

ВЫСОКОМОЛЕКУЛЯРНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ

Том (A) XVIII

№ 2

1976

УДК 541.64 : 577.15

ИССЛЕДОВАНИЕ ПОЛИМЕРНЫХ КОМПЛЕКСОВ ПАНКРЕАТИЧЕСКОЙ РИБОНУКЛЕАЗЫ С ДЕКСТРАНСУЛЬФАТАМИ

Н. В. Глазова, Р. Б. Пономарева, Г. В. Самсонов

Исследование межмолекулярного взаимодействия панкреатической рибонуклеазы (РНКазы) с декстрансульфатами (ДС) различной молекулярной массы и различным числом сульфогрупп проводили методом изучения кинетики диффузии через пористые мембранны. Показано, что устойчивость полученных комплексов при увеличении концентрации ионов натрия и температуры в растворе меняется различно в зависимости от свойств полимера. Характеристика полимера оказывает сильное влияние на активность РНКазы в комплексе. Изменение одного из параметров полимера (молекулярной массы или степени замещения) может приводить к ингибированию или активации РНКазы в комплексе. При этом установлено, что активность образующихся комплексов по-разному изменяется относительно активности РНКазы на первой и второй стадиях ее действия.

Модификация ферментативной активности при образовании растворимых комплексов с полиэлектролитами имеет большое значение для применения ферментов в медицине. Поэтому представляется интересным провести изучение комплексов панкреатической рибонуклеазы (РНКазы), которая применяется для лечения ряда вирусных инфекций [1, 2], с одним из модификаторов ее активности — декстрансульфатом (ДС) [3, 4]. Задачей настоящего исследования явилось изучение устойчивости комплексов РНКазы с ДС различной ММ и степенью замещения путем анализа кинетики диффузии через пористые мембранны, а также определение трансферазной и гидролитической активности полученных комплексов.

В работе использовали панкреатическую РНКазу завода медпрепаратов при объединении Ленмясопром, дополнительно очищенную на колонке сефадекса G-75. В качестве полиэлектролитов применяли ДС фирмы «Serva» с $M=500 \cdot 10^3$ (DC_{500}) с содержанием серы 15,8% и $[\eta]=0,9 \text{ дл/г}$ и более низкомолекулярные образцы ДС с различным содержанием серы, полученные в результате кислотного гидролиза DC_{500} с последующим фракционированием 96° этанолом. В качестве субстратов РНКазы были использованы уридин 2',3'-циклофосфат ($U>p$) и дрожжевая t-РНК. Трансферазную активность РНКазы и ее комплексов с ДС определяли по методу Кунитца [5], а гидролитическую — по методу Крука [6]. Описание методики получения полимерных комплексов РНКазы и определения их трансферазной и гидролитической активности по методам [5, 6] было подробно рассмотрено в нашем предыдущем сообщении [4]. Для изучения кинетики диффузии РНКазы по методу [7] в присутствии DC_{500} и DC_{65} (т. е. $M=65 \cdot 10^3$) применялись слабонабухающие пористые мембранны фирмы «Millipore» типа VSWP с диаметром пор $500 \pm 15 \text{ \AA}$ и мембранны фирмы «Amicon» с диаметром пор 125 \AA . Количественный анализ белка в используемом мембранным методе проводили по Лоури [8], а контроль за отсутствием диффузии через мембрану свободного полисахарида осуществляли цветной реакцией по методу [9].

Изучение комплексообразования по методу [7] осуществляли в растворе вероналацетатного буфера pH 7 с различными концентрациями ионов натрия в интервале температур 10—50°. Исследовали комплексы РНКазы с DC_{500} (15,8% S) и DC_{65} (11,5% S). Раствор РНКазы имел концентрацию 2, а растворы ДС — 1 мг/мл. Степень комплексообразования характеризовали величиной t , представляющей собой количество молей связанной в комплекс РНКазы на моль ДС. Индексы при t указывают на молекулярную массу ДС, образующего комплекс.

На рис. 1 (кривые 1, 2) изображена зависимость значения m от концентрации ионов натрия в буферном растворе комплексов РНКазы с DC_{65} и DC_{500} при 20° . Видно, что в обоих случаях устойчивость комплексов РНКазы с DC_{65} и DC_{500} уменьшается при увеличении концентрации ионов натрия в растворе. Так, распад продукта взаимодействия РНКазы с DC_{65} более сильно зависит от концентрации ионов натрия, и уже при достижении концентрации 0,2 н. комплекс практически не существует. Разрушение же комплекса РНКазы с DC_{500} происходит с возрастанием концентра-

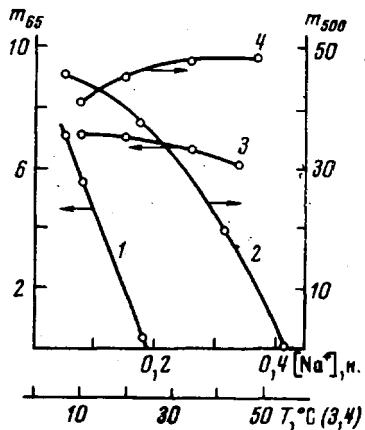


Рис. 1

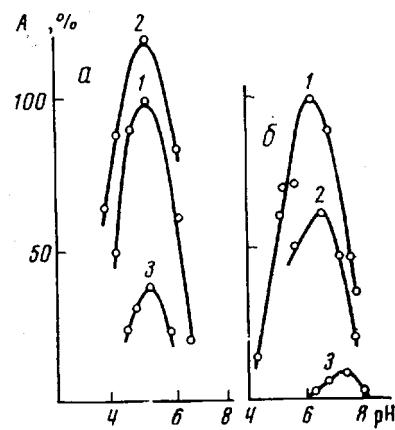


Рис. 2

Рис. 1. Зависимость степени связывания m РНКазы с DC от концентрации ионов натрия в растворе при 20° (1, 2) и от температуры при концентрации ионов натрия в растворе 0,053 н. (3, 4)

1, 3 — DC₆₅, 2, 4 — DC₅₀₀ ([РНКаза] = 2, [DC] = 1 мг/мл, вероналацетатный буфер, pH 7)

Рис. 2. pH-DEPENDENCE OF RELATIVE TRANSFERASE ACTIVITY (a) AND HYDROLITIC ACTIVITY (b) OF RNA ENZYME AND ITS COMPLEXES WITH DC AT 20° :

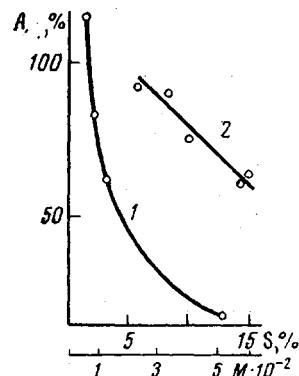
1 — РНКаза, 2 — РНКаза + DC₆₅, 3 — РНКаза + DC₅₀₀ (a — субстрат т-РНК, b — субстрат U>p, соотношение белок : полимер = 2)

ции ионов натрия в растворе в меньшей степени, и комплекс существует вплоть до концентрации ионов натрия 0,4 н. На рис. 1 (кривые 3, 4) представлена зависимость устойчивости комплексов РНКазы с DC₆₅ и DC₅₀₀ в растворе с концентрацией ионов натрия 0,053 н. от температуры. Ход кривых для комплексов РНКазы с двумя образцами DC противоположен: при увеличении температуры от 10 до 50° усиливается межмолекулярное воздействие в системе РНКаза — DC₅₀₀ и ослабляется в системе РНКаза — DC₆₅. Экспериментальные результаты, приведенные на рис. 1, б, можно объяснить с точки зрения возникновения в системе РНКаза — DC, помимо электростатических, дополнительных взаимодействий, поддерживающих связывание в широкой области ионных сил и при высоких температурах. Увеличение межмолекулярного взаимодействия РНКазы и DC₅₀₀ с повышением температуры можно объяснить возрастанием энтропии системы, связанным с наличием гидрофобного взаимодействия или с увеличением числа микросостояний системы [10]. Вероятность дополнительных взаимодействий возрастает с увеличением длины молекулы полизлектролита.

Нами было показано [4], что DC₅₀₀ наряду с другими полианионами при взаимодействии с РНКазой оказывает сильное влияние на ее активность. Поэтому представилось интересным сопоставить активность полимерных комплексов РНКазы, образуемых с DC, отличающихся молекулярной массой и степенью замещения. Была снята pH-зависимость относительной трансферазной и гидролитической активности РНКазы и ее комплексов с DC₆₅ и DC₅₀₀ при 20° и соотношении белка и полимера 2 : 1 по массе.

(рис. 2). Активность комплексов выражена в процентах к активности исходной РНКазы. Сопоставление результатов рис. 2, а и б показывает, что DC_{65} и DC_{500} на активность РНКазы влияют по-разному. Так, DC_{500} ингибирует активность фермента как на первой, так и на второй стадии, в то время как DC_{65} ингибирует активность РНКазы только на стадии гидролиза, а на стадии трансэтерификации повышает ее (до 120% от исходной). Можно предположить, что такое различие в поведении обоих комплексов может быть обусловлено неодинаковыми конформационными изменениями фер-

Рис. 3. Влияние молекулярной массы ДС (1) и содержания серы в нем (2) на трансферазную активность комплексов при pH 5, 20° (вероналапетатный буфер, субстрат т-РНК)



мента, отражающимися на его активности. В предварительных экспериментах методом диффузии через пористые мембранны было доказано отсутствие взаимодействия между ДС и субстратами (т-РНК и U_nP).

На рис. 2, б заметен для обоих комплексов сдвиг оптимума pH для активности в щелочную сторону по сравнению с максимумом, наблюдавшимся в случае РНКазы. Полученные экспериментальные результаты можно объяснить по аналогии с ранее опубликованными данными [4, 11] локальным снижением pH в области активного центра РНКазы при взаимодействии с поликислотами, каковыми являются ДС. Так как по высокомолекулярному субстрату РНК оптимум pH действия для РНКазы и полимерных комплексов совпадает, то нам представилось удобным проследить за влиянием двух важнейших характеристик ДС (молекулярной массы и числа диссоциирующих групп) на РНКазу по изменению трансферазной активности в оптимуме действия фермента (pH 5). На рис. 3, кривая 1 показана активность комплексов РНКазы с ДС различной молекулярной массы и близким содержанием серы (14,4–15,6%), а на кривой 2 приведены результаты исследований комплексов РНКазы с DC_{120} , отличающихся числом сульфогрупп. Сопоставление данных рис. 3 (кривые 1 и 2) показывает, что изменение каждого из параметров ДС оказывает сильное влияние на ферментативную активность комплексов.

Институт высокомолекулярных
соединений АН СССР
Ленинградский
химико-фармацевтический
институт

Поступила в редакцию
17 III 1975

ЛИТЕРАТУРА

- Б. М. Глухов, А. П. Иерусалимский, Р. И. Салганик, Изв. СО АН СССР, сер. биол.-мед. н., 1966, № 12, 95.
- В. С. Лобзин, Ж. В. Сичко, Врачебное дело, 1969, № 10, 42.
- L. Philipson, M. Kaufman, Biochim. et biophys. acta, 80, 151, 1964.
- Р. Б. Пономарева, А. И. Кауненко, Т. Н. Калачева, Н. С. Тихомирова-Сидорова, Г. В. Самсонов, Биохимия, 40, 468, 1975.
- M. Kunitz, J. Gen. Physiol., 33, 349, 1950.
- E. M. Crook, A. P. Mathias, B. R. Rabin, Biochem. J., 74, 234, 1960.
- Т. И. Рожанская, Л. В. Дмитренко, Г. В. Самсонов, Высокомолек. соед., 514, 370, 1972.
- O. H. Lowry, N. J. Rosenbrough, J. Biol. Chem., 265, 1963, 1951.
- M. Dubois, A. Gilles, J. K. Hamilton, P. A. Rebers, F. Smith, Analyt. Chem., 28, 350, 1956.
- G. V. Samsonov, Pure Appl. Chem., 38, 151, 1974.
- L. Goldstein, J. Levin, E. Katchalski, Biochemistry, 3, 1914, 1964.