структуру и больше половины α -спиральной структуры, приводя к полной их инактивации при pH 6,2 (Рис. 3).

В результате наших экспериментальных исследований взаимодействия полиэлектролитов с ферментами возникли следующие вопросы.

1) Почему полиэлектролит ингибирует фермент значительно эффективней, чем мономер притом, что стерически в активный центр может поместиться только мономер? 2) От каких свойств полиэлектролита зависит эффективность ингибирования? 3) От каких свойств фермента зависит его стабильность к ингибиторному действию полиэлектролита? 4) Можно ли идентифицировать области узнавания на ферменте.

Для того, чтобы получить ответы на эти вопросы мы рассчитали распределение электростатического поля на поверхности этих ферментов при различных pH и ионных силах с целью оценить влияние электростатического потенциала белка на экспериментально измеряемую величину – степень ингибирования и разрушения структуры фермента полиэлектролитом (Рис. 4).

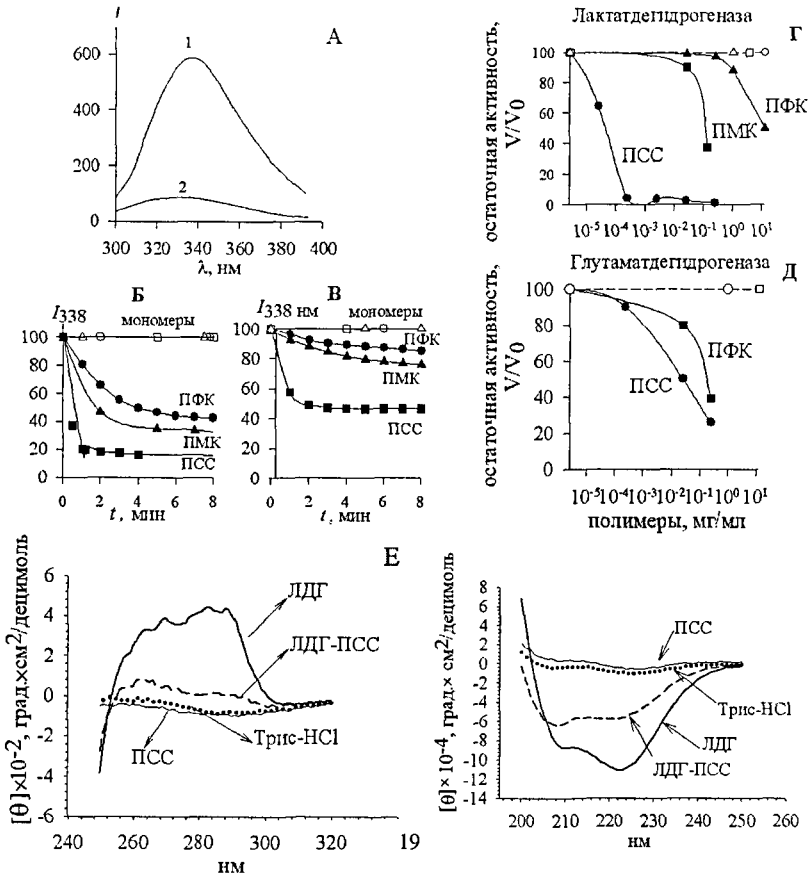


Рис. 3. Спектры флуоресценции ЛДГ свободной и в комплексе с ПСС (а) (1 – без ПСС, 2 – 0,0025 мг/мл ПСС; $I_{\text{возб}} = 295$ нм; 0,05 М Tris-НСl буфер, рН 6,2; ЛДГ 0,03 мг/мл).

(б) и (в) динамика тушения флуоресценции ЛДГ и ГДГ сразу после добавления полиэлектролитов (заполненные символы) и их мономеров (открытые символы).

Полистиролсульфонат (ПСС) 0,25 мг/мл, полиметакрилат (ПМА) 0,25 мг/мл, полифосфат (ПФК) 0,75 мг/мл; I_{338} - интенсивность флуоресценции при 338 нм

(г) и (д) зависимость активности ЛДГ и ГДГ от концентрации полиэлектролитов ПСС, ПМК и ПФК. ЛДГ 0,2 мкг/мл; пируват 1 мМ; NADH 0,2 мМ; ГДГ 2 мкг/мл; α -кетоглутарат 1 мМ, NADH 0,2 мМ, NH_4Cl 75 мМ..

КД спектры в ближней (е) и в дальней (ж) УФ-области ЛДГ в свободном состоянии и в комплексе с ПСС. ЛДГ 0,5 мг/мл; ПСС 0,5 мг/мл. Длина кюветы 1 см (е) и 0,02 см (ж). 0,05 М трис-НСl буфер рН 6,2.

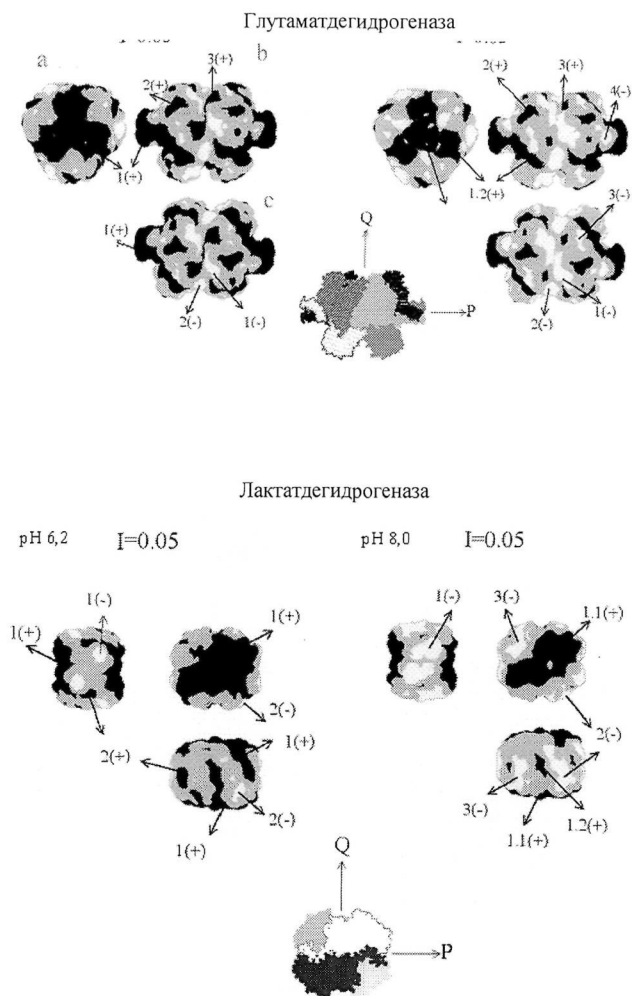


Рис. 4. Распределение электростатического потенциала по поверхности лактатдегидрогеназы и глутаматдегидрогеназы при pH: 6,2 и 8; ионная сила 0,05 М. Проекция молекулы белка на плоскости PQ - а, QR - б, RP - с.

Расчеты РЭП показали, что поверхность ГДГ представляет собой мозаичное распределение небольших участков положительного, отрицательного и нейтрального потенциала, в отличие от ЛДГ, у которой большая область положительного

потенциала распространяется на обе стороны поверхности, занимая порядка ее двух третей.

Таблица 2. Значения величин площадей потенциальных участков для связывания полиэлектролитов (участки с положительным (+) и отрицательным (-) потенциалами) на молекулах ЛДГ и ГДГ - $s_{0,05}$ и $s_{0,15}$ при ионной силе 0,05 и 0,15 соответственно, A/A_0 - относительная остаточная активность ферментов в присутствии полиэлектролита. $S(+)$ и $S(-)$ - суммарные площади положительных и отрицательных «пятен»

Фермент	pH	№ «пят-на»	$s_{0,05}$ Å^2	$s_{0,15}$ Å^2	N**	A/A_0 , %	
						I=0,05	I=0,15
Лактат-дегидрогеназа	6,2	1(+)	5930	4460; 320; 275	x 2	1±0,5	45±2
		2(+)	290	230	x 2		
		1(-)	280	270	x 4		
		2(-)	215	190	x 2		
		$[S(-)/S(+)]_{\text{pH}6,2} = 0,12$ при I=0,05 0,14 при I=0,15					
	8,0	1(+)	3290; 240	2240; 150	x 2	90±5	100±5
		1(-)	880	410	x 2		
		2(-)	870	325	x 4		
		3(-)	720	430; 210	x 2		
		$[S(-)/S(+)]_{\text{pH}8} = 0,94$ при I=0,05 0,71 при I=0,15					
$[S(+)]_{\text{pH}8} / [S(+)]_{\text{pH}6,2} = 0,57$ при I=0,05 $[S(-)]_{\text{pH}8} / [S(-)]_{\text{pH}6,2} = 4,3$							
Глутамат-дегидрогеназа	6,2	1(+)	12090	2155; 1180(3)	x 2	63±5	94±5
		2(+)	480	460	x 6		
		3(+)	440	380	x 6		
		1(-)	680	370	x 6		
		2(-)	375	255	x 3		
		$[S(-)/S(+)]_{\text{pH}6,2} = 0,175$ при I=0,05 0,182 при I=0,15					
	8,0	1(+)	1080,1390(3)	1050(3)	x 2	98±5	100±5
		2(+)	430	460	x 2		
		3(+)	170	320	x 6		
		4(+)	-	150	x 6		
		1(-)	1040	550	x 6		
		2(-)	620	540	x 3		
		3(-)	320	240	x 6		
4(-)	300	210	x 6				
$[S(-)/S(+)]_{\text{pH}8} = 0,95$ при I=0,05 0,76 при I=0,15							
$[S(+)]_{\text{pH}8} / [S(+)]_{\text{pH}6,2} = 0,41$ при I=0,05; $[S(-)]_{\text{pH}8} / [S(-)]_{\text{pH}6,2} = 2,27$							

Анализ данных таблицы 2 показывает критичность ингибиторного действия полиэлектролита (A/A_0) по отношению к линейным размерам противоположно

заряженных участков на поверхности белка (таблица 2), а именно резкое ослабление ингибиторного действия ПСС при увеличении pH от 6,2 до 8. Как видно из таблицы 2, размеры площадей на поверхности ЛДГ, потенциально связывающих полиэлектролит, близки длине полиэлектролита из 50 мономеров (для ПСС контурная длина равна 125 Å, длина в скрученном состоянии порядка 80 Å).

На основе анализа экспериментальных данных, с учётом кинетики инактивации ферментов полиэлектролитом, а также расчета РЭП, произведенного для этих белков, процесс разрушения белков полиэлектролитом можно описать следующей схемой:

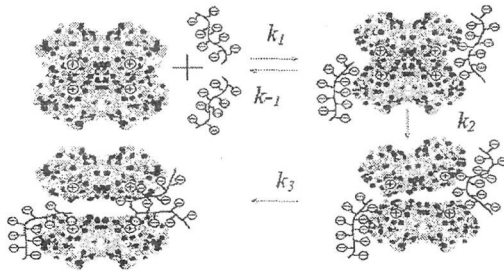


Рис. 5 Схема разрушения белков полиэлектролитами. k_1 и k_{-1} - константы скорости обратимого связывания ПЭ с белком, k_2 - константа инаktivации (медленная ~ 1 мин $^{-1}$ по данным спектральных исследований); k_3 - константа скорости необратимых изменений структуры белка.

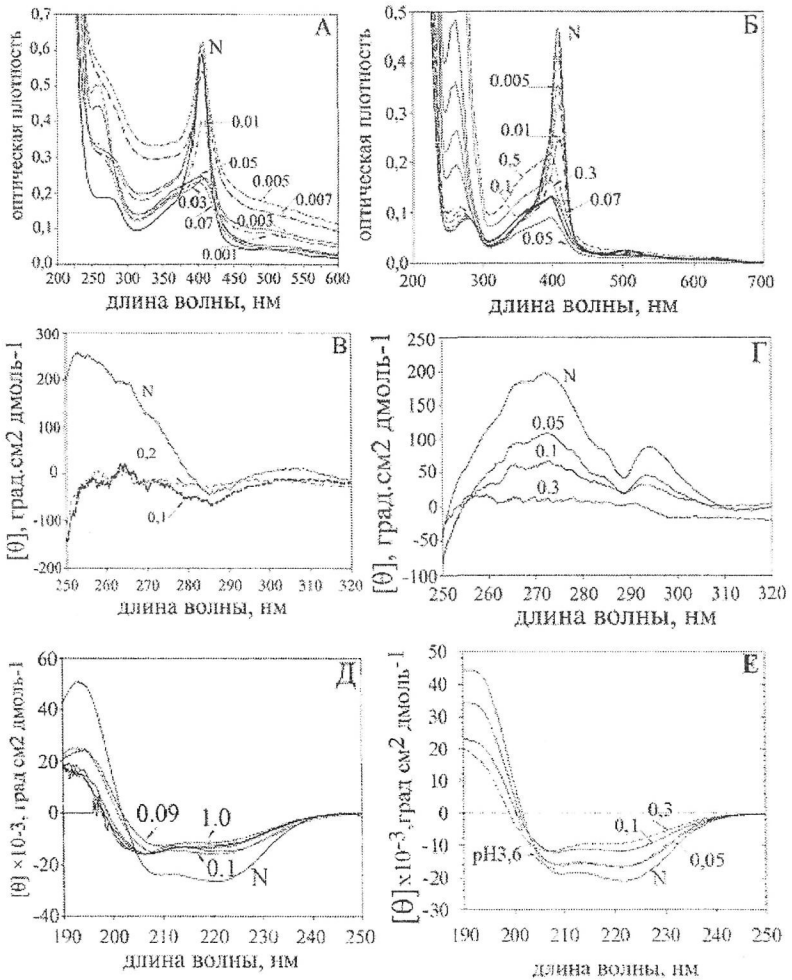
Расчеты РЭП на поверхности этих белков позволили выявить особенности структурно-функциональных свойств белков, обуславливающие эффективность их повреждающего действия полиэлектролитом. а) Наличие протяженных участков на поверхности ЛДГ с положительным потенциалом в отличие от мозаичного распределения на ГДГ. б) Расположение участков с положительным потенциалом на ЛДГ в области наиболее слабых контактов между димерами. Для ГДГ участки с положительным потенциалом расположены в области плотно скрученных мономеров в тримеры.

Глава 3. Расчеты электростатического потенциала на поверхности моно и тетрамерного белков с близкой структурой – миоглобина и гемоглобина.

В данной главе мы рассмотрим механизм разрушающего действия анионного полиэлектролита - полистиролсульфоната, наиболее активного из других исследованных нами полиэлектролитов, на структуру гемосодержащих белков - гемоглобина (Hb) 2МНВ и миоглобина (Mb) 1Р6. Методами оптического поглощения протетической группы гема в видимой части спектра и кругового дихроизма в полосах поглощения пептидных групп и ароматических аминокислотных остатков (Рис. 6 и 7) показано, что в присутствии полистиролсульфоната (ПСС) компактная структура обоих белков разрушалась. Содержание α -спирали Hb и Mb

при образовании комплекса с ПСС падало от 81 % до 43 %. Кинетика разрушения обоих белков полиэлектролитом представляла двухфазный процесс: первая фаза разрушения Нв осуществлялась с константой скорости в 4 раза более медленной ($\tau \approx 24,5$ с), чем Мб ($\tau \approx 6$ с); вторая медленная фаза с полупериодом порядка 6 часов одинакова для обоих белков.

Рис. 6. Спектры оптического поглощения – (А) и (Б), спектры КД в ближней (В) и (Г) и дальней УФ-области (Д) и (Е) для Нв (слева) и Мб (справа) в присутствии разных концентраций ПСС. Длина оптического пути 1мм (А) и (Б), 10 мм (В) и (Г); 0,2 мм (Д) и (Е). Концентрация Нв и Мб 0,45 мг/мл; 10 мМ Na_2HPO_4 , рН 6.2. Цифры на кривых – концентрация ПСС в мг/мл



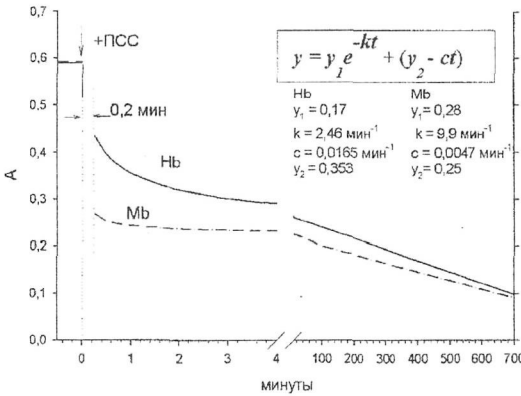
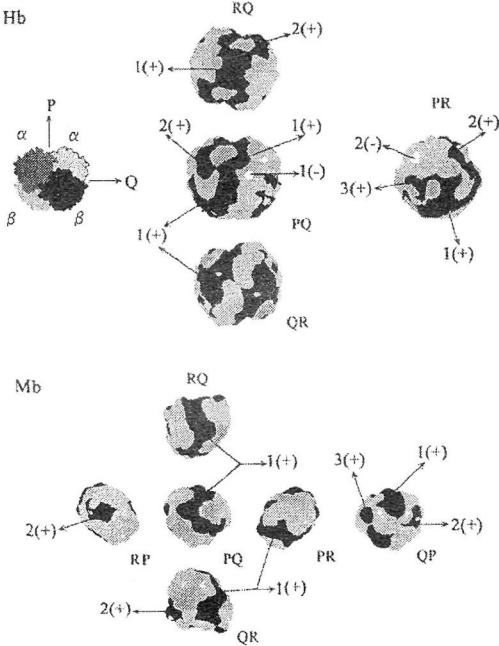


Рис. 7. Кинетика взаимодействия Mb и Hb с PSS. Длина кюветы 1 см, Mb, Hb и PSS – 0,05 мг/мл, 10 мМ фосфатный буфер, pH 6,5.

Для определения локализации потенциальных участков связывания полиэлектролита на

поверхности белков произведен расчет распределения электростатического поля Hb и Mb при pH 6,2 и ионной силе 10 мМ. (Рис. 8).

Рис. 8. РЭП на поверхности Hb и Mb. pH: 6,2; ионная сила 0,05 М. Прореции на соответствующие плоскости. Обозначение цвета потенциала как на рис. 1. Ось R перпендикулярна плоскости.



Из рис. 7 видно, что молекула Hb имеет протяженные участки с положительным потенциалом (черные пятна) - потенциальные участки для связывания больших молекул отрицательно заряженного полиэлектролита. Наиболее существенным является то, что самое большое протяженное пятно с положительным потенциалом 1(+) распределено вдоль межсубъединичных контактов двух $\alpha\beta$ -димеров и опоясывает всю молекулу белка. (Hb при нейтральных pH диссоциирует на $\alpha\beta$ -димеры.).

Вычисленные площади пятен с положительным и отрицательным потенциалами на поверхности Hb и Mb приведены в таблице 3

Таблица 3. Значения величин площадей потенциальных участков для связывания полиэлектролитов $s(+)$ и $s(-)$. Ионная сила 0,01 М, pH 6,2. $S(+)$ и $S(-)$ – суммарные площади положительных и отрицательных «пятен» соответственно.

* В скобках - номер пятна; умножение на два означает, что таких два симметричных пятна.

Белок	$s(+), \text{Å}^2$	$s(-), \text{Å}^2$
Гемоглобин	(1+) 3750,4	(1-) 35,5 x 2
	(2+) 371 x 2*	(2-) 50,9 x 2
	(3+) 182,7 x 2	-
	(4+) 41,2 x 2	-
	$[S(-)/S(+)]_{\text{pH}6,2} = 0,035$	
Миоглобин	(1+) 1922,3	(1-) 11,2
	(2+) 389,2	(2-) 8,6
	(3+) 107,8	-
	$[S(-)/S(+)]_{\text{pH}6,2} = 0,0082$	

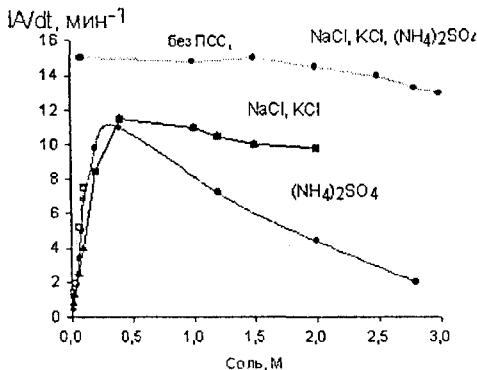
Низкое отношение $[S(-)/S(+)]_{\text{pH}6,2}$, хорошо объясняет, почему именно отрицательно заряженные полиэлектролиты согласно нашим экспериментальным данным связываются с этими белками с высоким средством, в то время как положительно

заряженные полиэлектролиты не вызывают каких-либо изменений структуры. Расчеты показали, что самое большое протяженное пятно с положительным потенциалом на Hb распределено вдоль межсубъединичных контактов двух $\alpha\beta$ -димеров и опоясывает всю молекулу белка, что создает особые условия для разрушения белкового тетрамера и увеличению доступности растворителю гидрофобных групп белка в контакте между субъединицами.

Высокая скорость разрушения молекулы Mb по сравнению с Hb обеспечивается, скорее всего, более высоким отношением поверхности к объему молекулы Mb по сравнению с Hb при наличии протяженных участков с положительным ЭП на ее поверхности.

Глава 4. Исследование влияния различных солей на ферментативную активность ЛДГ в комплексе с ПСС.

При низких концентрациях соли ($I < 0,5$) (рис. 9) активность фермента возрастает одинаково для всех исследованных солей в пересчете на ионную силу. В



области высоких концентраций соли, более 1 М, активность ЛДГ в

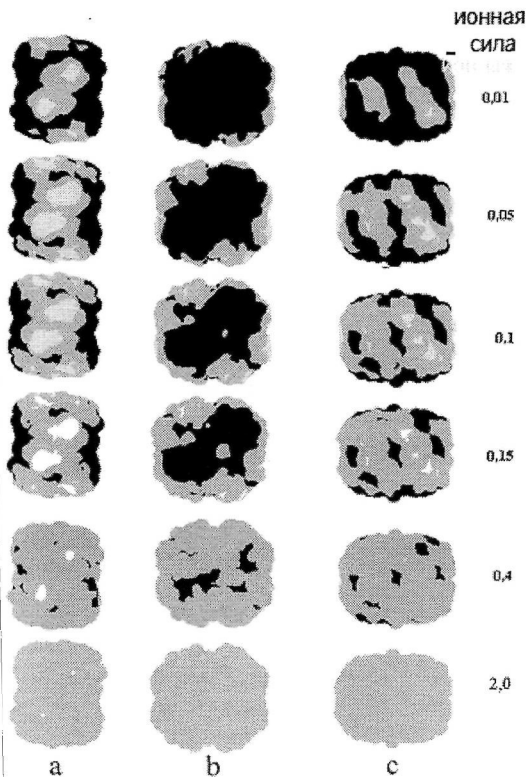
Рис. 9. Зависимость скорости восстановления пирувата в лактат, катализируемого ЛДГ, в свободном состоянии и в комплексе с ПСС от концентрации солей. ЛДГ 0,2 мкг/мл; ПСС 1,2 мкг/мл; пируват 1 мМ, NADH 0,2 мМ, pH 6,2

комплексе с ПСС проявляет «аномальную» зависимость: в присутствии $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - активность фермента падает в этой области практически до нуля. При этом в растворе NaCl и KCl активность ЛДГ в комплексе с ПСС изменяется незначительно - не более 10 % от своего максимального значения в интервале от 0,4 М вплоть до 3 М соли.

Расчет электростатического поля на поверхности молекулы ЛДГ показывает (Рис. 10), что площади как с положительным, так и с отрицательным потенциалами падают с ростом ионной силы, причем при ионной силе 2 М на расстоянии 5,5 Å электростатический потенциал практически на всей поверхности равен нулю. Это означает, что полиэлектролит может близко подходить к молекуле белка и образовывать с ней гидрофобные контакты. Отметим, что инактивация ЛДГ в присутствии ПСС

происходит при концентрациях солей как очень низких, так и >1 М, т.е. концентрациях, при которых проявляется эффект высаливания гидрофобных групп.

Рис. 10. Распределение электростатического потенциала на поверхности ЛДГ при разных значениях ионной силы, pH 6,2. *a, b, c* - проекции молекулы белка на плоскости PQ, QR и RP соответственно.



Произведен расчет площади наибольшего пятна с положительным потенциалом на молекуле ЛДГ в зависимости от ионной силы из данных рис. 10. Площадь пятна с положительным потенциалом на молекуле ЛДГ и персистентная длина обе

уменьшаются при экранировании зарядов противоионами в растворах солей с ростом ионной силы (Рис. 11). Уменьшение персистентной длины, т.е. рост гибкости

полимера должен приводить к усилению взаимодействия его с белком. Однако активность ЛДГ увеличивается в интервале концентраций соли 0- 0,4 М (Рис. 9). Это означает, что из двух разнонаправленных эффектов, вызванных влиянием солей – ослабления электростатических взаимодействий между белком и ПСС (экранирование зарядов противоионами) и увеличения гибкости ПЭ (уменьшение персистентной длины) первый является доминирующим.

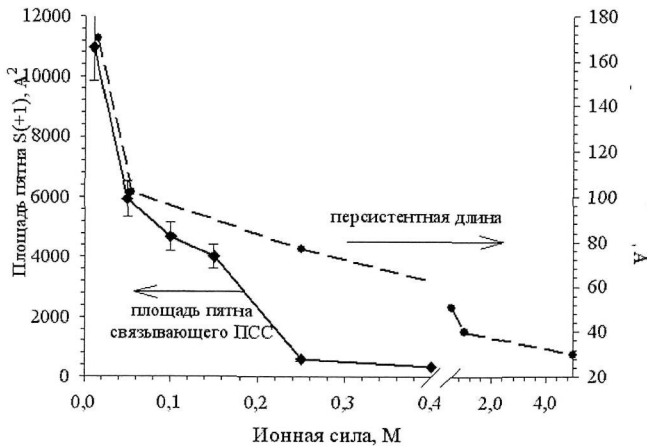


Рис. 11 Зависимость площади наибольшего пятна с положительным потенциалом (+1) на молекуле ЛДГ и персистентной длины ПСС от ионной силы. Персистентная длина - данные [Tricot M 1984]

Глава 5. Взаимодействие уреазы с полиэлектролитами.

Ранее мы исследовали влияние полиэлектролита полиаллиламина (ПАА) на структуру и каталитические характеристики уреазы (*Canavalia ensiformis*) методами стационарной кинетики, флуоресцентной спектроскопии и кругового дихроизма. Связывание ПАА с ферментом практически не изменяет третичную и

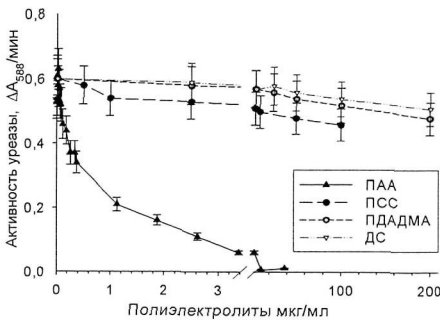


Рис. 12. Зависимость активности уреазы от концентрации полиэлектролитов: полистиролсульфоната (ПСС), декстрансульфата (ДС), полиаллиламина (ПАА) и полидиаллилдиметиламмоний ло-рида (ПДАДМАХ). Уреазы – 0,5 мкг/мл, мочевина 125 мМ, бромкрезол – 30 мкМ, ПАА 7.5 мг/мл, рН 6.2

вторичную структуры уреазы, сопровождаясь очень слабым тушением флуоресценции $\sim 8\%$ без изменения λ_{max} и сохранением содержания α -спиральной структуры.

Из представленных данных видно, что полиэлектролит является сильным ингибитором уреазы, при этом структура уреазы сохраняется в комплексе с ПАА практически нативной. Чтобы объяснить этот результат, были произведены расчеты РЭП на поверхности белка. Для этого была построена расчетная структуры уреазы из *Canavalia ensiformis* исходя из идентичности аминокислотной последовательности с уреазой из *Bacillus pasteurii*, для которой имеются 3D-координаты в PDB-банке.

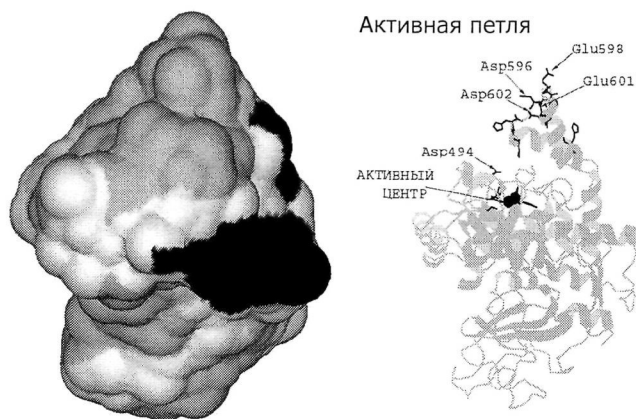


Рис. 13. Структура Jack bean уреазы. А - РЭП на поверхности уреазы. Поля со значением потенциала $>+0,5$ kT/e - черный цвет; - в интервале $[-0,5; +0,5]$ kT/e - белый и $<-0,5$ kT/e - серый. Б - Показана локализация активного центра и подвижной петли, участвующей в катализе.

На рис. 13 Б приведена структура Jack bean уреазы, в активном центре которой сферами выделены два атома никеля и лигандами их являются His 407, His 409, His 519, His 545 и Asp 633. Уреазы из разных источников, в том числе и Jack bean уреазы, имеют подвижную петлю в активном центре - это остатки 590-607. Петля закрывает активный центр после связывания мочевины. В результате движения петли Асп 494 фиксирует положение His 492, который участвует в катализе. По данным наших расчетов РЭП в районе этой петли поле сильно отрицательное (серый цвет на рис. 13А).

Мы полагаем, что 4 карбоксильных группы Асп 596 и 602 и Глу 598 и 601, могут быть сайтами для связывания полиэлектролита и препятствовать движению

этой петли, и соответственно ингибировать катализ, сохраняя основную часть структуры.

Заключение.

Представленные в работе данные показывают, что стабильность белков к разрушению их полиэлектrolитами зависит не столько от полного заряда белка, изоэлектрической точки или величины потенциала, а определяется особым распределением электростатического потенциала на поверхности белка и особенно расположением соответствующего потенциала в области межсубъединичных контактов для олигомерных белков.

Известно, что стабильность белков к тепловой денатурации коррелирует со стабильностью их к разрушению разными факторами, в частности расщеплению протеазами [Александров В.Я., 1985]. Нашей задачей было определить, в какой мере стабильность белков к разрушению их полиэлектrolитами соотносится со стабильностью их к тепловой денатурации. В следующей таблице приведены значения температуры денатурации исследованных нами белков и значения концентраций полиэлектrolитов, вызывающих 50 % ингибирование.

Таблица 4. Значения некоторых структурных характеристик белков, температуры денатурации и эффективности разрушения их полиэлектrolитами.

Белок	Число остатков / субъед.	Полный заряд белка Q	T(ден) °C	ПЭ/б елок г/г 50 % ингиб	$k_{ин}$ спект харак мин-1
α -химо-трипсин	245	+5	58	0,05	-
Мет-миоглобин	153	+14	84	0,02*	9,9*
Мет-гемоглобин	α -141 β -146	+38	63	0,5*	2,46*
Лактатдегидрогеназа	332	+56	62	1	1,02
Глютаматдегидрогеназа	501	+102	63	100	0,8
Уреаза	840	+66	68	1	0,95

Анализ данных таблицы 4 показывает: 1) белки с близкой структурой имеют большие различия в стабильности их к разрушению полиэлектrolитами: – ЛДГ и ГДГ, а также Mb и Hb различаются более чем на порядок по ингибирующей концентрации ПЭ; 2) стабильность белков к разрушению полиэлектrolитом не коррелирует со стабильностью их к тепловой денатурации (Mb имеет T(ден) на 20° С выше, чем Hb, но менее

стабилен к разрушению полиэлектrolитом). Стабильность белка к разрушению

полиэлектrolитом не определяется также ни полным зарядом белка Q , ни величиной «пятен» - площадью соответствующего электростатического потенциала. Из приведенных данных видно, что одним из основных свойств белков, определяющих эффективность разрушения их полиэлектролитом, является особое распределение на его поверхности электростатического потенциала относительно межсубъединичных контактов.

Глава 6. Прикладное применение расчетов РЭП на белках

Расчет РЭП на поверхности глюкозооксидазы и α -химотрипсина, проведенный нами в интервале pH 3-9, позволил выявить причину ранее полученных различий pH-зависимостей сорбции [Volodkin D.V. et al, 2005] этих белков на поверхности полиэлектролитных микросфер с отрицательно заряженным внешним слоем. В результате сильной асимметрии РЭП на поверхности α -химотрипсина, белок взаимодействует с заряженной поверхностью микросфер как протяженный диполь и сорбция его растет с увеличением pH, несмотря на то, что отрицательный заряд белка увеличивается. Молекула глюкозооксидазы имеет мозаичное чередование положительных и отрицательных областей потенциала и pH-зависимость сорбции его на микросферолиты, напротив, снижается с ростом pH, т.е. с увеличением отрицательного заряда белка.

Создание ферментативных полиэлектролитных микрореакторов выдвигает определенные требования к свойствам ферментов - изоэлектрической точке белка pI , величине его полного заряда Q . Однако, как видно из представленных результатов, для успешного решения таких задач особенно важно знать точное распределение электростатического потенциала на поверхности белка. Расчет РЭП на поверхности ЛДГ и уреазы при разных pH и ионной силе позволил сделать рациональный выбор полиэлектролитов для формирования энзиматически активных полиэлектролит-белковых комплексов при разработке биоинженерных проектов, в том числе, предложенных нами полиэлектролитных микродиагностикумов.

Выводы

1. В расчётах распределения электростатического потенциала (РЭП) на поверхности белков в интервале $3 \leq \text{pH} \leq 8$ необходимо учитывать отклонение экспериментальных величин pK от стандартных или усреднённых по различным белкам значений при $\text{pH} \leq 5$.

2. Проведённое исследование позволило выявить структурно-функциональные особенности белков, обуславливающие разрушающее действие на них полиэлектrolитов:

а) наличие протяжённых участков с одноименным потенциалом на поверхности белка.

б) расположение участков с противоположным полиэлектrolиту потенциалом в области контактов между субъединицами для олигомерных белков при наличии высокой константы диссоциации на субъединицы.

в) при одинаковой площади электростатического потенциала на поверхности белков объём молекулы белка определяет стабильность его к разрушению полиэлектrolитом.

3. Предложена схема ингибиторного действия полиэлектrolита, согласно которой первая стадия процесса – обратимое связывание полиэлектrolита, инициируемое электростатическими взаимодействиями; вторая стадия (лимитирующая) диссоциация белка на субъединицы сопровождается конформационными изменениями в структуре белка, инициируемыми гидрофобным включением полиэлектrolитного остова в белковую глобулу или в межсубъединичный контакт. Третья необратимая стадия – дальнейшее разрушение третичной и частично вторичной структур.

4. Экспериментальные исследования влияния ионной силы на скорость восстановления пирувата в лактат, катализируемого ЛДГ, показали «аномальную» зависимость в области высоких концентраций соли, связанную с вторичным падением активности.

5. Показано, что из двух разнонаправленных эффектов, вызванных влиянием солей – уменьшения электростатических взаимодействий (экранирование зарядов противоположными ионами) и увеличения гибкости ПЭ (уменьшение персистентной длины) первый является доминирующим.

6. Стабильность белков к разрушению полиэлектrolитами не коррелирует со стабильностью их к тепловой денатурации.

7. На основе расчета РЭП двух белков выполнен прогноз условий их капсулирования в полиэлектrolитные оболочки (последовательность нанесения ПЭ, солевой состав среды), который был подтвержден экспериментально.

Список публикаций по теме диссертации

Статьи

1. Сабурова Е.А., **Дыбовская Ю.Н.**, Сивожелезов В.С., Елфимова Л.И. «Электростатический вклад во взаимодействие некоторых белков с полиэлектролитами» // Биофизика, 2005, Т. 50, вып.3, С. 423-433.
2. Сабурова Е.А., **Дыбовская Ю.Н.**, Сивожелезов В.С., «Применение расчетов электростатического поля белков при выборе ферментов для микрокапсулирования», // в сб. «Математика, компьютер, образование», 2005. Т. 12. ч. 3. Стр. 923-932.- ISBN 5-93972-497-3.
3. Сабурова Е.А., Басова Л., **Дыбовская Ю.Н.**, Сухоруков Б.И. «Влияние полистиролсульфоната на структуру гембелков» // Журнал Физической Химии, 2006, Т. 80, №8, С. 1-12
4. Tikhonenko S.A., Saburova E.A., Dubrovsky A.V., Shabarchina L.I., **Dybovskaia Ju.N.**, Sukhorukov B.I. Methodology of inclusion of enzymes in polyelectrolyte nano- and microcapsules on example of lactate dehydrogenase. // Glass Physics and Chemistry. 2007, Vol. 33, No. 3, P. 287-293.
5. Сухоруков Б.И., Тихоненко С.А., Сабурова Е.А., Дубровский А.В., **Дыбовская Ю.Н.**, Шабарчина Л.И. «Инкапсулирование ферментов в полиэлектролитные нано- и микрокапсулы в связи с проблемой микродиагностикума.» //Биофизика, 2007, т. 52, вып.6, С. 1041-1048.
6. Сабурова Е.А., Тихоненко С.А., **Дыбовская Ю.Н.**, Сухоруков Б.И. «Изменения активности и структуры уреазы при взаимодействии с полиэлектролитами» // Журнал Физической Химии, 2008, т. 82, N 3, С. 554-561.

Тезисы

1. **Дыбовская Ю. Н.**, Сабурова Е.А., Елфимова Л.И., Сивожелезов В.С. «Модельные исследования взаимодействия полиэлектролитов с белками. Применение метода численного решения уравнения Пуассона–Больцмана.» III Съезд биофизиков, Воронеж, 2004, стр. 26-27.
2. Tikhonenko S.A., Saburova E.A., Dubrovsky A.V., Shabarchina L.I., **Dybovskaia Yu.N.**, Sukhorukov B.I. «Methodology of inclusion of enzymes in polyelectrolyte nano-

and microcapsules on example of lactate dehydrogenase». Abstr. "Structural chemistry of partially ordered systems, nanoparticles and nanocomposytes", 2006, St.-Peterburg, p. 169

3. Тихоненко С.А., Сабурова Е.А., Шабарчина Л.И., Дыбовская Ю.Н., Сухоруков Б.И. «Механизм разрушения ферментов полиэлектролитами. Возможная токсичность для клетки». XIII международная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов 2006», Москва 2006 г. секция «Биология» стр. 222-223.

4. Тихоненко С.А., Дубровский А.В., Дыбовская Ю.Н. «Сравнительное исследование каталитических характеристик и стабильности уреазы в свободном состоянии и включенной в полиэлектролитную микрокапсулу» «Биология - наука XXI века», Пушкино, 2007. стр. 197.

5. Тихоненко С.А., Дыбовская Ю.Н., Сабурова Е.А., Сухоруков Б.И. Образование полиэлектролит-белковых комплексов. Двойное действие солей. -- Труды Межд.конф. «Современные проблемы науки о полимерах», С-Петербург, 2007, стр. 280.

6. Тихоненко С.А., Дыбовская Ю.Н., Сабурова Е.А., Кузнецова С., Сухоруков Б.И. Полиэлектролит-белковые комплексы. Влияние длины цепи полиэлектролита на эффективность его разрушающего действия на белки. Труды II Региональной конф. мол. ученых «Теоретическая и экспериментальная химия жидкофазных систем», Иваново, 2007, стр. 68

7. Тихоненко С.А., Дыбовская Ю.Н., Сабурова Е.А. «Применение расчетов электростатического поля белков в исследовании взаимодействия полиэлектролитов с белками в широком диапазоне ионной силы». XV Конференция «Математика. Компьютер. Образование», Дубна 2008 г. стр. 224.

8. Дурденко Е.В., Дыбовская Ю.Н., Тихоненко С.А., Сабурова Е.А. «Полиэлектролит белковый комплекс. Влияние полиаллиламина на структуру и функции уреазы». XVI Конференция «Математика. Компьютер. Образование», Пушкино 2009 г. секция «Анализ сложных биологических систем: эксперимент и модели», стр. 244.

Подписано в печать: 23.04.2009

Заказ № 1924 Тираж - 75 экз.

Печать трафаретная.

Типография «11-й ФОРМАТ»

ИНН 7726330900

115230, Москва, Варшавское ш., 36

(499) 788-78-56

www.autoreferat.ru