

УДК 541(64+127)

КИНЕТИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ПОЛИКОНДЕНСАЦИИ БИОПОЛИМЕРОВ

Кузнецова Н. П., Самсонов Г. В.

На примере сывороточного альбумина и гемоглобина человека исследована реакция поликонденсации белков с глутаровым альдегидом. Спектрофотометрическим методом изучена кинетика поликонденсации, определен псевдопервый порядок реакции по белкам. Показано влияние концентрации компонентов и величины pH реакционной смеси на значения констант скорости реакции. Для системы гемоглобин — глутаровый альдегид оценена величина энергии активации, составляющая при вариации условий 29–48 кДж/моль. Определено влияние электрохимического состояния белковой макромолекулы на образование межмолекулярных связей и показано, что процесс олигомеризации белков с образованием высокомолекулярных производных проходит в два этапа.

Реакция поликонденсации белков с глутаровым альдегидом (ГА), эффективным спивающим агентом, получила в последнее время широкое практическое распространение как для фиксации клеток и тканей, так и для различного типа иммобилизации белковых молекул. Механизм процесса поликонденсации белков с ГА до сих пор не имеет однозначного объяснения. Это связано прежде всего со сложностью исходных компонентов. Белковые макромолекулы имеют на поверхности большой набор различных по функциональности групп, реакционная способность которых сильно зависит от микроокружения на белковой глобуле. В отношении ГА в настоящее время установлено, что мономерный бифункциональный ГА — малоустойчивое соединение, в нейтральных и слабощелочных растворах он дает смесь α - β -ненасыщенных альдегидов за счет альдольной конденсации и последующей дегидратации, при этом возможна циклизация [2–5]. Химическая природа модификации белков ГА до сих пор неясна. Известно, что при взаимодействии ГА с белками реакция идет с участием аминогрупп N-концевых и ε-лизиновых аминокислотных остатков через образование шиффовых оснований. Альдиминная связь, которая образуется в результате взаимодействия аминогруппы белка с альдегидной группой ГА, оказывается сопряженной с двойной этиленовой связью (на молекуле ГА), что приводит к стабилизации продукта спивки к кислотному гидролизу. Подобное явление не наблюдается для малоустойчивых шиффовых оснований, полученных в результате поликонденсации аминов сmonoфункциональными альдегидами [6]. Кроме того, альдиминная связь между белком и ГА способна медленно переходить в более стабильную кетоаминную связь за счет перегруппировки Амадори, и переход ускоряется в присутствии карбоксильной группы [6, 7]. Поэтому процесс модификации аминогрупп белков глутаровым альдегидом практически необратим [8]. При взаимодействии с макромолекулой белка ГА может образовать химические мостики между функциональными группами, принадлежащими как одной макромолекуле белка, так и связывать разные макромолекулы с образованием белковых олигомеров.

Для работы использовали ГА фирмы «Реанал» предварительно очищенный перегонкой в вакууме. Концентрацию ГА в расчете на мономер, содержащий две альдегидные группы ($M=100$), определяли методом дифференциальной pH-метрии с тиодексиламином [10]. Исследуемые белки: сывороточный альбумин человека (СА) («Реанал», $M=68 \cdot 10^3$) и гемоглобин человека (ГГ) ($M=65 \cdot 10^3$) хорошо растворимы в воде и имеют большое количество аминогрупп. (Исходя из аминокислотного со-

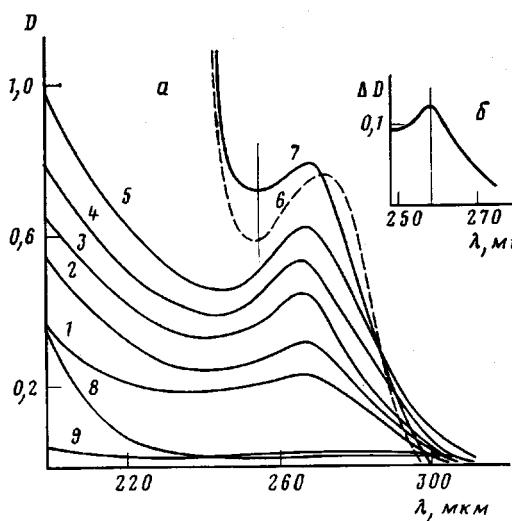


Рис. 1

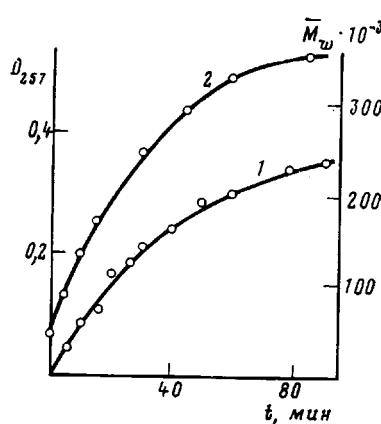


Рис. 3

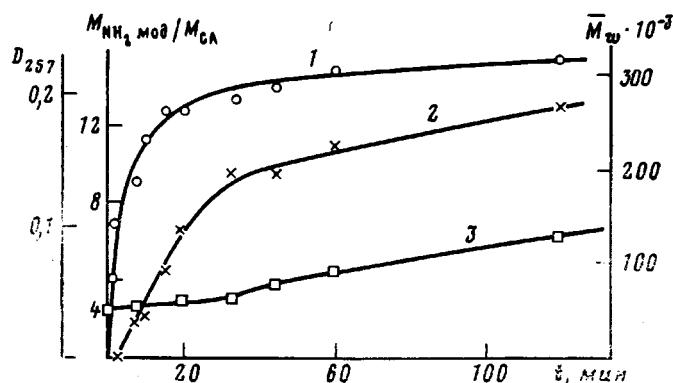


Рис. 2

Рис. 1. Ультрафиолетовые (а) и дифференциальный (б) спектры для различных систем. а: 1–5 – для системы лизин – ГА при мольных соотношениях лизин : ГА = 0,1 (1); 0,2 (2); 0,5 (3); 1,0 (4); 1,5 (5); 6 – СА; 7 – продукты поликонденсации в системе СА – ГА; 8, 9 – исходные растворы лизина (8) и ГА (9). 0,05 м. фосфатный буферный раствор; pH 6,5. б: спектр для системы (СА – ГА) – СА (из кривых 6, 7)

Рис. 2. Кинетика поликонденсации СА с ГА. 1 – $M_{NH_2,mod}/M_{CA}$; 2 – D_t при $\lambda=257$ нм; 3 – M_w . $[CA]=0,73 \cdot 10^{-3}$; $[GA]=0,055$ моль/л; pH 6,7

Рис. 3. Кинетика поликонденсации ГГ с ГА. 1 – D_t при $\lambda=257$ нм, 2 – M_w . $[ГГ]=0,08 \cdot 10^{-3}$; $[GA]=0,06$ моль/л; pH 6,8

става, 55 лизиновых аминокислотных остатков у СА и 38 у ГГ.) ГГ получали осмотическим гемолизом отмытых эритроцитов донорской крови с последующим скоростным центрифугированием для удаления клеточных остатков. Все эксперименты проводили в 0,05 м. фосфатном буферном растворе соответствующих pH. Аминогруппы СА тестирували реакцией с 2,4,6-тринитробензольфукислотой [11]. Модифицированные NH_2 -группы определяли по разности между количеством аминогрупп в исходном и модифицированном белках. Молекулярные массы M_w растворимых белковых олигомеров оценивали по методу, предложенному в работе [12], исходя из ММР, полученного гель-проникающей хроматографией на колонке с сепарозой 6Б, предварительно проактивированной по известным белковым маркерам.

Дифференциальные спектры снимали на спектрофотометре «Specord» ультрафиолетовой области спектра при фиксированной длине волны.

Ранее наблюдали, что взаимодействие ГА с белками сопровождается изменениями в УФ-области спектра в диапазоне длин волн 250–280 мкм. Глутаровый альдегид реагирует в основном с ϵ -аминогруппами лизиновых остатков белка. На примере модельной системы лизин – ГА (рис. 1, а, кривые 1–5) показаны изменения в УФ-области спектра, появляется максимум поглощения $\lambda=265$ –270 мкм, увеличение которого пропорцио-

нально росту мольного соотношения лизин : ГА. Для сравнения в тех же концентрациях приведены спектры исходных компонентов (кривые 8–9). На рис. 1 представлены спектры нативного СА (кривая 6) и СА, модифицированного ГА (кривая 7). Их дифференциальный спектр (рис. 1, б) фиксирует максимальное изменение, относящееся к модификации, при $\lambda=257$ мкм. Аналогичные изменения в дифференциальном спектре получены и для системы ГГ – ГА. Изменения в дифференциальном спектре белков, пропорциональные степени модификации белковой макромолекулы, позволили использовать эту характеристику для исследования процесса поликонденсации белков с ГА [8].

Закономерности модификации белковых макромолекул при поликонденсации можно выявить, исследуя кинетику процесса [13]. Обычно для этой цели реакцию проводят в разбавленных растворах при избытке одного из компонентов. Для тестирования изменений удобно использовать спектрофотометрические методы: измерять величину оптической плотности D при длине волны, где поглощает продукт реакции [14].

На рис. 2 приведены результаты, показывающие изменение ряда параметров в ходе поликонденсации СА с ГА: изменение количества модифицированных аминогрупп (кривая 1), симбатное увеличение оптической плотности при $\lambda=257$ мкм (кривая 2). Параллельно определялись величины M_w методом гель-хроматографии (кривая 3). Для этого отбираемую по времени пробу обрабатывали боргидридом Na для прекращения реакции и затем вводили на колонку с сефарозой 6Б. Сопоставление полученных данных позволяет заключить, что модификация аминогрупп протекает очень быстро: за 10–15 мин модифицируются примерно три четверти наиболее реакционноспособных и доступных групп на макромолекуле белка. За то же время происходят и основные изменения в УФ-спектре, но олигомеры практически не образуются. Очень медленное нарастание молекулярной массы наблюдается только после первого часа поликонденсации. Следовательно, процесс в основном протекает с образованием внутримолекулярных спивок. Для сравнения (рис. 3) приведены данные по поликонденсации ГГ с ГА. Из-за интенсивной окраски ГГ применяемым методом невозможно определить количество модифицированных аминных групп, но изменение величины оптической плотности (кривая 1) дает представление (по аналогии с рис. 2) о характере и скорости их модификации. В этой системе образование олигомерных продуктов начинается с первых минут процесса (кривая 2) и идет параллельно изменению оптической плотности. Отметим, что на рис. 2 и 3 концентрации белков различаются на порядок. Образование белковых олигомеров при избытке ГА наступает при довольно низких концентрациях ГГ ($0,08 \cdot 10^{-3}$ моль/л), в то время как при тех же мольных соотношениях белок : ГА в системе СА – ГА концентрация СА на порядок выше ($0,73 \cdot 10^{-3}$ моль/л), а олигомерные формы образуются довольно медленно. Слабое межмолекулярное взаимодействие в этой системе можно объяснить тем, что процесс поликонденсации протекает в нейтральных водных растворах, где молекулы СА имеют избыточный отрицательный заряд ($pI_{CA}=5,0$), и их взаимное расталкивание может препятствовать межмолекулярным контактам. Поэтому способствовать образованию олигомерных продуктов могут высокие концентрации СА. Влияние концентрации СА на процесс олигомеризации представлено на рис. 4.

Для гемоглобина поликонденсация протекает в благоприятной для межмолекулярных взаимодействий изоэлектрической области белка ($pI_{GG}=6,8$).

Изменения спектральных характеристик в начальный период реакции отражают как внутримолекулярное, так и межмолекулярное спивание белковых молекул, поэтому их можно использовать для расчета констант скорости процесса по уравнению

$$k = \frac{1}{t} \ln \frac{D_t}{D_0},$$

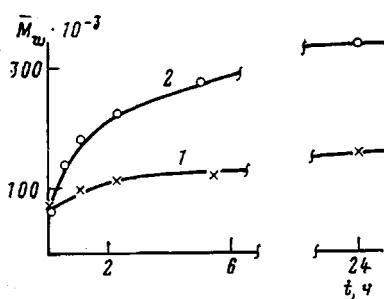


Рис. 4

Рис. 4. Кинетика поликонденсации СА с ГА. $[ГА]=0,028$; $[СА]=0,73 \cdot 10^{-3}$ (1); $1,05 \cdot 10^{-3}$ моль/л (2)

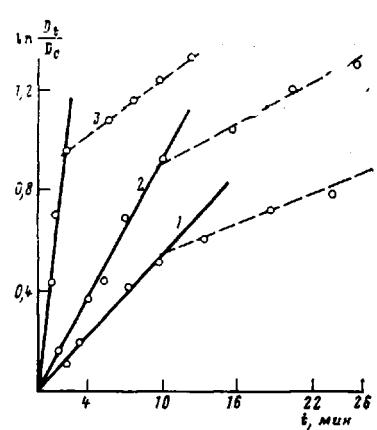


Рис. 5

Рис. 5. Графическое определение констант скорости реакции для системы ГГ — ГА $[ГГ] \cdot 10^{-3}$, моль/л; 1 — 0,031; 2 — 0,155; 3 — 0,333

где k — константа скорости реакции (мин^{-1}), t — время (мин), D_0 и D_t — величины оптической плотности при $\lambda=257$ мкм растворов белка исходного и модифицированного за время t соответственно. Для системы ГГ — ГА (рис. 5) представлены зависимости графического определения констант скорости реакции по начальному участку. Полученные в координатах $\ln(D_t/D_0)-t$ прямые указывают на реакцию псевдопервого порядка по отношению к белку. Следует отметить, что вариация в концентрациях ГГ от $0,031 \cdot 10^{-3}$ до $0,333 \cdot 10^{-3}$ моль/л дает изменение величины константы скорости реакции тоже на порядок: от $0,044$ до $0,47 \text{ мин}^{-1}$. Вариация концентрации спивающего агента играет существенную роль в процессе модификации. В табл. 1 приведены результаты, характеризующие процесс поликонденсации в системе СА — ГА при изменении концентрации спивающего агента для двух значений pH. Сильное влияние концентрации водородных ионов на реакцию между альдегидной и аминной группами обсуждалось в работе [6]. Реакция поликонденсации белков с ГА рассматривается в довольно узкой области pH 5–8, где исследуемые белки не претерпевают конформационных изменений. Известно, что альдегидные группы реагируют только с непротонированными аминогруппами. Следовательно, в первую очередь модифицируются группы белка с более низкими значениями величин pK_a . Изменения констант скорости реакции для СА и ГГ в зависимости от величины pH раствора представлены на

Таблица 1

Влияние концентрации ГА на константы скорости реакции и модификацию аминогрупп при поликонденсации в системе СА — ГА $[СА]=0,14 \cdot 10^{-3}$ моль/л, 24° , время модификации групп NH_2 2 ч

$[ГА] \cdot 10^2$ моль/л	pH 5,2		pH 8,2		$[ГА] \cdot 10^2$ моль/л	pH 5,2		pH 8,2	
	$k \cdot 10^2$, мин^{-1}	$M_{NH_2\text{mod}}^*/M_{CA}$	$k \cdot 10^2$, мин^{-1}	$M_{NH_2\text{mod}}^*/M_{CA}$		$k \cdot 10^2$, мин^{-1}	$M_{NH_2\text{mod}}^*/M_{CA}$	$k \cdot 10^2$, мин^{-1}	$M_{NH_2\text{mod}}^*/M_{CA}$
0,07	—	—	7,5	2,5	0,67	5,0	5,7	80,0	15,6
0,14	0,7	1,3	15,5	6,3	0,91	—	7,0	175,0	20,0
0,29	2,0	3,5	25,5	8,5	1,43	16,7	9,2	—	—
0,48	3,0	5,0	—	12,5					

* $M_{NH_2\text{mod}}^*/M_{CA}$ — количество модифицированных групп NH_2 в молекуле СА.

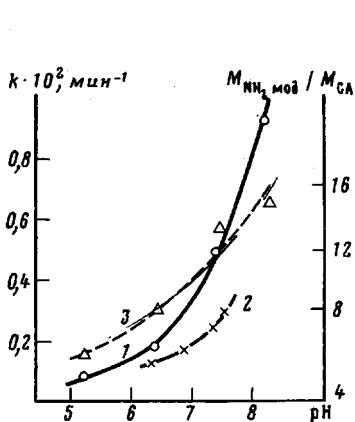


Рис. 6

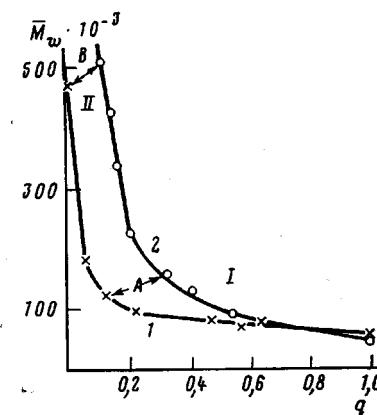


Рис. 7

Рис. 6. Влияние pH раствора на величины констант скорости реакции белков с ГА $[CA]=0,16 \cdot 10^{-3}$; $[ГГ]=0,164 \cdot 10^{-3}$; $[ГА]=0,0067$ моль/л. 1 – система СА – ГА; 2 – система ГГ – ГА; 3 – $M_{NH_2, \text{мод}} / M_{CA}$; время поликонденсации 2 ч

Рис. 7. Олигомеризация белков в ходе поликонденсации в системах СА – ГА (1) и ГГ – ГА (2). $[CA]=0,73 \cdot 10^{-3}$, $[ГГ]=0,77 \cdot 10^{-3}$ моль/л. На оси абсцисс – доля оставшегося мономера-белка. Пояснения в тексте

рис. 6. Определение констант скорости реакции поликонденсации при разных температурах ($10\text{--}24^\circ$) позволило оценить для системы ГГ – ГА энергию активации E_a по соотношению Аррениуса.

В табл. 2 приведены полученные значения энергий активации. Следует отметить, что выбраны системы ГГ – ГА, в которых величины констант скоростей сильно различаются. Как видно, меньшая энергия активации требуется для процесса, протекающего в условиях высокой концентрации белка и низкого соотношения ГА : белок, когда предпочтительнее образование межмолекулярных ковалентных мостиков. Известно, что для реакции СА – ГА энергия активации составляет 44,3 кДж/моль [8]. Эта величина сравнима с полученными значениями для поликонденсации ГГ с ГА, в основе которой лежат идентичные реакции модификации аминных групп белка. Рассчитанные величины энергии активации существенно ниже энергий, при которых денатурируют белки (>120 кДж/моль), что позволяет при поликонденсации в мягких условиях сохранять нативную белковую конформацию.

Интересно проследить реакцию поликонденсации белков с ГА с точки зрения образования олигомерных продуктов. Нарастание величины средневесовой молекулярной массы в ходе поликонденсации ГГ и СА с ГА продемонстрировано на рис. 7. Реакция для обоих белков протекает в идентичных условиях. В процессе поликонденсации четко прослеживается наличие двух этапов олигомеризации. Первый связан с модификацией белковых макромолекул и их олигомеризацией с образованием в основном ди- и тримеров, при этом значительно убывает доля оставшегося мономерного белка – до 0,15–0,25 от исходного количества, т. е. основной белковый компонент находится в олигомерной форме. Для системы ГГ –

Таблица 2

Определение энергии активации в системе ГГ – ГА
(pH 6,9, $T_1=283$ К, $T_2=297$ К)

$[ГГ] \cdot 10^3$ моль/л	Мольное отношение ГА : ГГ	$k_{T_1} \cdot 10^2$	$k_{T_2} \cdot 10^2$	E_a , кДж/моль
		мин ⁻¹	мин ⁻¹	
0,775	17	0,55	0,95	29
0,155	50	3,78	9,78	48

ГА первый этап (до положения A) протекает за 20 мин, а для системы СА – ГА – за 2 ч. Когда в ходе поликонденсации мономер практически израсходован, начинается вторая стадия – резко увеличивается молекулярная масса. Иными словами, при достижении значительной концентрации белковых олигомеров начинается их сшивание друг с другом с образованием высокомолекулярных продуктов. Для обеих систем эти процессы идут параллельно, но с большой разницей во времени, как видно из рис. 7. Так, $M \sim 500 \cdot 10^3$ достигается для системы ГГ – ГА за 1 ч, а в случае СА – ГА необходимы сутки. Причину этого следует искать как в различии электрохимического состояния белковых глобул, так и в разном характере распределения аминогрупп на поверхности макромолекул исследуемых белков. Вариация условий поликонденсации СА с ГА, как было показано, дает возможность управлять процессом получения высокомолекулярных олигоальбуминов. Второй этап в сшивании белковых макромолекул также был обнаружен по изменению параметров светорассеяния для системы α -химотрипсин – ГА [15].

ЛИТЕРАТУРА

1. Hopwood D. In: Fixation in Histochemistry/Ed. by Stoward P. J. L.: Chapman and Hall, 1973, p. 47.
2. Monsan P., Puzo G., Mazarguil H. Biochemie, 1975, v. 57, № 11/12, p. 1281.
3. Peter K., Richard F. M. Ann. Rev. Biochem., 1977, v. 46, p. 523.
4. Richard F. M., Knowles J. R. J. Molec. Biol., 1968, v. 37, № 1, p. 231.
5. Margel S., Rembaum A. Macromolecules, 1980, v. 13, № 1, p. 19.
6. Feeney R. E., Blankenhorn G., Dixon H. B. F. Advances Protein Chem., N. Y.–L.: Acad. Press, 1973, v. 29, p. 135.
7. Acharya A. S., Sussman L. G., Manning J. M. J. Biol. Chem., 1983, v. 258, № 4, p. 2296.
8. Hopwood D., Allen C. R., McCabe M. Histochem. J., 1970, v. 2, p. 137.
9. Белки/Под ред. Нейрат Г., Бейли К. М.: Изд-во иностр. лит., 1958, т. 3, с. 324, 408.
10. Roe H. R., Mitchel G. Anal. Chem., 1951, v. 23, № 12, p. 1758.
11. Fields R. Biochem. J., 1971, v. 124, p. 581.
12. Catsimpoolas N. Anal. Biochem., 1974, v. 61, № 1, p. 101.
13. Гаммет Л. В кн.: Основы физической органической химии. М.: Мир, 1972, с. 71.
14. Экспериментальные методы химической кинетики/Под ред. Эмануэля Н. М., Сергеева Г. Б. М.: Высш. шк., 1980.
15. Tomimatsu Y., Jansen E. F., Gaffield W., Olson A. C. J. Colloid Interface Sci., 1971, v. 36, № 1, p. 51.

Институт высокомолекулярных
соединений АН СССР

Поступила в редакцию
16.VII.1984

STUDIES OF KINETICS OF POLYCONDENSATION OF BIOPOLYMERS

Kuznetsova N. P., Samsonov G. V.

Summary

The kinetics of polycondensation of human serum albumin and hemoglobin has been studied by spectrophotometric method. The pseudofirst order of the reaction towards the proteins was found. The influence of components concentrations and pH value of the reaction medium on the values of rate constants was shown. For the hemoglobin – glutaric anhydride system the value of the activation energy was evaluated being equal to 29–48 kJ/mol for various conditions. The effect of the electrochemical state of the protein macromolecule on formation of intermolecular bonds was determined. Oligomerization of proteins up to highmolecular products was shown to proceed in two stages.