

## ПОЛИЭЛЕКТРОЛИТ-БЕЛКОВЫЙ КОМПЛЕКС. ВЛИЯНИЕ ПОЛИАЛЛИЛАМИНА НА СТРУКТУРУ И ФУНКЦИИ УРЕАЗЫ

Дурденко Е. В., Дыбовская Ю. Н., Тихоненко С. А., Сабурова Е. А.

*Изучено влияние полиэлектролита полиаллиамина на структуру и каталитические характеристики уреазы (*Canavalia ensiformis*) методами стационарной кинетики, флуоресцентной спектроскопии и спектроскопии кругового дихроизма. Показано, что данный полиэлектролит является сильным ингибитором уреазы (при концентрации ПАА 0,5 мкг/мл фермент заингибирован на 50% при нейтральных значениях рН). Предложен механизм ингибирования уреазы полиэлектролитом, в котором основную роль играют специфические катион-связывающие сайты на молекуле уреазы, определяющие структурную динамику комплекса фермент-полиэлектролит.*

**Введение.** Изучение свойств полиэлектролит-белковых комплексов (ПБК) необходимо как для понимания функциональной роли эндогенных полиэлектролитов, так и для понимания механизма катализа, в ряде случаев достаточно сложного для отдельных ферментов.

Понимание физико-химических процессов образования полиэлектролит-белковых комплексов затрагивает в частности множество медицинских аспектов. Так в кровеносном русле отрицательно заряженный сульфатированный полисахарид гепарин образует с тромбогенными белками и гормонами комплексы, обладающие антикоагулянтным и неферментным фибринолитическим действием (Bernfield et al., 1999). Положительно заряженный полиэлектролит пептидной природы изменяет (Himmel et al., 2002) способность к адгезии эритроцитов. Кроме того, изучение функции полиэлектролит-белковых комплексов особенно важно для понимания таких медицинских аспектов как гастрит, язва желудка и двенадцатиперстной кишки, причиной которых является размножение и выживание бактерий *Helicobacter pylori* за счет экзогенной уреазы, которую бактерия выделяет во внутреннюю среду млекопитающих. Функционирование этого фермента в комплексе с клеточными стенками бактерий, а также с внутренними мембранами клеток млекопитающих и другими эндогенными полиэлектролитами, сопровождается

ся нарушением солевого баланса в среде, и в частности изменением содержания аммония, который является продуктом реакции расщепления мочевины, катализируемой уреазой.

Уреаза — гомогексамер с двумя атомами никеля в каждом активном центре и молекулярным весом около 540 кД. Несмотря на то, что уреаза — фермент, детально изученный в разных агрегатных состояниях — в растворе и в кристалле, совокупностью большого числа методов: спектральных (Bhowmick and Jagannadham, 2006), кинетических (Muirgooney, 2001) и, наконец, рентгеноструктурных с высоким разрешением (бактериальная уреаза) (Hausinger and Karplus, 2001), остаются важные нерешенные вопросы, касающиеся функционирования его в комплексе с высокомолекулярными компонентами клетки. Отсюда понятно большое значение изучения условий образования и свойств комплексов уреазы с полиэлектролитами, в той или иной степени моделирующими структурные компоненты клеток.

К настоящему моменту детально изучены для некоторых ферментов очень важные характеристики — константы сродства их с полиэлектролитами (Kaibara et al., 1995), однако очень мало известно о влиянии комплексообразования на ферментативные и конформационные свойства самого фермента.

Настоящая работа посвящена экспериментальному и теоретическому изучению механизма взаимодействия катионного гомополиэлектролита полиаллиламингидрохлорида (ПАА) с гексамерным ферментом уреазой из *Canavalia ensiformis*.

**Материалы и методы.** Реактивы. Уреазу (Jack bean, *Canavalia ensiformis*, EC.3.5.1.5,) использовали фирмы «Fluka», №94285 с активностью = 97,0 U/mg. Полистиролсульфонат натрия (ПСС, 70 кДа), полидиаллилдиметиламмонийхлорид (ПДАДМАХ, 70 кДа) и полиаллиламин (ПАА, 70 кДа) использованы фирмы «Aldrich» (Germany). Декстрансульфат (ДС, 10 кДа) и этилендиаминтетрауксусную кислоту (EDTA) использовали фирмы «Sigma» (Germany).

Концентрацию уреазы в растворенном состоянии определяли спектрофотометрически, используя коэффициент экстинкции:  $E_{280\text{ нм}}^{1\text{ мг/мл}} = 0,62$  для уреазы, рассчитанный по аминокислотной последовательности, полученной из банка «SwissProt» [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>], используя программу «Swiss-model»; [www.expasy.org/swissmod/swiss-model.html](http://www.expasy.org/swissmod/swiss-model.html).

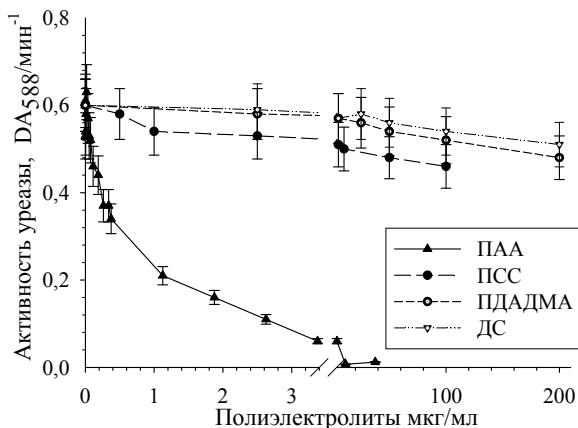
Активность уреазы определяли по расщеплению мочевины, используя рН-чувствительный краситель — бромкрезол фиолетовый. Реакционная смесь содержала: необходимое количество мочевины, полиэлектролитов, 0,030 мМ бромкрезола при 20°C. К 2 мл такого раствора добавляли 20 мкл раствора уреазы и далее регистрировали кинетику по изменению оптического поглощения красителя при 588 нм. Для определения активности уреазы все растворы — белка, полиэлектролитов, мочевины и красителя были предварительно дотитрованы концентрированным раствором NaOH до рН 6.2 с точностью  $\pm 0,05$  ед. рН.

Активность уреазы регистрировали по изменению оптической плотности в полосе поглощения красителя на спектрофотометре Specord M-40 («Carl Zeiss», ГДР).

Спектры кругового дихроизма (КД) уреазы свободной и в присутствии ПАА получали на спектрополяриметре JASCO J-500A (Япония). Измерения КД в дальней УФ-области проводили в кюветах с длиной оптического пути 1 мм, а в ближней УФ-области — 10 мм. Концентрация белка в исследуемых растворах составляла 0,1 мг/мл. Спектры флуоресценции растворов фермента с полиэлектролитом снимали на спектрофлуориметре Cary Eclipse в кюветах с длиной оптического пути 10 мм. Все спектроскопические измерения растворов уреазы с полиэлектролитами были выполнены при 20° С в воде рН 6,2 в кюветах с циркулирующим водяным охлаждением и контролем температуры в кювете после смешивания с полиэлектролитом, за исключением экспериментов, где особо отмечено время регистрации.

### **Результаты эксперимента.**

*Влияние полиэлектролитов на активность уреазы.* На рис. 1 показана зависимость активности уреазы от содержания полиэлектролитов, отличающихся по знаку заряда и структуре мономера. Видно, что из всех исследованных полиэлектролитов активность уреазы падает в присутствии катионного полиэлектролита — полиаллиламингидрохлорида (ПАА) уже при концентрациях последнего около 0,5 мкг/мл (50 % активности). Другой также положительно заряженный полиэлектролит ПДАДМАХ, но с ионогенным четвертичным амином в основной цепи не снижал активности уреазы вплоть до концентрации 200 мкг/мл.



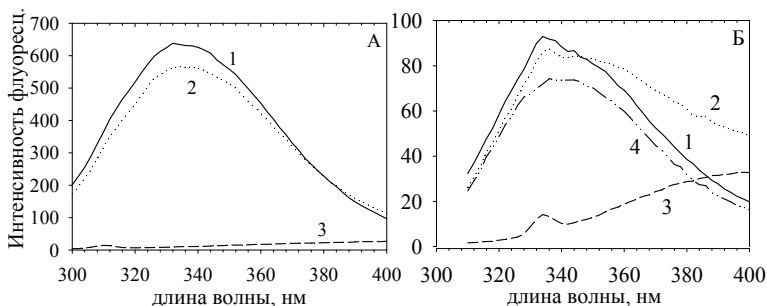
**Рис. 1.** Зависимость активности уреазы от концентрации полиэлектролитов: полистиролсульфоната (ПСС), декстрансульфата (ДС), полиаллиламина (ПAA) и полидиаллилдиметиламмонийхлорида (ПДАДМА). Уреаза — 0,12 мкг/мл, мочевины 125 мМ, бромкрезол — 30 мкМ, рН — 6,2.

Исследование анионных полиэлектролитов полистиролсульфоната (ПСС) на активность уреазы показало, что фермент сохраняет большую часть своей активности — 95 %, при концентрации ПСС 200 мкг/мл. Те же результаты получены для другого анионного полиэлектролита с той же ионогенной группой, но имеющего полярный сахарный остов декстрансульфата ДС. Таким образом, из исследованных 4-х полиэлектролитов наибольший ингибиторный эффект вызвал полиэлектролит ПAA, имеющий гидрофобный остов с положительно заряженной ионогенной группой в боковой цепи (рис. 1), а отрицательно заряженные полиэлектролиты — ПСС и ДС практически не снижали ферментативной активности уреазы во всем измеренном диапазоне концентраций. Эксперименты, представленные на рис. 1, были проведены в условиях насыщения фермента по субстрату — мочедине (125 мМ) в точке рН 6,2, близкой к изоэлектрической точке уреазы ( $pI = 5,99$ ).

Для того чтобы определить, вызывают ли полиэлектролиты изменения конформации ферментов, мы изучили влияние полиэлектролитов

на структурные характеристики этих белков методами собственной флуоресценции белка и кругового дихроизма.

*Влияние полиэлектролита ПАА на флуоресценцию фермента.* Для исследования влияния полиэлектролита на структуру белка и величину  $V_{\max}$  были получены спектры белковой флуоресценции при возбуждении флуоресценции при двух длинах волн: при 280 нм, где поглощают все ароматические аминокислоты с соответствующими вкладами, и при 300 нм, где поглощают только триптофаны (Trp). К сожалению, молекула Jack bean уреазы имеет всего лишь 4 триптофановых остатка на 840 остатков в составе одной субъединицы. Столь низкое число остатков Trp хотя позволяет более точно локализовать изменения структуры белка, но затрудняет выявить тонкие изменения третичной структуры молекулы белка из-за низкой интенсивности сигнала, а также имеет представление об отдаленных от триптофана участках структуры. На рис. 2 представлены спектры флуоресценции свободного фермента, полиэлектролита ПАА в  $H_2O$  и фермента в присутствии ПАА при двух длинах волны возбуждения. При длине волны возбуждения 280 нм (рис. 2А) интенсивность флуоресценции белка в присутствии ПАА слегка (на 10 %), уменьшается, но максимум спектра флуоресценции сохраняется при 334 нм. При возбуждении на 300 нм (рис. 2Б) в связи со слабым сигналом белка значительный вклад в спектр флуоресценции комплекса дают ПАА с  $\lambda_{\max}$  выше 400 нм и вода с  $\lambda_{\max}$  334 нм. Кривая 4 на рис. 2Б представляет собой разностный спектр комплекса уреазы с ПАА и чистого ПАА. Если сравнить его со спектром свободного фермента (кривая 1 рис. 2Б), то можно видеть, что максимум флуоресценции уреазы при добавлении ПАА остается при 340 нм, но интенсивность флуоресценции фермента уменьшается, хотя и незначительно — наибольшие изменения составляют около 16 % от интенсивности флуоресценции свободного белка в максимуме излучения. Таким образом, каких-либо глобальных изменений окружения ароматических аминокислотных остатков в белке при связывании с ПАА не происходит.



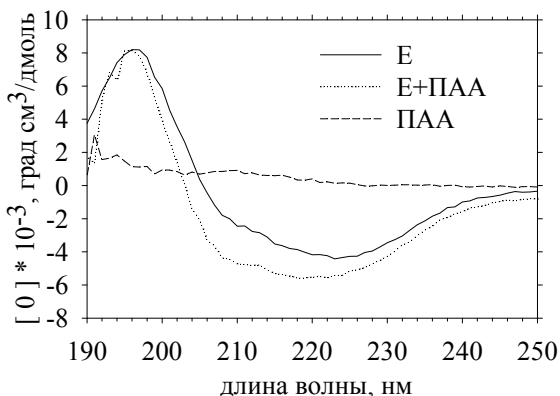
**Рис. 2.** Спектры флуоресценции свободной уреазы (1), в комплексе с полиаллиламином (2) и свободного полиаллиламина (3). Длина волны возбуждения 280 нм (А) и 300 нм (Б). Кривая (4) на рис. Б — разностный спектр между комплексом (2) и свободным полиэлектролитом (3). Уреазы — 0,12 мг/мл, ПАА — 7,5 мг/мл.

*Изучение параметров структуры уреазы в присутствии полиэлектролита ПАА методом кругового дихроизма.* Структурные изменения уреазы при взаимодействии с полиэлектролитом были изучены как в ближней УФ-области (поглощение ароматических аминокислотных остатков), так и в дальней УФ-области (поглощение пептидных групп). Измерение кругового дихроизма свободной уреазы и уреазы в комплексе с ПАА в ближней УФ-области не дало заметного пика в спектре КД в указанных условиях регистрации. Действительно, уреазы имеет крайне низкое содержание ароматических аминокислотных остатков, так Trp — 0,5 %, Tyr — 2,5 % и Phe — 2,8 %, и кроме того, по всей видимости окружение этих остатков имеет пространственную симметрию, что снижает эллиптичность в полосах поглощения в ближнем ультрафиолете. Низкое содержание ароматических аминокислотных остатков в уреазе сказывается также на интенсивности оптического поглощения при 280 нм, где обычно измеряется концентрация белка (см. «Методы»).

На рис. 3 приведены спектры КД в дальней ультрафиолетовой области комплекса уреазы с полиэлектролитом в полосах поглощения пептидных групп. Как видно, эллиптичность комплекса незначительно растет в обеих полосах КД-спектра — 209 и 222 нм, соответствующих  $\pi \rightarrow \pi^*$  и  $n \rightarrow \pi^*$  переходам пептидных групп соответственно. Интенсив-

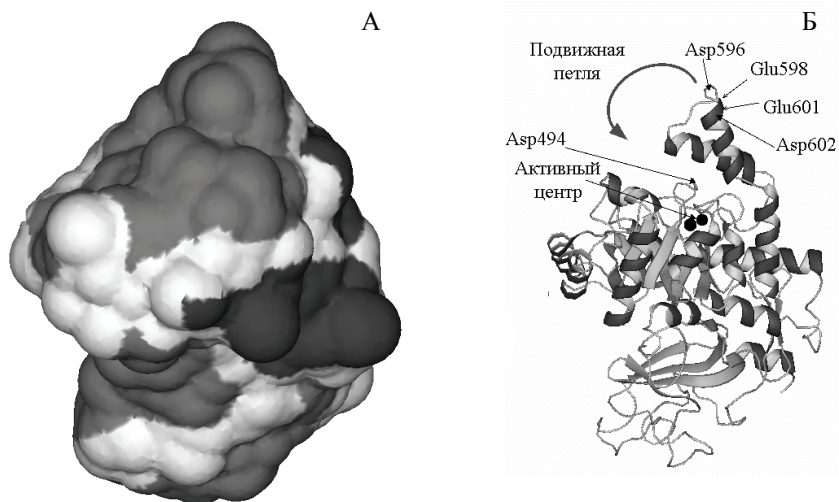
ность коротковолновой полосы изменяется слабее, чем длинноволновой, возможно в результате частичного разрушения  $\beta$ -структуры, имеющей положительный максимум эллиптичности около 200 нм (Woody, 1995). Увеличение амплитуды отрицательного пика при 222 нм (для уреазы с ПАА на 27% ), мы полагаем, связано не обязательно с увеличением  $\alpha$ -спиральной структуры на 27 %, а частично с тем, что в комплексе белка с полиэлектролитом спиральные сегменты попадают в среду с низкой диэлектрической постоянной, изменяющую дипольные и магнитные моменты для  $\pi \rightarrow \pi^*$  и  $n \rightarrow \pi^*$  переходов в полосах поглощения пептидной связи. Увеличение эллиптичности полосы при 222 нм и в большей степени при 209 нм наблюдается во многих белках в органических растворителях и часто не связано с увеличением  $\alpha$ -спиральной структуры (Badu and Douglas, 2000).

Из приведенных данных видно, что связывание уреазы с полиэлектролитом по крайней мере не разрушает  $\alpha$ -спиральную структуру так, как ранее нами было показано для других полиэлектролит-белковых комплексов (Сабурова и др., 2000; 2006), а напротив, увеличивает вращательную силу переходов в полосах поглощения пептидных связей, образующих  $\alpha$ -спиральную структуру.



**Рис.3.** Спектры КД в дальней УФ-области уреазы свободной и в присутствии положительно заряженного полиэлектролита ПАА. Концентрация ПАА — 7,5 мг/мл; уреазы — 0,12 мг/мл; рН — 6,2. В качестве контроля представлен КД-спектр ПАА в  $H_2O$ . Длина оптического пути 1 мм.

Возникает вопрос: почему полиэлектролит является сильным ингибитором уреазы, притом, что структура уреазы сохраняется в комплексе с ПАА практически нативной.



**Рис. 4.** А — Распределение электростатического потенциала на расстоянии  $5,5 \text{ \AA}$  от Ван-дер-Ваальсовых радиусов на поверхности Jack bean уреазы. Поля со значением потенциала  $> +0,5 \text{ кТ/е}$  — черный цвет; в интервале  $[-0,5; +0,5] \text{ кТ/е}$  — белый и  $< -0,5 \text{ кТ/е}$  — серый. Б — Структура Jack bean уреазы (ленточная диаграмма), построенная по аминокислотной идентичности с *Bacillus pasteurii* уреазой 4ubpC.pdb; X-ray  $1,55 \text{ \AA}$ ; идентичность составляет 58,1 %, приведены от 274 до 840 аминокислотных остатков.

*Расчет распределения электростатического потенциала (РЭП) на поверхности белка.* К настоящему времени отсутствуют рентгеноструктурные данные для исследуемой нами растительной уреазы *Canavalia ensiformis* (иначе Jack bean уреазы), трех мерные структуры, выполненные с высоким разрешением для уреаз из бактерий, показывают чрезвычайно высокую гомологию по аминокислотной последовательности и сходство по пространственной структуре, а также высокую



консервативность активного центра. Данные о структуре бактериальных уреаз были использованы нами для получения модельной структуры исследуемой Jack bean уреазы. На основе построения расчетной структуры уреазы из *Canavalia ensiformis* исходя, из идентичности аминокислотной последовательности с уреазой из *Bacillus pasteurii* были произведены расчеты РЭП на поверхности белка (рис. 4).

**Обсуждение результатов.** Приведенные экспериментальные данные по взаимодействию уреазы с полиэлектролитами показывают, что уреазы, также как и изученные нами ранее ферменты лактатдегидрогеназа (ЛДГ), глутаматдегидрогеназа (ГДГ), а также гемоглобин (Hb) и миоглобин (Mb), повреждаются полиэлектролитом с той лишь разницей, что уреазы ингибируются поликатионом ПАА, а ЛДГ, ГДГ, Hb и Mb, полианионами — ПСС, полифосфатом и другими полианионами. Следует отметить, что и ЛДГ, и уреазы ингибируются очень малыми концентрациями полиэлектролита: 50 % ингибирование наступает при весовом соотношении фермент / полиэлектролит, равном 0,5 мкг/мл / 0,25 мкг/мл для уреазы и 0,5 мкг/мл / 0,4 мкг/мл для ЛДГ.

Уреазы из разных источников, в том числе и Jack bean уреазы, имеют высокую консервативность конфигурации активного центра и, как и бактериальные уреазы, имеют аналогичную подвижную петлю в активном центре — для *Klebsiella aerogenes* уреазы (1FWJ) это остатки 317–334, которые закрывают активный центр фермента после связывания субстрата (Jabri et al., 2001). Возможно, что полиэлектролит, связываясь с белком, препятствует движению этой петли, как это происходит, например, в кристалле, где активность уреазы на несколько порядков величины ниже, чем в растворе. Появление продукта реакции в виде ионов аммония уже при концентрации 2 мМ, и связывание их в катион-связывающих сайтах уреазы, возможно, обеспечивают подвижность этой петли, заторможенную полиэлектролитом. Для того чтобы проверить эти предположения, необходимы дальнейшие исследования наличия катион-связывающих центров на уреазе и их роли в катализе.

Что касается структуры уреазы, то из наших данных следует, что связывание ПАА к ферменту не приводит к каким-либо значительным нарушениям третичной структуры, которые бы вызывали тушение триптофановых остатков Jack bean уреазы. Jack bean уреазы содержит 4 Trp на 840 аминокислотных остатков одной субъединицы, из которых Trp 648 и Trp 492 могут быть идентифицированы на 3D структуре, по-

строенной нами по сходству ее последовательности с *Bacillus pasteurii* уреазой, для которой 3D структура определена с высоким разрешением (1,55 Å). Для построения 3D структуры Jack bean уреазы была использована программа «Swiss-model»; [www.exPASy.org/swissmod/swiss-model.html](http://www.exPASy.org/swissmod/swiss-model.html) (см. рис. 4Б). Трп 648 находится внутри глобулы и плотно контактирует с двумя близко расположенными  $\alpha$ -спиральными участками. Обычно такие спаренные участки длинных  $\alpha$ -спиралей стабильны к разрушающим воздействиям различной природы. Второй триптофан, Трп 492, расположен близко к поверхности молекулы белка и более доступен к различным изменениям в растворе. Вполне вероятно, что именно он ответственен за тушение флуоресценции при связывании ПАА. Возбуждение флуоресценции на 280 нм, где могут давать вклад в эмиссию другие ароматические аминокислотные остатки, также не проявило значительных изменений — тушение флуоресценции в присутствии ПАА было не более 10 %.

На рис. 4Б приведена ленточная диаграмма Jack bean уреазы, где сферами выделены два атома никеля и, также как в уреазах из *Klebsiella aerogenes* (1FWJ) (Jabri et al., 1995) и *Bacillus pasteurii* (4UBP), лигандами их являются His 407, His 409, His 519, His 545 и Asp 633 (нумерация дана для Jack bean уреазы). Lys 490 в уреазе, модифицированный карбамоилированием, связывается своими карбоксильными кислородами с каждым из атомов никеля. По аналогии с бактериальными уреазами, Asp 494 должен фиксировать положение His 492, который находится на подвижной петле и непосредственно участвует в катализе (расстояние между кислородом O<sub>D</sub> остатка Asp 494 и азотом N<sub>D</sub> остатка His 492 равно 3,53 Å). Отсюда видно, что в активном центре Jack bean уреазы имеются участвующие в катализе отрицательно заряженные группы, которые могут быть сайтами для связывания катионов солей, в частности аммония, от которых, как следует из приведенных экспериментальных данных, зависит активность фермента в комплексе с полиэлектролитом.

Данные флуоресцентного анализа связывания ПАА с уреазой совместно с результатами изучения КД в дальнем ультрафиолете, а именно — сохранение  $\alpha$ -спиральной структуры уреазы в комплексе с полиэлектролитом свидетельствует о том, что связывание ПАА, хотя и сопровождается полной потерей активности фермента при больших концентрациях полиэлектролита (рис. 1), не производит значительных изменений структуры уреазы. При одинаковом количестве электростати-

ческих контактов полиэлектролита с поверхностью белка тем труднее разрушить его структуру, чем больше объем молекулы белка (низкое отношение поверхности к объему в белке) и соответственно больше число гидрофобных контактов внутри белка, удерживающих его нативную структуру. Это является одним из важных факторов, определяющих меньшую скорость разрушения крупных белков по сравнению с более мелкими, аналогично тому, как это наблюдалось при разрушении полиэлектролитом Hb и Mb (Сабурова и др., 2006).

Таким образом, из приведенных примеров видно насколько важно изучение структурных и функциональных характеристик белков в комплексах с эндогенными и синтетическими полиэлектролитами для понимания их роли в клетке. Полифункциональность ферментов, которая в последнее время демонстрируется на все больших классах белков, предполагает не только выполнение ими известных каталитических функций, но и определенную роль при связывании с эндогенными полиэлектролитами, такими как полифосфаты в условиях солевого, теплового и кислотного стрессов, а также ядерными гистонами в процессе апоптоза раковых клеток и во многих других биологических процессах. Ранее упоминаемая нами способность уреазы вызывать в определенных условиях агрегацию тромбоцитов крови (Follmer et al., 2001; 2004) возможна при полном отсутствии уреалитической активности. Обратное действие на свертываемость крови оказывает гепарин, синтетический аналог которого, декстрансульфат, как показано в этой работе, не влияет на максимальную скорость ферментативной реакции, катализируемой уреазой. Результаты исследования взаимодействия уреазы с различными по структуре полиэлектролитами, полученные в настоящей работе, могут быть полезны для понимания природы этих процессов и направленного воздействия на них как при решении некоторых сельскохозяйственных проблем — защиты растений от насекомых, так и для медицинских приложений.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Сабурова Е.А., Басова Л.В., Дыбовская Ю.Н., Сухоруков Б.И. Влияние полистиролсульфоната на структуру гембелков // *Журнал Физ. Химии.* — 2006. — Т. 80, №8. — С. 1503–1514.
- Сабурова Е.А., Бобрешиова М.Е., Елфимова Л.И., Сухоруков Б.И. Ингибиторное действие полиэлектролитов на олигомерные ферменты // *Биохимия.* — 2000. — Т. 65, №8. — С. 976–985.
- Bernfield M., Gotte M., Park P.W., Reizes O., Fitzgerald ML, Lincecum J, Zako M. Functions of cell surface heparan sulfate proteoglycans // *Annu Rev Biochem.* — 1999. — Vol. 68. — P. 729–777.
- Himmel H.M., Pietsch M., Streller U., Graf E.M., Ravens U. Changes in morphology and inward rectifier currents in human atrial myocytes depend on culture conditions // *Basic Res Cardiol.* — 2002. — Vol. 97, no. 6. — P. 434–44.
- Babu K.R., Douglas D.J. Changes in morphology and inward rectifier currents in human atrial myocytes depend on culture conditions // *Biochemistry.* — 2000. — Vol. 39, no. 47. — P. 14702–14710.
- Bhowmick R., Jagannadham M.V. Multiple Intermediate Conformations of Jack Bean Urease at Low pH: Anion-induced Refolding // *Protein J.* — 2006. — Vol. 25, no. 6. — P. 399–410.
- Follmer C., Real-Guerra R., Wasserman Olivera-Severo D., Carlini C.R. Jackbean, soybean and *Bacillus pasteurii* ureases: biological effects unrelated to ureolytic activity // *Eur.J. Biochem.* — 2004. — Vol. 271. — P. 1357–1363.
- Follmer C., Barcellos G.B, Zingali R.B., Machado O.L., Alves E.W., Barja-Fidalgo C., Guimarães J.A., Carlini C.R. Canatoxin, a toxic protein from jack beans (*Canavalia ensiformis*), is a variant form of urease (EC 3.5.1.5): biological effects of urease independent of its ureolytic activity // *Biochem. J.* — 2001. — Vol. 360. — P. 217–224.
- Hausinger R.P., and Karplus P.A. in Handbook of Metalloproteins (Wieghardt, K., Huber R., Poulos T.L. and Messerschmid A.). — U.K.: Wiley & Sons, Ltd., West Sussex. — P. 867–879.
- Jabri E., Carr M.B., Hausinger R.P., Karplus P.A. The Crystal Structure of Urease from *Klebsiella Aerogenes* // *Science.* — 1995. — Vol. 268. — P. 998–1004.
- Kaibara K, Okazaki T, Bohidar HB, Dubin PL. pH-Induced Coacervation in Complexes of Bovine Serum Albumin and Cationic Polyelectrolytes // *Biomacromolecules.* — 2000. — Vol. 1. — P. 100–107.
- Mulrooney S. Conformational dynamics of *E. coli* thioredoxin reductase: identification of two catalytically important states by ultra-fast flavin fluorescence spectroscopy // *Archiv. Biochem Biophys.* — 2001. — Vol. 394. — P. 280–282.
- Woody R.W. Circular Dichroism // *Methods in Enzymology.* — 1995. — Vol. 246. — P. 45.

**POLYELECTROLYTE-PROTEIN COMPLEX. POLYALLYLAMIN  
INFLUENCE ON STRUCTURE AND FUNCTIONS OF UREASE**

**Durdenko E. V., Dybovskaya Yu. N., Tichonenko S. A., Saburova E. A.**

*Influence of polyelectrolyte polyallylamine (PAH) on structure and catalytic characteristics of urease (Canavalia ensiformis) by methods steady-state kinetics, fluorescence and circular dichroism spectroscopy is studied. It is shown that this polyelectrolyte is strong inhibitor of urease (50 % inhibition of enzyme with concentration PAH of 0,5 mkg/ml at neutral values pH). It is assumed regulatory role specific cation-binding sites on a molecule urease, defining structural dynamics a complex enzyme-polyelectrolyte.*