

УДК 541.64:539.2

**ХИМИЧЕСКАЯ МОДИФИКАЦИЯ ЛИЗОЦИМА  
ВОДОРАСТВОРIMЫМ ПОЛИМЕРОМ.  
СТРУКТУРА И СВОЙСТВА КОНЬЮГАТА**

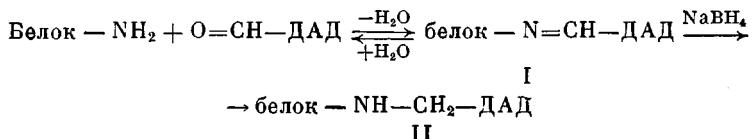
Ануфриева Е. В., Паутов В. Д., Краковяк М. Г.,  
Ананьева Т. Д., Лущик В. Б.

Для изучения реакции между альдегидсодержащими макромолекулами модифицированного дексстрана и аминосодержащими макромолекулами глобулярного белка лизоцима в водных растворах использован метод поляризованной люминесценции, позволяющий оценивать степень связывания каждого из люминесцентно-меченых компонентов. Получены данные о влиянии соотношения реагентов и условий реакции на ее скорость, определен состав растворимого конъюгата с максимальным содержанием белка, показано, что такой конъюгат в водном растворе имеет компактную структуру с близко расположенными белковыми глобулами.

Одним из способов химической модификации белков, используемых, в частности, для увеличения стабильности, для уменьшения токсичности и аллергенности водорастворимых ферментных препаратов, является ковалентное связывание белковых макромолекул с макромолекулами природных или синтетических полимеров [1, с. 159]. Межмакромолекулярные реакции белок — полимер в зависимости от химического строения макромолекул и реакционных условий могут приводить к образованию конъюгатов различного строения и, как следствие этого, различной стабильности и биологической активности. Настоящая работа посвящена исследованию реакции между аминосодержащим белком — лизоцимом ( $M=1,46 \cdot 10^4$ , в составе макромолекулы шесть остатков лизина с ε-аминогруппами) и альдегидсодержащим водорастворимым полимером, а также строения образующегося при этом конъюгата.

В качестве альдегидсодержащего полимера в настоящей работе использован водорастворимый химически модифицированный полисахарид — дексран с  $M=(6-8) \cdot 10^4$ , у которого ~25% глюкопиранозных циклов в цепи превращены в звенья, содержащие по две альдегидные группы (название полимера диальдегиддексран (ДАД)) [1, с. 48]. Среднее содержание альдегидных групп в цепи полимера 200–250.

При взаимодействии аминогруппы белка и альдегидной группы полимера в водном растворе в мягких условиях образуется азометиновая связь (I), которая при последующем восстановлении боргидридом натрия может быть превращена в более гидролитически устойчивую связь (II).



(В процессе реакции с боргидридом натрия свободные альдегидные группы полимерной системы превращаются в гидроксильные.) Подобные реакции широко используют для модификации ферментов [1, с. 72].

Данные об особенностях протекания реакции белок — полимер и о структуре конъюгата получены на основе изучения динамических свойств взаимодействующих макромолекул. Для измерения динамических характеристик — времен релаксации макромолекул лизоцима и ДАД как в свободном, так и в ковалентно связанном друг с другом состояниях — применен метод поляризованной люминесценции, позволяющий исследовать наносекундную динамику макромолекул в разбавленных растворах и в различных средах, включая водные [2]. Этот метод основан на измерении параметров свечения полимеров с ковалентно присоединенными люминесцирующими группами.

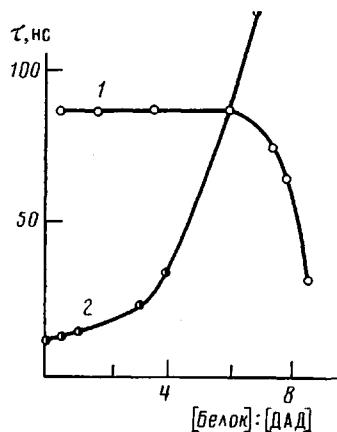


Рис. 1

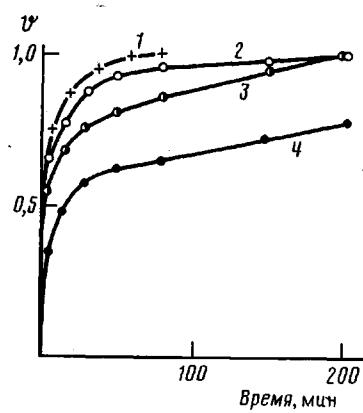


Рис. 2

Рис. 1. Зависимость времен релаксации  $\tau$ , характеризующих подвижность белковых глобул (лизоцима) как целого (1) и внутримолекулярную подвижность полимерных цепей ДАД (2) в реакционной системе (в боратном буфере, pH 9; 25°, [ДАД]=1 мг/мл, через 3 ч после смешения реагентов) от соотношения макромолекул [белок] : [ДАД]

Рис. 2. Зависимость доли  $\psi$  белка (лизоцима), вступившего в реакцию с полимером (ДАД) при разном исходном соотношении макромолекул белка и полимера в реакционной системе, от времени протекания реакции (pH 9; 25°). [Белок] : [ДАД]=0,6 (1); 1,8 (2); 3,5 (3) и 7,6 (4). [Белок]=0,4 мг/мл

пами (метками). Поочередное присоединение меток к белку и к полимеру делает возможным исследование динамических свойств каждого из макрореагентов в реакционной системе и каждого из компонентов в конъюгате.

Люминесцирующие антраценсодержащие метки присоединены к лизоциму<sup>1</sup> с помощью 9-антрилметилизоцианата, активно взаимодействующего с аминогруппами белка [3]. Люминесцентно-меченный белок (белок\*) содержал в среднем 1 метку на 2,7 макромолекулы. ДАД, содержащий в среднем одну люминесцирующую метку на макромолекулу (ДАД\*), получен при реакции альдегидных групп полимера с 9-антрилметиламином (аналогично [4]).

В водном растворе при pH 5 (фосфатный буфер) и 25° реакция между аминогруппами белка и альдегидными группами полимера не идет, и при различных соотношениях компонентов в системе значения времен релаксации  $\tau$  как лизоцима, так и ДАД не изменяются. При увеличении pH до 9 (боратный буфер) реакция между белком и ДАД (при соотношении макромолекул [белок] : [ДАД] ≤ 1) идет очень быстро, уже за время смешения компонентов реакционного раствора белковые глобулы теряют подвижность как целого, значения  $\tau_b$  при этом изменяются от 17 до 86 нс (рис. 1). Важно отметить, что изменение времен релаксации связано с образованием ковалентных мостиков (I): при замене ДАД на полимер, полученный превращением альдегидных групп ДАД в гидроксильные, значения  $\tau_b$  не меняются. При увеличении количества молекул белка в реакционной системе ([белок] : [ДАД] > 1) реакция присоединения последующих глобул к полимерным цепям ДАД замедляется, хотя за длительное время реакции доля молекул лизоцима, связанных с полимером, заметно возрастает (рис. 2).

В результате реакции с белком динамические характеристики цепей ДАД также изменяются — уменьшается их внутримолекулярная подвижность (рис. 1). Анализ изменения времен релаксации  $\tau_{DAD}$  позволяет сделать некоторые заключения об особенностях протекания реакции и характере связей между лизоцимом и ДАД.

Получены данные, показывающие, что первые макромолекулы ДАД реагируют со свободными молекулами белка за время смешения компонентов, а реакция следующих макромолекул ДАД с модифицированным

<sup>1</sup> Лизоцим любезно предоставлен Н. П. Кузнецовой, диальдегиддексстран — Б. В. Москвичевым.

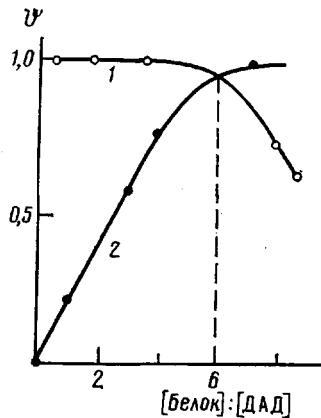


Рис. 3

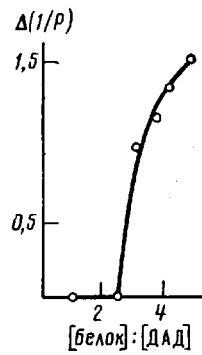


Рис. 4

Рис. 3. Зависимость доли  $\Phi$  макромолекул лизоцима (1) и полимера ДАД (2), вошедших в конъюгат белок – полимер, от исходного макромолекулярного соотношения лизоцима и ДАД в реакционной системе (рН 9; 25°, длительность реакции 3 ч)

Рис. 4. Зависимость эффективности миграции энергии электронного возбуждения (величина  $\Delta(1/P)$ ) люминесцентно-меченых молекул белка в конъюгате белок – ДАД от состава конъюгата

белком (при соотношении [белок]:[ДАД]<1) значительно замедляется, как замедляется и реакция лизоцима с модифицированной (присоединением к белковой глобуле) цепью ДАД (при соотношении [белок]:[ДАД]>1). Изменение  $\tau_{\text{ДАД}}$  при реакции с белком от 11 до 14 нс ([белок]:[ДАД]=1) или до 33 нс ([белок]:[ДАД]=4) свидетельствует о том, что между цепью ДАД и молекулой белка возникают не один, а несколько контактов. Такими контактами кроме ковалентных мостиковых связей, образующихся в результате реакции, могут быть и водородные связи между группами С=О ДАД и протонодонорными группами белка, а после обработки конъюгата NaBH<sub>4</sub> – между OH-группами полимера и протоноакцепторными группами белка. Действительно, при введении конъюгата в 8 м. раствор мочевины, разрушающий межмакромолекулярные водородные связи, внутримолекулярная подвижность цепей ДАД в конъюгате увеличивается:  $\tau_{\text{ДАД}}$  уменьшается в 2 раза, но остается более заторможенной, чем у свободных цепей ДАД. Следовательно, между цепью ДАД и белковой глобулой в данных условиях образуется не менее двух ковалентных мостиков, и их образование способствует последующему возникновению межмакромолекулярных водородных связей.

Ниже представлены значения  $\tau$  (в нс), приведенные к значениям вязкости 0,89 мПа·с при рН 9 и 25°. При этом первая величина относится к макромолекулам, находящимся в свободном состоянии, а в знаменателе – в системе белок – ДАД при значениях [белок]:[ДАД], указанных в скобках. Концентрация ДАД во всех случаях 1 мг/мл.

Растворитель	Боратный буфер рН 9	Боратный буфер NaBH <sub>4</sub> (0,25 мг/мл)	Боратный буфер с 8 м. мочевины
$\tau_b$	17/86 (<6)	17/80 (<6)	16,5/43 (<6)
$\tau_{\text{ДАД}}$	11/14 (1)	12/33 (4)	10/15 (4)
	11/34 (4)		

При большом содержании белка в реакционной системе (при соотношении [белок]:[ДАД]>6) образуется конъюгат, в котором на одну цепь ДАД приходится шесть молекул белка. Состав конъюгата определялся по значению [белок]:[ДАД], соответствующему минимальному содержанию свободных компонентов в растворе (рис. 3). Доли связанного белка или полимера оценивали с помощью соотношения

$$\frac{\Phi}{\tau_{\text{связ}} + (1-\Phi)/\tau_{\text{своб}}} = 1/\tau,$$

где  $\tau$  — измеренное среднее время релаксации, характеризующее релаксационный спектр смеси свободных и связанных макромолекул каждого из реагентов, выделяемого присоединением люминесцирующей метки.

Важной особенностью строения конъюгата с высоким содержанием белковых молекул, присоединенных к цепи, является компактное расположение молекул белка в конъюгате. Об этом же свидетельствует изменение поляризации люминесценции  $\Delta(1/P)$  конъюгата белок \* — полимер в растворе, связанное с появлением миграции энергии электронного возбуждения люминесцентно-меченых молекул белка, возможным лишь при уменьшении расстояния между молекулами до  $\sim 100$  Å (рис. 4).

Указанные особенности строения конъюгатов белок — полимер при различных соотношениях компонентов в реакционной системе необходимо учитывать при модификации белков с помощью макрореагентов, так как с ними могут быть связаны изменения ферментативной активности модифицированных белков.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Платэ Н. А., Васильев А. Е. Физиологически активные полимеры. М., 1986.
2. Ануфриева Е. В., Краковяк М. Г. // Высокомолек. соед. А. 1987. Т. 29. № 2. С. 211.
3. Краковяк М. Г., Лущик В. Б., Сычева Е. А., Ануфриева Е. В. // Высокомолек. соед. Б. 1986. Т. 28. № 4. С. 289.
4. Краковяк М. Г., Лущик В. Б., Ананьева Т. Д., Панарин Е. Ф., Соловский М. В., Горбунова О. П., Гаврилова И. И., Кирш Ю. Э., Паутов В. Д., Рамазанова М. Р., Ануфриева Е. В. // Высокомолек. соед. А. 1987. Т. 29. № 3. С. 598.

Институт высокомолекулярных  
соединений АН СССР

Поступила в редакцию  
13.VII.1987

#### CHEMICAL MODIFICATION OF LISOCIME WITH WATER-SOLUBLE POLYMER. STRUCTURE AND PROPERTIES OF A CONJUGATE

Anufrieva Ye. V., Pautov V. D., Krakovyak M. G.,  
Anan'eva T. D., Lushchik V. B.

#### Summary

The reaction between aldehyde-containing macromolecules of modified dextrane and amine-containing macromolecules of the globular protein — lisocime — in aqueous solutions has been studied by polarized luminescence method permitting to evaluate the degree of binding of each luminescently labelled component. The effect of the reactants ratio and reaction conditions on the rate of the reaction was shown and the composition of the soluble conjugate having the maximal content of the protein was determined. The compact structure with nearly disposed protein globules for such conjugate in aqueous solution was proved.