



УДК 577.154.36.02

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ pH
И ТЕМПЕРАТУРЫ НА ТЕРМОДИНАМИЧЕСКИЕ
ПАРАМЕТРЫ КОМПЛЕКСООБРАЗОВАНИЯ ЛИЗОЦИМА
С ОЛИГОСАХАРИДАМИ ХИТИНА

Шашкова Е. А., Вичутинский А. А., Заславский Б. Ю.,
Усубалиева Л. Р., Хорлин А. Я., Шульман М. Л.

Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина
Академии наук СССР, Москва

Методом реакционной калориметрии смешения исследовано взаимодействие лизоцима белка куриных яиц с *N*-ацетил-*D*-глюкозамином, *N,N'*-диацетилхитобозой и *N,N',N''*-триацетилхитотриозой. В интервалах pH (4,5—7,3) и температуры (17, 25 и 40°) определены значения константы равновесия K_a и энтальпии ΔH° реакции комплексообразования лизоцима с соответствующими сахарами. Для исследованных реакций предложен механизм, включающий стадии образования водородных связей в комплексе, дегидратации реагентов и конформационных изменений биополимера. Используя данные о числе водородных связей в комплексе и принцип аддитивности, в рамках предложенной модели определены основные термодинамические параметры — ΔG° , ΔH° и ΔS° , характеризующие каждую отдельную стадию исследованных реакций комплексообразования лизоцима с сахарами.

Взаимодействие лизоцима с олигосахаридами хитина изучалось многими авторами различными методами [1—5]. При этом были определены величины энтальпии взаимодействия этих ингибиторов с лизоцимом при pH 5,0 [2, 3], спектрофотометрическим методом изучено взаимодействие лизоцима с олигосахаридами в зависимости от pH и температуры [4] и методом микрокалориметрии связывание ингибиторов лизоцимом при различном pH и разной температуре [5]. Из результатов калориметрических измерений определены ΔH° , ΔG° и ΔS° процессов связывания. Термодинамические параметры, определенные микрокалориметрически [2, 3, 5] и спектрофотометрически [4], совпадают с точностью до 10%.

Бэнерджи и Рапли [4], используя принцип аддитивности, вычислили величины энтальпии связывания моносахаридных остатков с активным центром лизоцима [1]. Высокую энтальпию связывания на участке В активного центра фермента авторы объяснили наличием заряженной группы, которая взаимодействует с субстратом. Этот вывод был сделан без учета гидратационных и конформационных изменений, вносящих свой вклад в суммарный тепловой эффект комплексообразования.

В настоящей работе исследовано влияние pH и температуры на термодинамику реакций комплексообразования лизоцима с *N*-ацетил-*D*-глюкозамином (GlcNAc), *NN'*-диацетилхитобозой (GlcNAc)₂, *N, N', N''*-триацетилхитотриозой (GlcNAc)₃ — соответственно ингибиторы (I) — (III) — с целью изучения влияния этих условий на отдельные стадии образования

фермент-ингибиторного комплекса и для получения новой информации об активном центре лизоцима и его участках А, В, С.

Для определения константы ассоциации комплексов K_a и энтальпии реакции их образования ΔH° использовали общий подход, заключающийся в нахождении зависимости теплового эффекта реакции от концентрации ингибитора при постоянной концентрации лизоцима [2].

В конкретных условиях эксперимента для определения теплового эффекта взаимодействия из эффекта, зарегистрированного в опыте, вычитали найденные в отдельных измерениях тепловые эффекты смешивания и разбавления каждого из реагентов. Из концентрационной зависимости теплового эффекта взаимодействия определяли константу ассоциации K_a и энтальпию реакции ΔH° , а затем на основании известных уравнений термодинамики равновесных реакций

$$\Delta G^\circ = -RT \ln K_a, \quad (1)$$

$$\Delta G^\circ = \Delta H^\circ - T\Delta S^\circ \quad (2)$$

рассчитывали величины изменения свободной энергии ΔG° и энтропии ΔS° .

Теплота разбавления N-ацетилглюкозамина (10^{-1} М) и лизоцима (10^{-3} М) составила $10 \pm 0,7$ кал/моль и $-0,7 \pm 0,1$ ккал/моль соответственно. Для нахождения K_a и ΔH° обработку результатов измерений теплоты взаимодействия лизоцима с ингибитором (1) проводили по уравнению

$$\Delta Q (1 + K_a [I]_0) = K_a \cdot q \cdot [I]_0 [E]_0,$$

где ΔQ — тепловой эффект реакции, q — удельный тепловой эффект, равный $-\Delta H^\circ$. Результаты обрабатывали с помощью ЭВМ «Наири» методом наименьших квадратов.

При изучении взаимодействия N-ацетилглюкозамина с лизоцимом энтальпию для каждого значения рН и температуры находили из результатов нескольких серий опытов.

Максимальный разброс на кривой зависимости ΔH° взаимодействия ингибитора (I) с лизоцимом от рН наблюдался при рН 5,8.

При расчете теплового эффекта взаимодействия ингибиторов (II) и (III) с лизоцимом концентрацию фермент-ингибиторного комплекса $[E]$ для каждого значения рН и температуры находили по уравнению:

$$[E] = \frac{[1 + K_a ([I]_0 + [E]_0)] - \sqrt{[1 + K_a ([I]_0 + [E]_0)]^2 - 4K_a^2 [I]_0 [E]_0}}{2K_a}$$

При этом использовали начальные значения концентраций ингибитора и фермента и известные значения констант ассоциации [4]. Удельную теплоту реакции находили по выражению:

$$q = \Delta Q/[E].$$

При обработке результатов измерений вычисляли среднеквадратичную ошибку и находили границы доверительного интервала теплоты взаимодействий ингибитора (II) и (III) с лизоцимом, определяемых по данным нескольких серий опытов.

Энтальпии образования фермент-ингибиторных комплексов лизоцима при рН 4,5—7,3 и температурах 17, 25, 40° представлены на рис. 1 и в таблице.

Зависимость энтальпии ($-\Delta H^\circ$, ккал/моль) взаимодействия лизоцима с GlcNAc , $(\text{GlcNAc})_2$ и $(\text{GlcNAc})_3$ от pH при 17, 25 и 40° ($\mu = 0,1$)

pH	17°			25°	
	(I)	(II)	(III)	(I)	(II)
4,5	4,6±0,3	8,1±0,4	9,9±0,5	5,0±0,5	9,5±0,4
5,0	5,8±0,2	10,0±0,4	11,0±0,4	6,7±0,4	10,8±0,4
5,5	5,9±0,2	10,6±0,4	12,0±0,4	7,2±0,4	11,5±0,4
5,8	6,1±0,1	10,6±0,4	12,4±0,3	6,7±0,9	11,5±0,4
6,3	5,3±0,1	10,9±0,4	12,4±0,4	5,0±0,3	11,5±0,1
7,3	4,9±0,5	9,0±0,3	11,2±0,4	4,8±0,3	10,3±0,4

pH	25°	40°		
	(III)	(I)	(II)	(III)
4,5	11,3±0,4	5,2±0,8	11,9±0,6	14,1±1,0
5,0	13,0±0,4	6,9±0,4	12,1±0,3	14,2±0,7
5,5	13,2±0,4	6,9±0,4	12,2±0,4	14,2±0,2
5,8	13,2±0,1	7,1±0,8	12,2±0,3	14,2±0,4
6,3	13,2±0,4	5,6±0,3	12,2±0,4	14,2±0,4
7,3	12,7±0,4	4,7±0,1	12,2±0,4	14,1±0,2

В случае взаимодействия лизоцима с *N*-ацетил-*D*-глюкозамином энтальпия реакции комплексообразования мало зависит от температуры в области pH 4,5—5,5 и практически не зависит от температуры при pH 5,5—7,3. Энтальпии взаимодействия лизоцима с ингибиторами (II) и (III) зависят от температуры сходным образом при всех исследованных значениях pH. В тех случаях, когда полученные нами величины энтальпий реакций образования фермент-ингибиторных комплексов можно сравнить (при pH 5,0 и 7,3; 25°) со значениями, найденными другими авторами [2, 4, 5], следует отметить хорошее совпадение данных.

Из большого количества работ, посвященных механизму действия лизоцима, представленных в обзоре Имото и соавт. [1], известно, что ингибиторы (I) и (II) образуют непродуктивные комплексы и сорбируются на участках активного центра С и В-С соответственно. Ингибитор (III) способен к образованию как непродуктивного (фермент-ингибиторного), так и продуктивного (фермент-субстратного) комплексов [1]. Скорость распада продуктивного комплекса велика. Однако в наших условиях не наблюдалось сколько-нибудь заметного превращения *N*-ацетилированной хитотриозы под действием фермента. Это позволяет предположить, что доля образующегося продуктивного комплекса по сравнению с непродуктивным ничтожно мала и им можно пренебречь. Мы полагаем, что ингибитор (III) связывается в активном центре лизоцима исключительно с участками А-В-С.

Из результатов кристаллографических исследований фермент-ингибиторных комплексов лизоцима [1] следует, что при связывании ингибиторов в активном центре лизоцима в области pH 4,5—7,3 следует учитывать изменения ионизации остатков аспарагиновой и глутаминовой кислот в положениях, соответственно 101 и 35.

По нашим данным, зависимость энтальпий образования комплексов лизоцима с ингибитором (I) от pH аналогична при всех трех исследованных температурах, а в случае ингибиторов (II) и (III) только при температурах 17 и 25°. Этот факт свидетельствует о том, что при изменении температуры заметных изменений в окружении остатков глутаминовой-35 и аспарагиновой-101 кислот не происходит.

Образование фермент-ингибиторного комплекса является сложным многостадийным процессом. При этом все стадии реакции комплексообразования, независимо от их последовательности, можно в первом приближении объединить в три группы: образование новых связей в комплексе, изменения гидратации взаимодействующих веществ и конформационные изменения фермента. Ингибиторы (I), (II) и (III) конформационных изменений не претерпевают. Ранее нами [6] была сделана попытка оценить термодинамические параметры каждой из этих условных стадий и были получены следующие величины изменения энтальпий: $\Delta H_{\text{св}}^{\circ} = -2,3$ ккал/моль и $\Delta H_{\text{гидр}}^{\circ} = +0,7$ ккал/моль; энтропий: $\Delta S_{\text{св}}^{\circ} = -8,5$ э. е. и $\Delta S_{\text{гидр}}^{\circ} = +2,9$ э. е., где индексы св и гидр обозначают параметры, характеризующие соответственно процессы образования одной водородной связи и освобождение одной молекулы воды из гидратной оболочки (белка или ингибитора).

Бэннерджи и Рапли [4] нашли, что энтальпия образования одной водородной связи при связывании N-ацетилглюкозамина составляет $-1,5$ ккал/моль. Поскольку при этом не учитывались гидратационные и конформационные изменения, величину эту следует считать заниженной.

Из данных рентгеноструктурного анализа [1] следует, что ингибитор (I) при связывании на участке С образует 4 водородные связи и 30 неполярных связей, ингибитор (II) при связывании в участках В-С образует 5 водородных связей и 41 неполярную связь и ингибитор (III) при сорбции на участках активного центра А-В-С образует 6 водородных связей и 48 неполярных связей. В среднем на одну водородную связь приходится ~ 8 неполярных связей. При этом вклад процесса образования связей в энтальпию реакции (и аналогичным образом в энтропию реакции) можно оценить количественно. Однако разделить вклад энтальпии образования водородной связи и неполярных взаимодействий пока не представляется возможным. Поэтому величина $\Delta H_{\text{св}}^{\circ}$ включает энтальпию образования одной водородной связи и 8 неполярных связей.

Вклад дегидратационных изменений реагентов в энтальпию

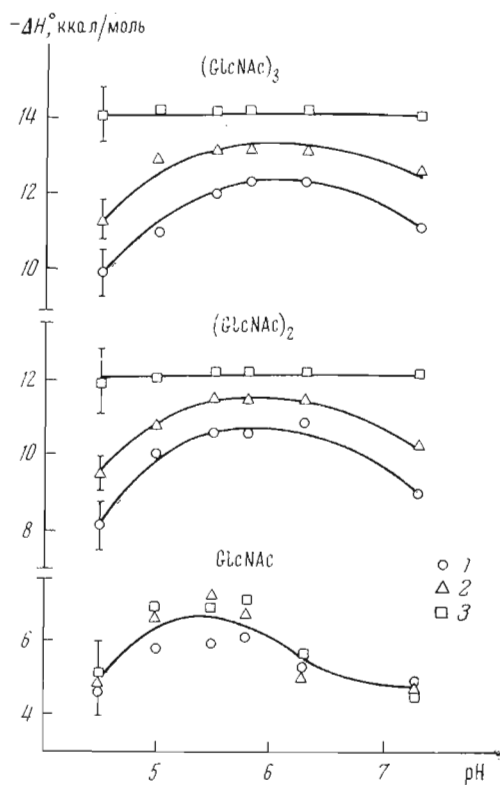


Рис. 1. Значения ΔH° взаимодействия лизоцима с GlcNAc, $(\text{GlcNAc})_2$ и $(\text{GlcNAc})_3$ в зависимости от pH при 17 (1), 25 (2) и 40° (3). Доверительный интервал, приведенный в точке с pH 4,5, распространяется на все другие значения pH

(и энтропию) реакций комплексообразования также поддается количественной оценке. При этом надо учесть, что при образовании комплекса из гидратной оболочки сахара освобождается вся связанная с гидроксильными и ацетамидной группами вода: в случае ингибитора (I) — 5 молекул, в случае ингибитора (II) — 8 молекул и в случае ингибитора (III) — 11 молекул воды. Из гидратной оболочки активного центра освобождается число мо-

лекулы воды, равное числу образующихся водородных связей (из участка С — 4, из участков В-С — 5, из участков А-В-С — 6 молекул). Эффект образования Н-связей вода — вода молекулами воды, вытесненной из фермента и субстрата, в настоящей работе отдельно не учитывается, так как это величина мала и входит в величину $\Delta H_{\text{гидр}}^{\circ}$. Энтальпии реакций комплексообразования определены из данных калориметрических измерений, величины энтропий рассчитаны по известному термодинамическому соотношению (2).

Таким образом, энтальпийные изменения, характеризующие взаимодействия фермента с ингибиторами (I) — (III), можно описать следующими уравнениями:

$$\Delta H_{\text{I}}^{\circ} = 4 \Delta H_{\text{св}}^{\circ} + 9 \Delta H_{\text{гидр}}^{\circ} + \Delta H_{\text{С}}^{\circ}, \quad (3)$$

$$\Delta H_{\text{II}}^{\circ} = 5 \Delta H_{\text{св}}^{\circ} + 13 \Delta H_{\text{гидр}}^{\circ} + \Delta H_{\text{В-С}}^{\circ}, \quad (4)$$

$$\Delta H_{\text{III}}^{\circ} = 6 \Delta H_{\text{св}}^{\circ} + 17 \Delta H_{\text{гидр}}^{\circ} + \Delta H_{\text{А-В-С}}^{\circ}, \quad (5)$$

где $\Delta H_{\text{I}}^{\circ}$, $\Delta H_{\text{II}}^{\circ}$ и $\Delta H_{\text{III}}^{\circ}$ — соответственно энтальпии образования комплексов лизоцима с ингибиторами (I), (II) и (III); $\Delta H_{\text{св}}^{\circ}$ — энтальпия образования одной водородной связи и 8 неполярных связей; $\Delta H_{\text{гидр}}^{\circ}$ —

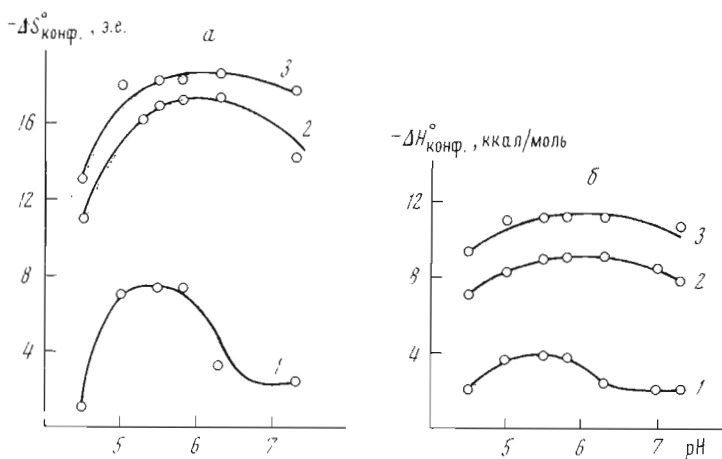


Рис. 2. Зависимость ΔS° (а) и ΔH° (б) конформационных переходов от рН при 25°: 1 — GlcNAc, 2 — (GlcNAc)₂, 3 — (GlcNAc)₃

удельная энтальпия освобождения связанной воды из гидратной оболочки белка (или сахара), $\Delta H_{\text{С}}^{\circ}$, $\Delta H_{\text{В-С}}^{\circ}$ и $\Delta H_{\text{А-В-С}}^{\circ}$ — соответственно энтальпии конформационных переходов в белке, сопровождающих взаимодействия на участках активного центра С, В-С, А-В-С.

Аналогичным образом можно описать энтропийные изменения, характеризующие взаимодействия фермента с ингибиторами (I) — (III). Независимость $\Delta H_{\text{св}}^{\circ}$, $\Delta S_{\text{св}}^{\circ}$, $\Delta H_{\text{гидр}}^{\circ}$ и $\Delta S_{\text{гидр}}^{\circ}$ от рН [6] позволяет вычислить энтальпии и энтропии конформационных переходов при рН 4,5—7,3 на основании уравнений (3) — (5).

Величины энтальпий и энтропий конформационных переходов, рассчитанные из аддитивности термодинамических параметров, представлены на рис. 2.

Зная эти параметры, можно оценить величины изменения свободной энергии при конформационных переходах лизоцима, которые практически не зависят от рН и равны $-1,5$ ккал/моль при взаимодействии на участке С; $-3,9$ ккал/моль на участках В-С и $-5,6$ ккал/моль на участках А-В-С. Это позволяет оценить изменения свободной энергии, характеризующие конформационные переходы на участках А, В и С при 25° , величинами $-1,7$; $-2,4$ и $-1,5$ ккал/моль соответственно.

Следует отметить, что в то время, как взаимодействие на участке С активного центра лизоцима сопровождается конформационными переходами, энтальпия и энтропия которых до известной степени зависят от рН среды, энтальпийные и энтропийные вклады участков А и В в области рН $4,5-6,0$ остаются постоянными.

Оценка этих вкладов, произведенная путем учета разности между соответствующими параметрами, приводит к следующим величинам: конформационные изменения на участке В характеризуются энтальпией $-5,0$ ккал/моль и энтропией $-10,0$ э. е., а конформационные изменения на участке А характеризуются энтальпией $-2,4$ ккал/моль и энтропией $-2,2$ э. е.

Таким образом, однотипный характер всех рассмотренных зависимостей термодинамических параметров от рН, по-видимому, можно объяснить тем, что главную роль в комплексообразовании играет взаимодействие на участке С.

Кроме того, следует отметить, что для зависимостей энтальпийных и энтропийных вкладов от рН характерно наличие максимума при рН $5,5$ и ионной силе $0,1$, что соответствует ранее полученным данным [4]. Очевидно, при рН $5,5$ и ионной силе $0,1$ фермент в целом и его активный центр в особенности характеризуется наибольшей конформационной подвижностью.

Нами получено максимальное значение энтальпии конформационного изменения при связывании сахарного остатка на участке В, равное $-5,0$ ккал/моль. Из этого можно сделать вывод, что энтальпия конформационных изменений дает основной вклад в суммарную энтальпию взаимодействия в участке В. О высокой конформационной подвижности участка В свидетельствует также тот факт, что на этом участке изменение свободной энергии конформационных переходов максимально ($-2,4$ ккал/моль).

На основе аддитивности термодинамических параметров можно оценить энтальпийный вклад участков А, В и С при всех исследуемых рН и температурах. Оказалось, что при всех исследованных температурах энтальпия взаимодействия в участках С и В зависит от рН, а в участке А не зависит.

Следует также отметить, что от температуры при всех значениях рН зависит лишь энтальпия взаимодействия в участке В. Поскольку основной вклад в эту величину вносит энтальпия конформационных изменений, то именно на них температура оказывает наибольшее влияние (рис. 1).

Таким образом, предложенный в работе подход позволяет оценить термодинамические параметры отдельных стадий реакций комплексообразования с участием биополимеров, включая не только образование водородных связей и дегидратацию, но и стадию конформационных изменений реагентов.

Экспериментальная часть

В работе использовали лизоцим белка куриных яиц (КФ 3.2.1.17) производства Олайнского завода химических реактивов. Дополнительную очистку лизоцима проводили методом гель-хроматографии на биогелях Р-30 и Р-2. Сефадексы не использовали, так как в $0,1$ М уксусной кис-

лоте происходит гидролиз носителя и, возможно, загрязнение фермента олигосахаридами глюкозы. Очистка ферментов на биогелях в свою очередь затруднена из-за повышенного сродства лизоцима к гелю. Это приводит к сильному разбавлению лизоцима в элюате и частичной необратимой сорбции его на геле. От примесей высокомолекулярных белков, содержание которых в исходном препарате не превышает 1,5%, освобождались одноразовым пропусканием 16 г фермента через колонку с биогелем Р-30 объемом 2700 мл. Выход 75%. Обессоливание проводили на колонке с биогелем Р-2 объемом 7000 мл; выход белка — 75%.

Сравнение результатов измерений теплоты взаимодействий N,N'-диацетилхитобиозы с очищенным и неочищенным лизоцимом при пяти значениях pH дало в среднем расхождение в 1%.

В дальнейшем, учитывая сложность очистки и близкие значения энтальпий взаимодействия ингибитора (II) с очищенным и исходным препаратом, лизоцим использовали без дополнительной очистки. Чистоту лизоцима проверяли методом электрофореза в акриламидном геле (8% акриламида, pH 8,6). Активность лизоцима определяли турбидиметрическим методом, как описано ранее [7]. Концентрация белка, определенная спектрофотометрически [4], во всех сериях измерений составляла 10^{-3} М. Значение pH исследуемых растворов контролировали с помощью рН-метра ОР-207 (Венгрия). Использовали N-ацетилглюкозамин, полученный двукратной перекристаллизацией препарата марки «ч» Войковского завода химических реактивов. N,N'-Диацетилхитобиозу и N,N',N''-триацетилхитотриозу получили кислотным гидролизом хитина [8]. Значения констант ингибирования температур плавления и углов вращения ингибиторов (I)—(III) соответствуют литературным данным. Растворы ингибиторов готовили не менее чем за 4 ч до начала опытов. В специальных опытах было показано, что этого времени достаточно для завершения мутаротации.

Концентрацию ингибиторов в каждой отдельной серии опытов варьировали в интервалах: (I)— 10^{-1} — 10^{-2} М; (II)— $2 \cdot 10^{-2}$ — $3 \cdot 10^{-4}$ М; (III)— $4 \cdot 10^{-3}$ — $2,5 \cdot 10^{-4}$ М. Отдельная серия означает исследование концентрационной зависимости теплового эффекта взаимодействия ингибиторов с ферментом при определенном pH и температуре. В опытах использовали ацетатные (pH 4,5—5,8) и фосфатные (pH 5,8—7,3) буферные растворы с полной силой 0,1.

Калориметрические измерения проводили в проточном калориметре фирмы «LKВ-producter» (Швеция), модель 10700-1 при суммарной скорости подачи реагентов $1,5 \cdot 10^{-2}$ мл/с.

ЛИТЕРАТУРА

1. Imoto T., Johnson L. N., North A. C. T., Phillips D. C., Rupley J. A. (1972) in *The Enzymes* (Boyer P. D., ed.) 3rd Ed., vol. 7, p. 665—868, Academic Press, N. Y.
2. Bjurulf C., Laynez J., Wadso J. (1970) *Eur. J. Biochem.*, **14**, 47—52.
3. Stasiw R. O., Zaun J. W., Patel A. B. (1973) *Int. J. Peptide Protein. Res.*, **5**, 11—17.
4. Banergee S. K., Rupley J. A. (1973) *J. Biol. Chem.*, **248**, 2117—2124.
5. Bjurulf C., Wadso J. (1972) *Eur. J. Biochem.*, **31**, 95—102.
6. Заславский Б. Ю., Вичутинский А. А., Хорлин А. Я. (1972) *Биофизика*, **17**, 385—389.
7. Шашкова Е. А., Виха И. В., Вичутинский А. А., Хорлин А. Я. (1970) *Биохимия*, **35**, 124—131.
8. Rupley J. (1964) *Biochem. et biophys. acta*, **83**, 245—255.

Поступила в редакцию
26.XII.1974

MICROCALORIMETRY STUDY OF TEMPERATURE
AND pH EFFECTS ON THERMODYNAMICS OF COMPLEX
FORMATION BETWEEN LYSOZYME AND OLIGOSACCHARIDES

SHASHKOVA E. A., VICHUTINSKY A. A., ZASLAVSKY B. Yu.,
USUBALIEVA L. P., KHORLIN A. Ya., SHULMAN M. L.

*M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry,
Academy of Sciences of the USSR, Moscow*

Complex formation of the egg white lysozyme with GlcNAc, (GlcNAc)₂ and (GlcNAc)₃ (17, 25, 40° C, pH 4,5—7,3) has been studied by microcalorimetry method. The equilibrium constant and enthalpy of binding were determined in the above pH and temperature range. A mechanism was proposed which involves the formation of hydrogen bonds in the complex, dehydration of reagents and conformational changes of the biopolymer. Thermodynamic parameters (ΔG° , ΔH° , ΔS°) were calculated for every stage of lysozyme binding to saccharides, based on the additivity principle and the available literature data on the number of hydrogen bonds in the complex.
