

УДК 541.64:542.954:539.2

Н. П. Кузнецова, С. И. Кленин, Л. А. Волкова,
Л. Р. Гудкин, Г. В. Самсонов

ПОЛИКОНДЕНСАЦИЯ БИОПОЛИМЕРОВ И МОРФОЛОГИЯ ОБРАЗУЮЩИХСЯ МАКРОМОЛЕКУЛ

Изучена поликонденсация гемоглобина и сывороточного альбумина с глутаровым альдегидом при варировании рН и концентрации компонентов. На основании исследования ММ продуктов установлено влияние заряда белка на образование олигомеров. Методами электрофореза в ПААГ в присутствии додецилсульфата натрия и седиментационно-диффузионного анализа изучены гидродинамические свойства и морфология олигомеров белков. Показано, что олигомеры на уровне тетрамеров гемоглобина обладают компактной структурой, близкой к глобулярной. Плотное расположение белковых молекул в олигомере подтверждено методом малоуглового рассеяния рентгеновских лучей.

Взаимодействие макромолекул белков с глутаровым альдегидом (ГА) протекает по механизму поликонденсации. В основе процесса лежит реакция конденсации аминогрупп биополимера с альдегидными группами низкомолекулярного сшивающего агента. Образование внутри- и межмолекулярных мостиков зависит от общего числа реакционноспособных остатков аминокислот, и особенно от их распределения на поверхности белковой глобулы. Поликонденсация белковых молекул с ГА рассматривается на примере сывороточного альбумина (СА) и гемоглобина человека, которые выступают в реакции в качестве полифункциональных мономеров.

В работе сделана попытка охарактеризовать процесс поликонденсации биополимеров с ГА и исследовать морфологию полученных растворимых продуктов.

Исследовали следующие белки: плацентарный СА человека ($M=68\,000$, рI 5,0); гемоглобин крови человека ($M=65\,000$, рI 6,8); ГА фирмы «Реанал» (ВНР), перегнанный под вакуумом.

Содержание аминогрупп в биополимере определяли с 2,4,6-тринитробензолсульфокислотой [1], количество модифицированных аминогрупп рассчитывали по разности между исходным количеством и оставшимся после реакции. Концентрацию альдегидных групп определяли методом дифференциальной рН-метрии [2].

ММР продуктов поликонденсации изучали с помощью ГПХ, из него рассчитывали величины средних ММ [3].

Диск-электрофорез в поликариламидном геле (ПААГ) осуществляли в присутствии 0,1 додецилсульфата натрия (ДС-На) [4, 5]. Для разделения использовали 5–15%-ный гель, *трис*-глициновый буфер, рН 8,3.

Седиментационно-диффузионный анализ проводили на ультрацентрифуге МОМ 3170, поступательной диффузии – на поляризационном диффузометре. Обработку экспериментальных данных проводили по общепринятой методике [6].

Среднеквадратичный радиус инерции макромолекул определяли методом малоуглового диффузного рассеяния рентгеновских лучей на дифрактометре ДРОН-1 в сочетании с малоугловой приставкой с коллимационной системой типа Кратки. Для интерпретации кривых рассеяния использовали метод Гинье [7].

В процессе поликонденсации белковых молекул с ГА в результате образования межмолекулярных связей значительно увеличивается ММ продуктов. Для характеристики процесса поликонденсации белков следует сопоставить изменение величины средней ММ олигомеров со степенью химической модификации аминогрупп белка в соответствии с условиями реакции.

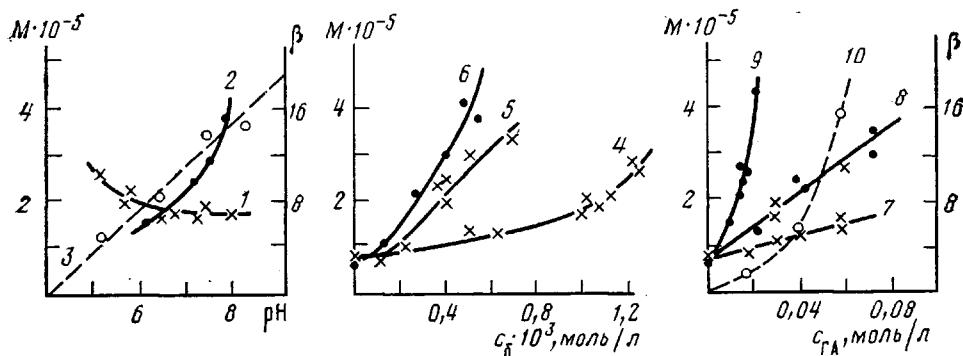


Рис. 1. Влияние pH раствора (1–3), концентрации белка (4–6) и ГА (7–10) на величины ММ образующихся олигомеров. Продолжительность реакции 1 ч. 1 – ОСА; 2 – ОГ; 3 – количество модифицированных аминогрупп на одну молекулу СА, равное $M_{\text{NH}_2}/M_{\text{CA}}$; 4 – ОСА, ионная сила раствора $I=0,07$; 5 – ОСА, $I=0,3$; 6 – ОГ, $I=0,1$; 7 – ОСА, $[\text{CA}]=7,3 \cdot 10^{-4}$ моль/л; 8 – ОСА, $[\text{CA}]=1 \cdot 10^{-3}$ моль/л, ОГ, [гемоглобин] = $1,6 \cdot 10^{-4}$ моль/л; 9 – ОГ, [гемоглобин] = $7,5 \cdot 10^{-4}$ моль/л; 10 – β

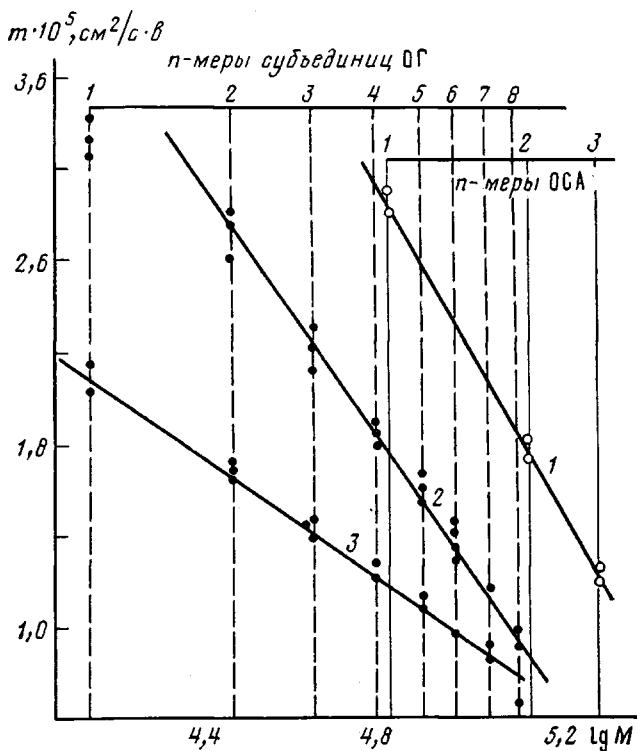


Рис. 2. Зависимости электрофоретической подвижности m от логарифма ММ (электрофорез смеси белковых олигомеров в ПААГ в присутствии DC-Na ОСА (1) и ОГ (2, 3)). Разделение ОСА в 5%-ном геле (1), мультиплетов субъединиц гемоглобина в 10%-ном (2) и 15%-ном геле (3)

На рис. 1 продемонстрировано влияние pH раствора на величину ММ олигомеров на основе гемоглобина и СА (ОГ и ОСА); продолжительность реакции 1 ч, реакцию останавливали добавлением боргидрида натрия. При повышении pH растворов с 6,5 до 8,0 молекулярная масса ОГ возрастает, а ОСА остается на уровне ди- и тримеров, несмотря на повышение степени модификации аминогрупп СА. Это может быть связано с различным распределением аминогрупп в молекулах гемоглобина и СА, а также со значительным влиянием общего заряда белка на процесс образования олигомеров. Повышение ММ ОСА в ходе реакции наблюдается при уменьшении избыточного отрицательного заряда СА, вызван-

ного смещением рН раствора в сторону изоэлектрической области СА (рI 5,0). Подтверждает это влияние ионной силы раствора на молекулярную массу ОСА, повышение которой приводит к экранированию избыточного отрицательного заряда СА и снижает эффект электростатического отталкивания между белковыми молекулами (рис. 1).

На примере системы СА – ГА показано, что рост концентрации сшивавшего агента, как и увеличение pH раствора, интенсифицирует модификацию аминогрупп (рис. 1), но в заданных условиях практически мало меняет величину ММ олигомеров СА, в то время как для системы гемоглобин – ГА в идентичных условиях модификация аминогрупп приводит к существенному росту ММ олигомеров. Образование межмолекулярных связей при поликонденсации СА с ГА усиливается при значительном возрастании концентрации белка (рис. 1), что приводит к увеличению молекулярной массы ОСА. Наиболее наглядно это продемонстрировано на рис. 1: в реакции с ГА для получения примерно одинаковых средних ММ при прочих равных условиях необходимы концентрация СА, равная $1,0 \cdot 10^{-3}$, а гемоглобина $1,6 \cdot 10^{-4}$ моль/л, т. е. концентрации белка различаются в ~ 6 раз.

В результате поликонденсации биополимеров с ГА образуется набор макромолекул, имеющих полидисперсность по составу [8]. Методом диск-электрофореза в ПААГ в присутствии детергента можно получить информацию о наличии отдельных компонентов в полидисперсной смеси продуктов. Метод электрофореза в ПААГ в присутствии ДС-На используют для разделения белков по ММ [5], а также для идентификации субъединиц в белках, обладающих четвертичной структурой [9]. В широкой области ММ для этого метода наблюдается линейное соотношение между скоростью миграции белка к аноду t и логарифмом ММ.

На рис. 2 представлено разделение компонентов ОСА и ОГ в ПААГ в присутствии ДС-На. В случае ОСА на электрофорограмме наблюдается присутствие трех компонентов от мономера до тримера СА (рис. 2, прямая 1), которые выступают как индивидуальные белковые макромолекулы и для которых, как и для любых белковых глобул, наблюдается линейная зависимость электрофоретической подвижности от логарифма ММ, соответствующая моно-, ди-, тримерам СА и кратная 68 000. В идентичных условиях электрофорез ОГ дает разделение по ММ мультиплетов его сшитых субъединиц с ММ, кратной 16 000. Молекула гемоглобина обладает четвертичной структурой и состоит из четырех субъединиц – двух α и двух β полипептидных цепей, имеющих $M=16\,000$. В растворе с ДС-На молекула гемоглобина диссоциирует на отдельные субъединицы. Функционально активной является только тетramerная макромолекула.

Поликонденсация гемоглобина с ГА вызывает ковалентное связывание субъединиц и может стабилизировать четвертичную структуру гемоглобина. Поэтому методом электрофореза в ПААГ на фоне ДС-На идентифицируются в качестве индивидуальных компонентов n -меры субъединиц гемоглобина (рис. 2). Так, для ОГ со средней $M \sim 130\,000$ электрофорезом обнаруживаются мультиплеты ковалентно связанных двух-четырех субъединиц; для $M=210\,000-270\,000$ обнаружен набор мультиплетов до восьми субъединиц. Линейная зависимость электрофоретической подвижности белковых олигомеров от логарифма ММ, полученная методом электрофореза в ПААГ в присутствии ДС-На, указывает на гомологический характер олигомеров СА и гемоглобина. Можно предположить, что химическая сшивка белковых молекул создает близкую к глобулярной структуру, не приводит к заметным изменениям морфологии сшитой макромолекулы, и мы имеем дело с гомологическим рядом.

Для проверки этого предположения абсолютным методом седиментационно-диффузионного анализа были определены ММ и некоторые молекулярные параметры выделенной фракции ОГ. Для этого совокупностью гель-хроматографии, рехроматографии с ультрафильтрацией была выделена узкая фракция ОГ со средней ММ, равной 280 000 (определенена методом ГПХ). Коэффициент диффузии этой фракции ОГ оказался равным $D_0 = (3,3 \pm 0,2) \cdot 10^{-7} \text{ см}^2/\text{с}$. Как видно из рис. 3, константа седиментации

Рис. 3. Зависимость обратной величины константы седиментации $1/S$ от концентрации ОГ (Фракция)

Рис. 4. Кривые интенсивности рассеяния рентгеновских лучей под малыми углами для гемоглобина (2 г/дл) (1) и для фракции ОГ (3 г/дл) (2)

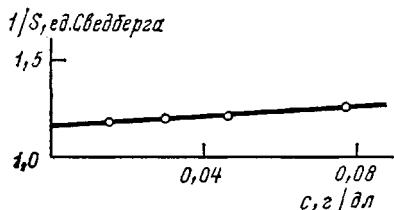


Рис. 3

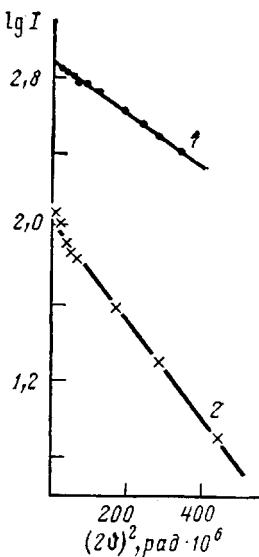


Рис. 4

$S_0 = 8,6 \cdot 10^{-13} \text{ с}^{-1}$. По формуле Сведберга

$$M_{SD} = \frac{S_0}{D_0} \frac{RT}{(1 - \bar{V}\rho_0)},$$

где R — газовая постоянная; T — абсолютная температура; ρ_0 — плотность растворителя (0,1 м. фосфатный буферный раствор); \bar{V} — удельный парциальный объем ($\bar{V}=0,75$), можно определить $M_{SD}=250\,000$, что находится в хорошем согласии с данными гель-хроматографии (280 000).

Воспользовавшись гидродинамическим инвариантом [10]

$$A_0 = \eta_0 D (M[\eta])^{1/2} T^{-1} = 3,4 \cdot 10^{-10} \text{ эрг/град}$$

и экспериментальными данными D_0 и $[\eta]$, можно оценить величины

$$M_{D\eta} = \left(\frac{A_0 T}{\eta_0 D} \right)^{1/2} [\eta] = 270\,000$$

или по S_0 и $[\eta]$

$$M_{S\eta} = \left(\frac{R}{A_0} \right)^{1/2} \left[\frac{S_0 \eta_0}{1 - \bar{V}\rho_0} \right]^{1/2} [\eta]^{1/2} = 230\,000$$

Межмолекулярное ковалентное связывание предполагает близкое взаимное расположение белковых глобул. Очень близкие значения ММ ОГ (совпадающие в пределах погрешности), полученные разными методами, свидетельствуют, с одной стороны, о сравнительно небольшой полидисперсности фракции ОГ, а с другой — являются подтверждением того, что морфология молекул гемоглобина при их поликонденсации с ГА существенно не изменилась. Как и индивидуальный белок макромолекула ОГ представляет собой близкую к глобулярной структуру, состоящую из плотноупакованных, ковалентно связанных друг с другом глобул гемоглобина. Действительно, ММ выделенной фракции ОГ, определенная абсолютным методом по экспериментальным данным седиментации S_0 и диффузиями (D_0) $M_{SD}=250\,000$ в пределах погрешности эксперимента равна четырем ММ гемоглобина ($M_{SD}=65\,000$) [11], в то время как гидродинамические размеры полученных структур, определенные по S_0 и D_0 ($S_0^{\text{ОГ}}/S_0^{\text{Г}} \approx (D_0^{\text{Г}}/D_0^{\text{ОГ}})$), отличаются в 2 раза, что довольно близко к теоретическому значению этой величины для сплошной сферы, равному 1,6. Дополнительным доказательством глобулярности структуры служит слабая зависимость величины $1/S$ ОГ-фракции от концентрации (рис. 3).

Соотношения размеров тетramerной фракции ОГ и исходного гемо-

глобина, полученные разными методами, однозначно свидетельствуют о компактной структуре белкового олигомера. Доказательство компактной, близкой к глобулярной структуре тетрамера гемоглобина может свидетельствовать о полимергомологических превращениях этого белка при взаимодействии с ГА.

Еще более убедительное доказательство плотной упаковки белковых молекул в тетрамере ОГ дает изучение рассеяния рентгеновских лучей под малыми углами и определение электронного радиуса инерции макромолекул R_0 . На рис. 4 представлены кривые интенсивности рассеяния для гемоглобина и фракция тетрамера ОГ. Как для гемоглобина, так и олигомера получены прямолинейные зависимости. Это означает, что исследуемые макромолекулы гемоглобина и ОГ — индивидуальные вещества. Наклон прямых характеризует радиус инерции макромолекул гемоглобина и фракции ОГ. Величина радиуса инерции, полученная для гемоглобина, хорошо согласуется с литературными данными $R_0=2,34$ нм. Фракция ОГ состоит в основном из макромолекул с $R_0=3,2$ нм, что свидетельствует об их высокой плотности.

Соотношение размеров мономера гемоглобина и его олигомерной формы (тетрамера), полученные совокупностью различных методов, однозначно свидетельствуют о компактной структуре модифицированного белкового олигомера.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Fields R. // Biochem. J. 1971. V. 124. P. 584.
2. Rhoe H. R., Mitcel J. M., Jr. // Analyt. Chem. 1951. V. 23. № 12. P. 1758.
3. Кузнецова Н. П., Самсонов Г. В. // Высокомолек. соед. А. 1985. Т. 27. № 12. С. 2611.
4. Mayrер Г. Диск-электрофорез. М., 1971.
5. Weber K., Osborn M. // The Proteins. 3rd ed. V. 1/Ed. by Neurath H., Hill R. L. N. Y., 1975. P. 179.
6. Цветков В. Н., Эскин В. Е., Френкель С. Я. Структура макромолекул в растворах. М., 1964. С. 370.
7. Guinier A., Fournet G. Small Angle Scattering of X-rays. N. Y. 1955.
8. Кузнецова Н. П., Самсонов Г. В. // Высокомолек. соед. А. 1986. Т. 28. № 3. С. 658.
9. Shapiro A. L., Vinuela E., Maizel J. V. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1967. V. 28. № 5. P. 815.
10. Цветков В. Н., Кленин С. И. // Докл. АН СССР. 1953. Т. 88. № 1. С. 49.
11. Тенфорд Ч. Физическая химия полимеров. М., 1965.

Институт высокомолекулярных
соединений АН СССР

Поступила в редакцию
21.01.88

N. P. Kuznetsova, S. I. Klenin, L. A. Volkova,
R. L. Gudkin, G. V. Samsonov

POLYCONDENSATION OF BIOPOLYMERS AND MORPHOLOGY OF FORMED MACROMOLECULES

Summary

Polycondensation of hemoglobin and serum albumin with glutaric aldehyde has been studied for various pH and components concentration. Basing on the data about MM the effect of the protein charge on formation of oligomers was shown. Hydrodynamic properties and morphology of proteins oligomers have been studied by electrophoresis in PAAG in the presence of sodium dodecyl sulphate and by sedimentation-diffusional analysis. Oligomers on the hemoglobin tetramers level were shown to have the tight structure close to the globular one. The tight disposition of protein molecules in oligomer is confirmed by the small-angle X-ray scattering method.