

УДК 541.64 : 542.954

ИССЛЕДОВАНИЕ ПОЛИКОНДЕНСАЦИИ МАКРОМОЛЕКУЛ БИОПОЛИМЕРОВ

Кузнецова Н. П., Самсонов Г. В.

Исследование реакции поликонденсации белка с бифункциональным сивающим агентом проведено на примере взаимодействия сывороточного альбумина с глутаровым альдегидом. Вариация концентрации исходных компонентов позволяет направить процесс в сторону внутримолекулярной или межмолекулярной сшивки белковых макромолекул. Исследовано кажущееся ММР олигомерных продуктов поликонденсации (олигоальбуминов) в зависимости от условий проведения процесса. Для расчета величин ММ разной степени усреднения M_w и M_n предложено использовать метод гель-проникающей хроматографии олигомерных белковых макромолекул.

Использование процесса поликонденсации в системе белок — бифункциональный сивающий агент в течение последнего десятилетия часто привлекают к изучению многих биологических явлений [1—4]. В качестве одного из компонентов выступает полифункциональный биополимер — белок, что, несмотря на монодисперсность и конформационную однородность его макромолекул, приводит к значительному усложнению процесса поликонденсации. При взаимодействии с макромолекулой белка бифункциональные реагенты способны образовывать внутримолекулярные химические мостики между функциональными группами белка, которые расположены пространственно близко друг от друга. Реакционноспособные функциональные группы могут также принадлежать разным белковым макромолекулам, в результате чего образуются олигомеры за счет межмолекулярных ковалентных связей одного типа белка или гетеромеры, если в реакции участвуют разные виды белков [5].

Наиболее распространенный бифункциональный реагент — глутаровый альдегид (ГА) [6]. ГА в слабокислых водных растворах существует в равновесии с гидратированными линейными и циклическими формами, а в нейтральных и слабощелочных растворах сам ГА подвергается альдольной конденсации с последующей дегидратацией, давая α , β -ненасыщенные альдегиды. Химическая неоднородность ГА усложняет его реакцию с белками. Механизм поликонденсации белков с ГА до сих пор не объяснен, но установлено, что альдегидные группы реагируют в основном с ε -амино-группами лизиновых остатков белка. В ряде работ было показано, что модификация аминных групп белковой макромолекулы протекает с образованием конъюгированного шиффова основания, где альдиминная связь $\text{CH}=\text{N}$, полученная в результате реакции между NH_2 -группой белковой молекулы и альдегидной группой, сопряжена с двойной связью $\text{C}=\text{C}$, что делает продукт реакции стабильным к гидролизу [1, 7]. Поскольку все функциональные группы при поликонденсации реагируют независимо, то обычно в результате реакции образуются олигомеры [8]. Одновременно при этом возможно образование двух типов структур как за счет внутримолекулярной сшивки, так и в результате реализации межмолекулярных связей, приводящих к водорастворимым высокомолекулярным продуктам. Образование внутри- и межмолекулярных сшивок зависит от общего числа реакционноспособных остатков аминокислот, но особенно от их распределения на поверхности белковой глобулы. Если распределение равномерное,

то легко идет межмолекулярная реакция, если локальное, то предпочтительнее — внутримолекулярное взаимодействие [9].

В настоящей работе на примере сывороточного альбумина делается попытка исследовать продукты поликонденсации белков с ГА.

Использовали сывороточный альбумин плацентарной крови человека (10%-ный стерильный раствор). Альбумин — удобный объект для модификации, так как содержит большое количество лизиновых остатков (55), исходя из аминокислотного состава (молекулярная масса $69 \cdot 10^3$) [10]. Он хорошо растворим в широком диапазоне концентраций и рН. Для работы сывороточный альбумин был тщательно отфильтрован. Исследования проводили в фосфатных буферных растворах рН 5,7–7,9, где альбумин сохранял нативную глобулярную конформацию.

Определение количества аминогрупп в альбумине проводили реакцией с 2,4,6-тринитробензольфлокислотой [11]. Количество модифицированных аминогрупп определяли по разности между количеством определяемых аминогрупп в исходном и модифицированном белках.

Глутаровый альдегид получали перегонкой под вакуумом коммерческого 25%-ного водного раствора ГА (марки Реанал). Концентрацию альдегидных групп определяли методом дифференциальной рН-метрии с гидроксиламином [12], считая, что молекула ГА ($M=100$) содержит две альдегидные группы. Количество связанного с белком бифункционального агента рассчитывали как разностную величину между концентрациями исходного и непрореагировавшего за определенное время ГА. Для этого проводили быстрое (под небольшим давлением) отделение части раствора в ультрафильтрационной ячейке на мемbrane UM-10 (Диафло), через которую легко проходил свободный ГА и полностью задерживался модифицированный белок.

Для точного тестирования количества NH_2 -групп белка и ММ реакцию поликонденсации останавливали добавлением боргидрида натрия.

В результате реакции поликонденсации белков с ГА образуется набор макромолекул полидисперсных по размеру и гетерогенных по форме. Смесь белковых олигомеров можно рассматривать как полимеромологическую систему и, как для любых полидисперсных полимерных систем, к ним можно применить разные способы молекулярно-массового усреднения, а именно использовать среднечисленную \bar{M}_n и среднемассовую \bar{M}_w величины молекулярных масс.

Для сравнительной оценки ММР белковых олигомеров нами была применена методика определения величин \bar{M}_w и \bar{M}_n с использованием ГПХ, предложенная для определения кажущегося ММР в многокомпонентной низкомолекулярной системе (смеси пептидов белкового гидролизата) [13].

Для исследуемых систем в качестве гелевой фазы использовали сефарозу 6Б с разрешающей способностью разделения по белкам в диапазоне $M=25 \cdot 10^3 - 10^6$, уравновешенную 0,033 м. фосфатным буферным раствором рН 7,1. На рис. 1 представлены гель-хроматограммы распределения по размерам макромолекул растворов олигоальбумина. Выходные кривые элюции олигоальбумина тестирували спектрофотометрически.

Методика расчета величин \bar{M}_w и \bar{M}_n предполагает предварительную калибровку колонки по монодисперсным белковым маркерам с известными ММ¹, коэффициенты распределения K_{av} , которых на сефарозе 6Б следовало определить из обычного соотношения $K_{av} = (V_i - V_0) / (V_t - V_0)$, где V_0 — объем задержки колонки (по дектрану синему); V_t — объем пор геля (определяемый по КИ); V_i — объем элюции маркера или любого i компонента с $M=M_i$. Параметры V_0 и V_t для данной колонки постоянны.

По калибровочной прямой, построенной на основании эмпирического уравнения $-\lg K_{av} = RM^{1/3} + S$ [13], определяли константы R и S . В нашем случае $R=10^{-4}$ и $S=10^{-2}$.

Для проведения расчетов предполагали, что распределение по размерам является гауссовым. В смеси полимер-гомологов концентрацию любого вида олигомеров $M=M_i$ принимали пропорциональной величине оптической плотности D_i . Гель-хроматограмма в координатах $D_i - V_i$, преобразованная в графическую зависимость $D_i - M_i$ в соответствии с формулой

$$M_i = \left[\frac{\frac{V_i - V_0}{V_t - V_0} - S}{R} \right]^{3/2},$$

позволяет получить картину ММР олигоальбумина. На основании построенного ММР смеси олигомеров белка можно определить величины \bar{M}_w и \bar{M}_n , исходя из следующих соотношений: $\bar{M}_n = \sum D_i / \sum (D_i / M_i)$, $\bar{M}_w = \sum D_i M_i / \sum D_i$.

Для полидисперсных образцов $\bar{M}_w > \bar{M}_n$ соотношение $\bar{M}_w : \bar{M}_n$ характеризует степень полидисперсности. При завершении реакции поликонденсации обычно соотношение средних значений ММ выражается как $\bar{M}_n : \bar{M}_w = 1 : 2$ [8].

¹ Авторы благодарят Т. М. Таратину за помощь в получении калибровочной зависимости.

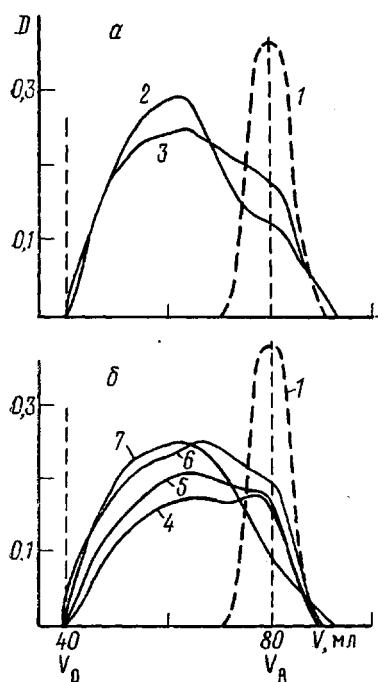


Рис. 1

Рис. 1. Распределение по размерам олигомерных альбуминов при гель-хроматографии на сефарозе 6Б при вариации концентрации альбумина (мольное отношение ГА : А = 82) (а) и при вариации соотношения компонентов ([А] = 0,37 · 10⁻³ м.) (б): 1 – исходный альбумин; 2–7 – олигоальбумины, полученные при [А] = 0,74 · 10⁻³ (2); 0,36 · 10⁻³ м. (3); мольное отношение ГА : А = 13,5 (4); 29,7 (5); 48,6 (6); 83,3 (7)

Рис. 2. Влияние концентрации белка на ММ олигомеров альбумина ($c_{TA} = 0,038$ м.): 1 – \bar{M}_w , 2 – \bar{M}_n

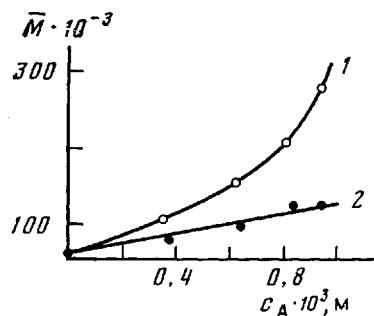


Рис. 2

Интенсивность процесса сшивки, размер получаемых макромолекул, а также степень превращения белков в олигомеры оценивали прежде всего в зависимости от концентрации компонентов (белка и ГА), их соотношения, величины pH. Степень превращения альбумина в олигомеры α при поликонденсации определяли как долю высокомолекулярных производных белка по отношению к исходному мономеру. Количественные результаты по поликонденсации альбумина с ГА (для рис. 1) сведены в табл. 1. Увеличение исходного мольного соотношения альбумин : ГА в 6 раз (с 13,5 до

Таблица 1

Условия поликонденсации и характеристика образующихся олигоальбуминов (ОА)
(Время реакции 2 ч, 22°)

$c_A \cdot 10^3$, м	$c_{GA} \cdot 10^3$, м	Мольное отноше- ние ГА : А	$\alpha = \frac{[OA]}{[A]}$	ГА _{связ} , % от исход- ного	Мольное отноше- ние ГА _{связ} :А	$\bar{M}_w \cdot 10^{-3}$	$\bar{M}_n \cdot 10^{-3}$	\bar{M}_w / \bar{M}_n
0,37	0,5	13,5	0,60	100	8,2	205	106	1,93
0,37	0,9	23,8	0,65	93	10,6	237	115	2,06
0,37	1,1	29,7	0,73	77	–	–	–	–
0,36	1,8	48,6	0,74	70	11,0	259	123	2,10
0,35	3,0	83,3	0,84	70	20,8	281	133	2,11
0,51	4,2	82,3	0,87	55	14,9	296	153	1,93
0,74	6,1	82,0	0,93	48	9,0	335	170	1,97

Таблица 2

Модификация аминогрупп альбумина в процессе поликонденсации с ГА при 10°

$c_A \cdot 10^3$, м	$c_{GA} \cdot 10^3$, м	Модифицированные NH ₂ -группы: альбумин	$\bar{M}_w \cdot 10^{-3}$	$c_A \cdot 10^3$, м	$c_{GA} \cdot 10^3$, м	Модифицированные NH ₂ -группы: альбумин	$\bar{M}_w \cdot 10^{-3}$
1,12	1,7	3,7	184	0,62	2,7	5,6	138
1,12	3,1	11,0	175	0,62	5,5	15,2	141

Таблица 3

Влияние величины рН на поликонденсацию альбумина с ГА
($c_A = 1,12 \cdot 10^{-3}$ м, 10°)

pH	$c_{GA} \cdot 10^2$, м	Модифицированные NH ₂ -группы: альбумин	Исходное отношение ГА : альбумин	$M_w \cdot 10^{-3}$	$M_n \cdot 10^{-3}$	M_w/M_n
5,7	3,1	9,6	27,7	201	106	1,90
6,5	3,1	11,0	27,7	175	98	1,78
7,9	3,1	11,5	27,7	157	75	2,10
6,0	1,7	3,7	15,2	184	103	1,79
7,6	1,7	4,0	15,2	169	97	1,74

83) в реакционной смеси интенсифицирует процесс модификации альбумина: отношение количества связанного с белком ГА к количеству альбумина возрастает с 8,2 до 20,8, что сопровождается незначительным ростом ММ олигомеров. При сравнительно низких концентрациях белка ($0,37 \cdot 10^{-3}$ м.) ГА тратится в основном на внутримолекулярную модификацию альбумина, а за счет межмолекулярных мостиков образуются три- и тетрамеры ($M_w = 205 \cdot 10^3 - 280 \cdot 10^3$). Повышение концентрации альбумина с $0,36 \cdot 10^{-3}$ до $0,74 \cdot 10^{-3}$ м. интенсифицирует получение олигомеров при одновременном понижении относительного количества связанного бифункционального агента с 20,8 до 9. Влияние начальной концентрации белка на нарастание ММ олигомеров иллюстрирует рис. 2.

Следовательно, увеличение концентрации белка приводит к повышению выхода олигомерных компонентов, а рост концентрации ГА – к интенсификации внутримолекулярной сшивки. В табл. 2 представлены данные по модификации аминогрупп альбумина при варьировании условий реакции поликонденсации. При постоянной концентрации белка повышение концентрации бифункционального агента вдвое приводит к увеличению степени модификации аминогрупп в ~3 раза, но практически не влияет на величину ММ.

В исследованном диапазоне pH 5,7–8,0, где сохраняется нативной конформация белка, обнаруживается довольно слабое влияние величины pH на количество модифицированных ГА аминных групп, так же как и на величины ММ (табл. 3). С повышением величины pH увеличивается количество модифицированных аминогрупп, причем внутримолекулярная модификация более предпочтительна в сравнении с межмолекулярной (величина средней ММ даже понижается). Можно полагать, что при удалении от изоэлектрической точки альбумина (pH 5,0) за счет возрастания общего отрицательного заряда альбуминовой молекулы происходит «расщепление» белковых глобул, что благоприятно в основном для внутримолекулярной модификации.

ЛИТЕРАТУРА

- Peters K., Richard F. M. Ann. Rev. Biochem., 1977, v. 46, p. 523.
- Hermann R., Jaekicke R., Rudolph R. Biochemistry, 1981, v. 20, № 18, p. 5195.
- Pittner F., Miron T., Pittner G., Wilchek M. J. Solid-Phase Biochem., 1980, v. 5, № 3, p. 147.
- Штильман М. М. Успехи химии, 1979, т. 48, № 11, с. 2061.
- Barborin J.-N., Thomasset B. Biochim. Biophys. Acta (E), 1979, v. 570, № 1, p. 11.
- Hopwood D. In: Fixation in Histochemistry/Ed. by Stoward P. J. L.: Chapman and Hall, 1973, p. 47.
- Monsan P., Puzo G., Mazarguil H. Biochemie, 1975, v. 57, № 11–12, p. 1281.
- Бреслер С. Е., Ерусалимский Б. Л. Физика и химия макромолекул. М.–Л.: Наука, 1965.
- Payne J. Biochem. J., 1973, v. 135, № 4, p. 867.
- Нейрат Г., Бейли К. Белки. М.: Изд-во иностр. лит., 1958, т. 3, с. 324.
- Fields R. Biochem. J., 1971, v. 124, № 3, p. 581.
- Roe H. R., Mitchel G. Analyt. Chem., 1951, v. 23, № 12, p. 1758.
- Catsimpoolas N. Analyt. Biochem., 1974, v. 61, № 1, p. 101.