

УДК 541.64:539.199

ИЗУЧЕНИЕ КОНФОРМАЦИОННЫХ ХАРАКТЕРИСТИК МАКРОМОЛЕКУЛ КОНЬЮГАТОВ СУБТИЛИЗИНА С ПОЛИАКРИЛАМИДОМ И ПОЛИМЕТАКРИЛАМИДОМ

Тарасова Г. В., Тихомирова В. П., Самарцев М. А.

Проведено связывание протеолитического фермента субтилизина с полиакриламидом и полиметакриламидом. Полученные ковалентные конъюгаты исследованы методами диффузии, вязкости и светорассеяния, что позволило оценить пространственные размеры и молекулярные массы полученных макромолекулярных комплексов. Показано, что переход от полиакриламида к полиметакриламиду приводит к существенно более компактной структуре конъюгатов в водном растворе, обусловленной значительной гидрофобностью полиметакриламида. Предложен простой способ определения степени разветвленности конъюгатов карбоцепных полимеров с белками, заключающийся в измерении ММ полимера до и после деструктивного гидролиза белковой части конъюгата.

В последнее время большое внимание уделяется проблеме создания водорастворимых физиологически активных полимерно-белковых комплексов. Цель связывания с полимером состоит при этом в повышении термической и рН-стабильности белков и ферментов и в пролонгировании их действия за счет снижения скорости протеолитической деструкции [1, 2]. При наличии довольно обширного литературного материала по способам модификации ферментов водорастворимыми природными и синтетическими полимерами и по исследованию ферментативных свойств получаемых комплексов практически отсутствуют сведения о поведении таких «гибридов», с точки зрения физики макромолекул. Применение физических методов помимо прямого определения молекулярных размеров призвано установить отнесение макромолекул к тому или иному конформационному типу: статистического клубка, глобулярной или палочкообразной структуры. В настоящей работе описано исследование конформационных характеристик ковалентных комплексов субтилизина с двумя водорастворимыми полимерами акрилового ряда, полученных методом включения фермента, модифицированного введением двойных связей, в растущие цепи полимеров. Выбор полимерных модификаторов белка связан, в частности, с известным стабилизирующим активность ферментов эффектом полиакриламида [3, 4].

В работе использовали субтилизин типа «Карлсберг» («Sigma», США), который предварительно модифицировали хлорангидридом метакриловой кислоты [5] или акролеином [6]. Конъюгаты получали сополимеризацией модифицированного фермента с мономерами в водном растворе в присутствии персульфата аммония.

К охлажденному до 0° $7 \cdot 10^{-5} M$ раствору субтилизина в $0,025 M$ боратном буфере с рН 9,5 добавляли несколькими порциями хлорангидрид метакриловой кислоты общим количеством до 1% от объема реакционной смеси и перемешивали 2 ч при 0° . В полученный раствор вводили следующие компоненты (в весовых процентах от количества реакционной смеси): акриламид – 2, тетраметилэтилендиамин (ТМЭД) – 0,4, персульфат аммония – 0,07. Полимеризацию вели в течение 1 ч при 25° .

Для получения конъюгатов с полиметакриламидом к $1,8 \cdot 10^{-5} M$ раствору фермента в том же буфере добавляли акролеин (0,15% по объему) и вели реакцию в течение 2 ч при 4° ; при этом потеря активности фермента за счет модификации составляла 22%. Затем в раствор вводили метакриламид (2%), ТМЭД (0,25%), персульфат аммония (0,3%) и осуществляли полимеризацию (18 ч при 4°). После этого добавляли борогидрид натрия до концентрации 1 мг/мл и перемешивали в течение 1 ч.

Растворы после полимеризации фракционировали с помощью гель-хроматографии в условиях, указанных в подписи к рис. 1. Во фракциях, условно разделенных по времени выхода из колонки, определяли ферментативную активность по гидролизу 1%-ного раствора казеина при pH 10,5 [7] и содержание белка по методу Бредфорд [8] с использованием калибровки по растворам исходного субтилизина. Общее количество вещества во фракциях определяли по весу после диализа против воды и лиофильного высушивания.

Для контроля термоинактивации растворы конъюгатов в 0,1 M фосфатном буферо с pH 7,4 выдерживали при 50°, периодически отбирая пробы для определения остаточной активности. Гидролиз конъюгатов для оценки длины полимерных цепей, связанных с белком, проводили действием 6%-ной соляной кислоты в запаянных под аргоном ампулах в течение 2 ч при 110°. Гидролизат упаривали в вакууме на ротационном испарителе, остаток растворяли в воде и хроматографировали на колонке

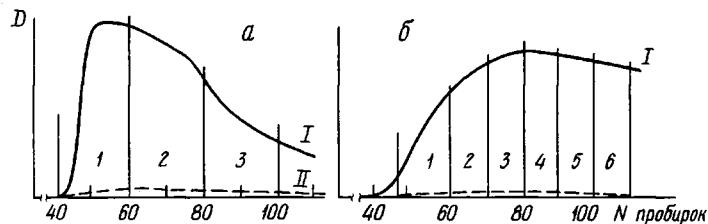


Рис. 1. Гель-хроматография конъюгатов субтилизина с акриламидом (а) и метакриламидом (б); колонка сефадекса С-75 (60×5 см), элюция 0,025 M бикарбонатом аммония с pH 8,3 со скоростью 3,3 мл/мин, отбор в каждую пробирку по 6,7 мл. I – D_{206} , II – D_{280} . Арабские цифры – номера фракций

31×1,6 см с сефадексом LH-20 для освобождения от низкомолекулярных продуктов гидролиза.

Полученные биокомплексы исследовали методами вискозиметрии, светорассеяния и диффузии. Измерение светорассеяния водных растворов конъюгатов проводили на фотоэлектрическом нефелометре «Fica-50» (Франция) в интервале углов рассеяния 30–150° при 21° и длине волны падающего света 546 нм в цеполяризованном свете. Все растворы непосредственно перед измерением фильтровали в ячейке для ультрафильтрации через мембранны «Биопор-5М» [9]. Инкремент показателя преломления $dn/dc = 0,192$ системы конъюгат – вода измеряли на интерференционном рефрактометре ИТР. Как показали результаты эксперимента, для исследуемых макромолекул отсутствовала асимметрия рассеяния, поэтому значения M_w определяли по величине приведенной интенсивности рассеяния R_{90° при угле рассеяния $\theta = 90^\circ$.

Коэффициенты диффузии измеряли с помощью поляризационно-интерференционного диффузометра Цветкова [10] в кюветах длиной 3 см при 21°. Вискозиметрические измерения проводили в вискозиметре Уббелоде при той же температуре.

В связи с тем, что модификация аминогрупп в белках хлорангидридами требует применения большого избытка реагента [5, 6], раствор фермента, используемый в реакции сополимеризации, содержал значительное количество метакриловой кислоты, образующейся при гидролизе избыточного хлорангидрида. Измерение характеристической вязкости $[\eta]$ водных растворов конъюгатов субтилизина с полиакриламидом показало наличие у них полизэлектролитных свойств, связанных с включением в полимерную цепь ~10% звеньев метакриловой кислоты. Аналогичные электростатические эффекты были выявлены у сополимера акриламида с метакриловой кислотой, полученного в условиях приготовления конъюгатов, но без добавки фермента. С целью устранения электростатических эффектов измерение вязкости проводили при двух значениях ионной силы раствора (в 0,033 M и 0,2 M NaCl) с последующей экстраполяцией полученных значений $[\eta]$ к бесконечно большой ионной силе раствора. Полученные данные приведены в табл. 1. В то же время полизэлектролитные свойства полимера практически не сказываются на скорости диффузии конъюгатов: измерения при концентрации конъюгатов 0,1 и 0,05% в 0,2 M NaCl показали, что коэффициенты диффузии D_0 не зависят от концентрации.

В табл. 1 представлены значения D_0 и величины радиусов инерции R_i , вычисленные по уравнению

$$R_i = \frac{kT}{P\sqrt{6}\eta_0 D_0} \quad (1)$$

Таблица 1

Гидродинамические свойства конъюгатов субтилизина с полиакриламидом

Образец	$[\eta] \cdot 10^{-2}$		$[\eta]_\infty \cdot 10^{-2}$	$D_0 \cdot 10^7$	$M_D \cdot 10^{-3}$	$M_v \cdot 10^{-3}$	$\bar{M}_w \cdot 10^{-3}$	$R_n, \text{ \AA}$	$R_s^*, \text{ \AA}$
	в 0,035 M NaCl	в 0,2 M NaCl							
Нефракционированный конъюгат	—	0,82	0,64	—	—	100	95	—	—
Фракция 1	1,22	0,98	0,94	—	—	160	—	—	—
Фракция 2	1,02	0,85	0,82	2,8	110	140	—	116	44
Фракция 3	0,56	0,49	0,48	5,0	60	70	—	65	34
Модельный полимер	1,24	0,80	0,70	—	—	110	—	—	—

* Радиус Стокса.

а также молекулярные массы M_D и M_v , рассчитанные согласно следующим формулам для полиакриламида [11]:

$$[\eta] = 6,3 \cdot 10^{-3} M^{0.8} \quad (2)$$

$$D = 8,46 \cdot 10^{-4} M^{-0.6} \quad (3)$$

В первом приближении величины M_v и M_D могут быть усреднены. Определение M_v и M_D не является абсолютным, поскольку основано на допущении применимости к молекулам конъюгатов формул, характеризующих гидродинамические свойства макромолекул полиакриламида. Однако такое допущение оправдано, так как содержание субтилизина в конъюгатах не превышает 10% по весу, а к измеряемым физическим параметрам молекул, испытывающим влияние заряда, применена экстраполяционная методика, элиминирующая это влияние.

ММ нефракционированного образца была измерена также абсолютным методом — по светорассеянию его водного раствора в 0,2 M NaCl. Полученная величина $\bar{M}_w = 95 \cdot 10^3$ практически совпадает с $M_v = 100 \cdot 10^3$, рассчитанной по вязкости, что подтверждает правомерность применения к конъюгатам формул (2) и (3). Для сравнения в табл. 1 представлены также величины гидродинамических радиусов инерции макромолекул полиакриламида R_n и радиусов Стокса R_s молекул глобулярных белков, имеющих ту же молекулярную ММ, что и макромолекулы конъюгатов. Из сопоставления приведенных данных можно заключить, что размеры молекул биокомплексов субтилизина с полиакриламидом в 2–3 раза больше молекул глобулярных белков той же ММ, но не превышают размеры макромолекул полиакриламида, что позволяет считать их развернутыми гауссовыми клубками.

При замене акриламида в качестве мономера на метакриламид образуется новый тип биокомплексов. Конъюгаты субтилизина в этом случае получали полимеризацией метакриламида в присутствии субтилизина, модифицированного акролеином. После разделением продукта на сепадексе G-75 фракции исследовали методами светорассеяния и вискозиметрии. Результаты измерения светорассеяния при различных концентрациях конъюгатов приведены на рис. 2. В табл. 2 представлены определенные из светорассеяния значения \bar{M}_w фракций, здесь же приведены величины вторых виримальных коэффициентов A_2 , характеризующих различия в термодинамическом взаимодействии вещества с растворителем [12]. Практически одинаковые ММ полученных конъюгатов ($200\text{--}300 \cdot 10^3$) и различия в значениях A_2 свидетельствуют о том, что при хроматографии не происходит разделения макромолекул по ММ. По-видимому, фракции различаются по характеру их взаимодействия с полисахаридным носителем. Сопоставление найденных для фракции 3 величин $\bar{M}_w = 50 \cdot 10^3$ и

$A_2 = 7,2 \cdot 10^{-3}$ с соответствующими значениями, полученными при измерении светорассеяния модифицированного субтилизина ($\bar{M}_w = 23,5 \cdot 10^3$ и $A_2 = 7,5 \cdot 10^{-3}$), позволяет предположить, что фракция 3 в основном состоит из субтилизина, модифицированного короткими цепями полимера, а для остальных фракций характерно более высокое содержание полиметакриламида. Обращают на себя внимание необычно низкие значения характеристической вязкости $[\eta]$ конъюгатов субтилизина с полиметакриламидом (табл. 2) по сравнению с конъюгатами поликариламида (табл. 1). Аномально малые величины и практическая независимость $[\eta]$ от \bar{M}_w конъюгатов с полиметакриламидом, напоминающая поведение глобулярных белков, указывает на большую компактность их макромолекул.

Можно предположить, что полученная структура представляет собой разветвленную макромолекулу типа звезды, компактность которой увели-

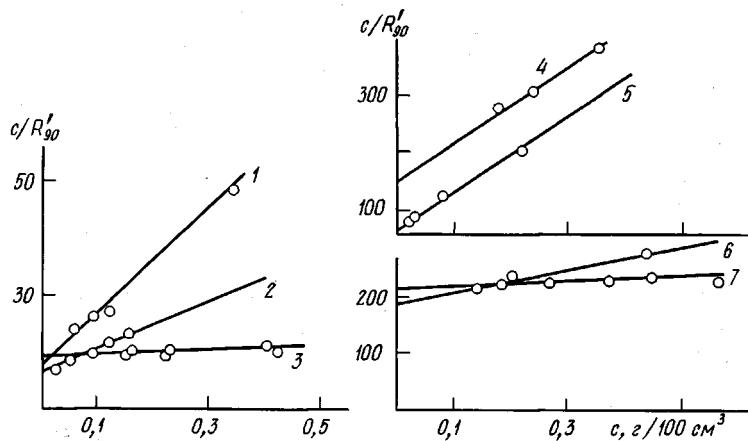


Рис. 2. Зависимость светорассеяния от концентрации растворов конъюгатов субтилизина с полиметакриламидом: 1 – фракция 2, 2 – нефракционированный образец, 3 – фракция 5, 4 – субтилизин, 5 – фракция 3, 6 – полимер, выделенный после гидролиза нефракционированного конъюгата, 7 – модельный полимер

чивается за счет гидрофобного характера полиметакриламида по сравнению с поликариламидом: известно, что аналогичную глобулярным белкам компактную структуру в водных растворах имеет и неионизованная полиметакриловая кислота [13]. Аналогичная ситуация с низкой вязкостью в водных растворах наблюдалась при исследовании нековалентных комплексов бычьего сывороточного альбумина с поли-4-винилширидином [14–16], а также сополимера малеиновой кислоты с различными эфирами, содержащими гидрофобные радикалы [17, 18], что объяснялось глобуляризацией макромолекул.

Таблица 2
Гидродинамические свойства конъюгатов субтилизина с полиметакриламидом

Образец	$\bar{M}_w \cdot 10^{-3}$	$A_2 \cdot 10^4$	$[\eta] \cdot 10^{-2}$	Образец	$\bar{M}_w \cdot 10^{-3}$	$A_2 \cdot 10^4$	$[\eta] \cdot 10^{-2}$
Нефракционированный конъюгат	270	6,6	0,11	Фракция 5	200	0,0	0,08
Фракция 1	170	2,4	—	Фракция 6	170	1,8	—
Фракция 2	240	12,0	0,40	Модельный полимер	25	0,0	0,06
Фракция 3	50	72,0	0,09	Конъюгат после гидролиза	30	17,3	0,08
Фракция 4	140	0,7	—	Субтилизин	23,5	75,0	—

С целью проверки предположений о структуре конъюгатов, сделанных на основании физических экспериментов, были использованы два химических подхода: получение модельного полимера в отсутствие фермента и гидролиз конъюгатов в условиях деструкции белка. В последнем случае проводили определение ММ поликариловой или полиметакриловой кислоты, образующейся при кислотном гидролизе цепей полиамида.

Приведенные в табл. 1 данные свидетельствуют о практическом совпадении значений M_w модельного полимера и нефракционированного конъюгата \bar{M}_w и о незначительном снижении величины \bar{M}_w после гидролиза конъюгата субтилизина с поликариламидом. Это позволяет утверждать, что основная масса макромолекул конъюгата имеет структуру типа развернутого гауссова клубка, состоящего из одной полимерной цепи и одной

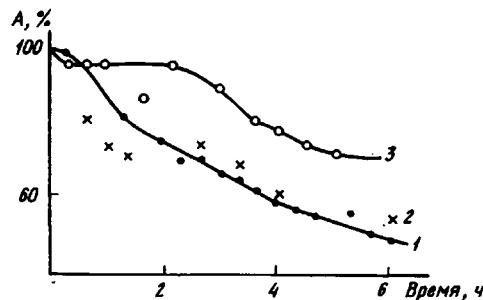
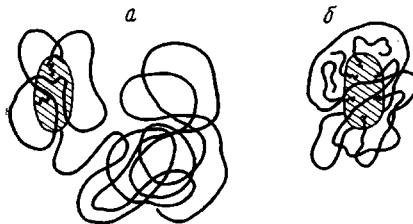


Рис. 3. Схематическое представление макромолекул конъюгатов субтилизина с поликариламидом (а) и полиметакриламидом (б)

Рис. 4. Термоинактивация нативного (1) и конъюгата субтилизина с поликариламидом (2) и с полиметакриламидом (3) при 50° в 0,1 M фосфатном буфере с pH 7,4

молекулы фермента. Низкий уровень включения метакрилоил-фермента в полимерную цепь можно в данном случае объяснить относительно высокой скоростью полимеризации акриламида.

В случае полиметакриламида модельный полимер имел $\bar{M}_w=25 \cdot 10^3$, а гидролизат нефракционированного конъюгата — $31 \cdot 10^3$, что в 10 раз меньше ММ конъюгата. Тем самым подтверждается разветвленная структура рассматриваемых макромолекул, связанная, вероятно, с особенностями сополимеризации. По сравнению с акриламидом метакриламид характеризуется значительно меньшей скоростью полимеризации, в результате чего увеличивается вероятность включения в полимерную цепь двойных связей, предварительно введенных в молекулу фермента с помощью акролеина, с образованием присоединенных к белковой молекуле относительно коротких полимерных цепей (рис. 3).

Биохимическое исследование комплексов полиамидов с субтилизином показало некоторое увеличение их термостабильности по сравнению с нативным ферментом (рис. 4).

ЛИТЕРАТУРА

- Ларионова Н. И., Торчилин В. П. Хим.-Фарм. ж., 1980, т. 14, № 4, с. 21.
- Torchilin V. P., Martinek K. Enzyme Microb. Technol., 1979, v. 1, № 2, p. 74.
- Gianfreda L., Greco G. Biotechnol. Letters, 1981, v. 3, № 1, p. 33.
- Greco G., Gianfreda L. Biotechnol. Bioengng., 1981, v. 23, № 10, p. 2199.
- Платэ Н. А., Валуев Л. И., Егоров Н. С., Аль-Нури М. А. Прикл. биохимия и микробиол., 1977, т. 13, № 5, с. 673.
- Мартинек К., Торчилин В. П. В кн.: Итоги науки и техники. Биологическая химия. Т. 12. М.: ВИНИТИ, 1978, с. 17.
- Каверзнева Е. Д. Прикл. биохимия и микробиол., 1971, т. 7, № 2, с. 225.
- Bradford M. M. Anal. Biochem., 1976, v. 72, № 1, p. 248.
- Жемков В. П., Иванов Н. Б., Громов В. И., Черкасов А. Н. В кн.: Тез. докл. III Всес. конф. по мембранным методам разделения смесей. Черкассы, 1981, с. 205.
- Цветков В. Н., Эскин В. Е., Френкель С. Я. Структура макромолекул в растворе. М.: Наука, 1964.
- Бектурев Е. А., Билиндина З. Х. Синтетические водорастворимые полимеры в растворах. Алма-Ата: Наука, 1981.

12. Эскин В. Е. Рассеяние света растворами полимеров. М.: Наука, 1973.
13. Некрасова Т. Н., Птицын О. Б., Щикалова Н. С. Высокомолек. соед. А, 1968, т. 10, № 8, с. 1530.
14. Мустафаев М. И., Кабанов В. А. Высокомолек. соед. А, 1981, т. 23, № 2, с. 271.
15. Кабанов В. А., Мустафаев М. И. Высокомолек. соед. А, 1981, т. 23, № 2, с. 255.
16. Кабанов В. А., Мустафаев М. И., Гончаров В. В. Высокомолек. соед. А, 1981, т. 23, № 2, с. 261.
17. Miyamoto S., Ishii I., Ohnuma H. Makromolek. Chem., 1981, B. 182, № 2, S. 483.
18. Miyamoto S. Makromolek. Chem., 1981, B. 182, № 2, S. 559.

Всесоюзный научно-исследовательский
институт особо чистых биопрепаратов

Поступила в редакцию
5.VI.1982

**A STUDY OF THE CONFORMATIONAL CHARACTERISTICS
OF MACROMOLECULAR CONJUGATES OF SUBTILYSINE
WITH POLYAMIDES**

Tarasova G. V., Tikhomirova V. P., Samartsev M. A.

S u m m a r y

Proteolytic enzyme subtilysine was covalently immobilized onto polyacrylamide and polymethacrylamide. The size and molecular masses of the obtained macromolecular complexes were estimated from diffusion, viscosity and light-scattering studies. It was shown that polymethacrylamide conjugates exhibited in aqueous solutions a more compact structure than that of polyacrylamide, which was due to a reasonable intrinsic hydrophobicity of polymethacrylamide. A simple procedure to determine the extent of branching in polymer – protein conjugates was developed, which involved the determination of the MM of the polymeric carrier prior to and after the destructive hydrolysis of the protein portion of the conjugate.