

УДК 541.64:539.2

© 1991 г. Л. И. Валуев, В. В. Чупов, Т. А. Валуева,
Л. В. Ванчугова, В. А. Синани, О. В. Ноа, Н. А. Платэ

О СТРОЕНИИ И СВОЙСТВАХ ВОДОРАСТВОРИМЫХ ПРОИЗВОДНЫХ БЕЛКОВ И ГИДРОФИЛЬНЫХ ПОЛИМЕРОВ

Изучено взаимодействие белков (на примере овомукоида из белка утиных яиц) и их ненасыщенных производных с окислительно-восстановительной системой персульфат аммония – тетраметилэтилендиамин. В результате такого взаимодействия происходит образование водорастворимых белковых продуктов повышенной ММ. Основной вклад в эту реакцию вносит рекомбинация макрорадикалов, образующихся при взаимодействии молекул белка с первичными радикалами. Введение в изученную систему низкомолекулярных сомономеров изменяет характер протекающих процессов: в этом случае решающий вклад в образование ВМС вносит реакция роста цепи. Показано влияние условий полимеризации и природы гидрофильного сомономера на биологическую активность образующихся продуктов и высказаны соображения о причинах изменения активности водорастворимых производных белков и гидрофильных полимеров в зависимости от жесткости полимерной цепи.

Ненасыщенные производные физиологически активных веществ, главным образом белковой природы, находят в последнее время широкое применение в качестве модификаторов полимерных веществ и материалов для придания последним таких свойств, как биокатализическая активность, способность избирательно сорбировать определенные субстраты, повышенная гемосовместимость и т. д. [1]. Одновременно с этим сами ВМС и материалы выступают в роли эффективных модификаторов физиологически активных веществ, изменяя специфичность их действия путем создания благоприятных условий для взаимодействия с субстратом определенного класса, повышая устойчивость этих веществ к действию денатурирующих агентов и обеспечивая возможность сочетания в одном препарате свойств различных физиологически активных веществ [2–4]. Естественно, что конечный результат модификации может быть предсказан только в том случае, если известен характер взаимного влияния компонентов модифицированной системы, определяемый ее строением, которое закладывается в процессе синтеза.

Цель настоящей работы – изучение особенностей взаимодействия белков и их ненасыщенности производных с инициаторами радикальной полимеризации, а также нахождение корреляций между функциональной активностью продуктов полимеризации и их молекулярными характеристиками.

В работе использовали овомукоид из белка утиных яиц (ОМ), выделенный и охарактеризованный ранее [5]. Ненасыщенные производные этого белка (НПОМ) получали ацилированием свободных аминогрупп белка хлорангидридом акриловой кислоты по методике [6]. В качестве инициирующей системы использовали персульфат аммония – N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин (ПСА – ТМЭДА), а в качестве водорастворимых мономеров – акриламид и N-акрилоилглюказамин.

Выделение высокомолекулярных производных ОМ осуществляли гель-фильтрацией на колонках с носителем «Toyoupearl-65» и «Toyoupearl-55», регистрируя оптическую плотность фракций с помощью проточного денситометра «Unicord» (Швеция). Белоксодержащие фракции отделяли от синтетических гомополимеров аффинной хроматографией на трипсин-сефарозе [7]. Флуоресцентно меченный белок получали по методике [8], отделяя продукт от избытка флуоресцентных меток хроматографией на колонках с Сефадексом G-25. Спектры флуоресценции регистрировали на

спектрофотометре MPF-4 («Hitachi», Япония). Длина волны возбуждения для ротамина и флуоресцина составляла 480 нм, длины волн эмиссии – 518 и 578 нм соответственно.

ММ и размеры продуктов определяли на лазерном малоугловом фотометре рассеянного света «Chromatix KMX-6» (США) в 0,2 м. растворе KCl – NaCl с pH=7,5 (ионная сила 0,2). Предварительно измеряли инкремент показателя преломления растворов на дифференциальном рефрактометре «Chromatix KMX-16» (США) в том же растворителе. Для анализа компонентов смеси после взаимодействия белков с инициаторами полимеризации применяли метод высокоэффективной жидкостной хроматографии, используя аналитическую колонку TSK-2000SW жидкостного хроматографа «Perkin – Elmer» (США). Препартивное выделение продуктов реакции осуществляли на колонке TSK-4000-SWG. Объем вводимой пробы составлял 150 мкл, скорость движения жидкой фазы 360 мл/ч. Состав сополимеров определяли следующим образом. Предварительно освобожденную от низкомолекулярных примесей фракцию (после гель-фильтрации на колонке с Сефадексом G-25) анализировали на содержание белковых компонентов и гравиметрически оценивали общую массу сополимерной фракции. Ингибиторную активность белков измеряли по подавлению протеолитической активности трипсина и α -химотрипсина в соответствии с методикой [9].

ОМ представляет собой гликопротеин с $M=3,1 \cdot 10^4$, основная биологическая функция которого заключается в образовании прочных неактивных комплексов с сериновыми протеиназами, константа диссоциации которых лежит в области 10^{-8} моль/л [9].

В табл. 1 и на рис. 1 суммированы результаты реакции ОМ и его макромономера с инициатором радикальной полимеризации. Обращают на себя внимание следующие особенности этого процесса. Во-первых, существует пороговая концентрация инициатора, в мольном выражении превосходящая концентрацию макромономера, ниже которой образования полимерных продуктов практически не происходит. Во-вторых, чем большее количество двойных связей введено в молекулу ОМ, тем выше конверсия. Степень полимеризации макромономеров невелика и не превышает 15–17, причем после окончания полимеризации в системе существуют олигомеры со всеми возможными степенями полимеризации от единицы до максимальной. Степень полимеризации других макромономеров, например трипсина или гепарина, обычно также находится в этих пределах [10, 11].

Наблюдаемые закономерности свидетельствуют о том, что в данном случае, процесс получения ВМС включает в себя в основном две стадии. Первая стадия – образование макrorадикалов либо при реакции первичного радикала инициатора с двойной связью макромономера, либо путем отрыва этим радикалом какого-либо подвижного атома от полимерной цепи ОМ. Вторая стадия заключается в рекомбинации макrorадикалов.

Введение в полимеризующуюся систему низкомолекулярных сомономеров изменяет характер протекающих реакций. Но хотя общие закономерности процесса при этом сохраняются (табл. 2), видно, что решающий вклад в образование сополимера уже вносит реакция роста цепи. По аналогии с сополимеризацией макромономера трипсина и акриламида [11, 12] можно предположить, что это в основном реакция растущего радикала низкомолекулярного мономера с тем же мономером, приводящая к образованию длинных последовательностей звеньев низкомолекулярного мономера.

Биологическая активность синтезированных соединений определяется конформационным состоянием полимерной цепи. Ниже приведены данные по антитриптической (X_1) и антихимотриптической (X_2) активности продукта (в % к исходной с ошибкой до $\pm 4\%$) в зависимости от степени полимеризации N .

N	1	2	3	>4
X_1	100	85	60	40
X_2	100	89	54	40

Видно, что как X_1 , так и X_2 олигомеров ОМ уменьшается с увеличением степени полимеризации. Поскольку возможность осуществления взаимодействия ингибиторов с ферментами в значительной степени определяется доступностью реактивного центра ингибитора, естественно, что с ростом степени полимеризации экранирование реактивных центров увеличив-

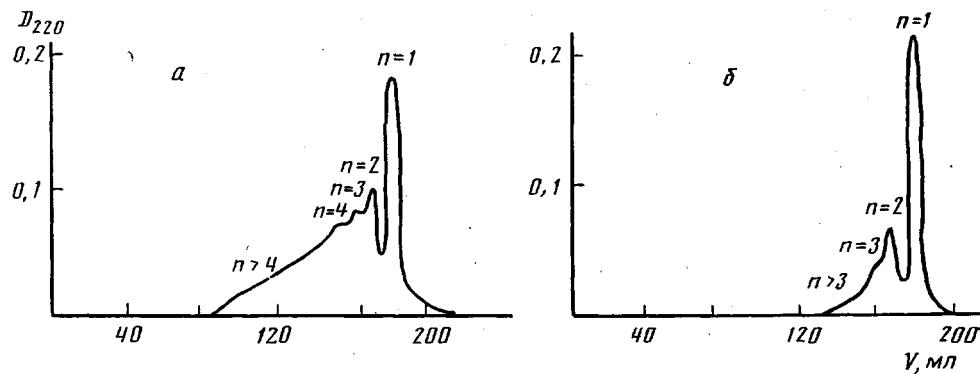


Рис. 1. Гель-хроматограммы продуктов взаимодействия НПОМ содержащего 4–5 (а) и 0 (б) связей С=С на молекулу с системой ПСА – ТМЭДА. Препаративная колонка TSK-4000 SWG, фосфатный буфер, pH=7,4; 20°. n – степень «полимеризации»

вается, а измеряемая активность ингибитора уменьшается. Аналогичные эффекты известны и для других белков. Так, активность тримера α -химотрипсина, полученного спшиванием фермента глутаровым альдегидом, составляет всего 70% от активности нативного α -химотрипсина [13].

Результаты изучения свойств сополимеров макромономера ОМ с двумя гидрофильными мономерами приведены в табл. 3. Видно, что активность ОМ по отношению к трипсину в сополимере с акриламидом находится на уровне активности гомополимера ОМ, содержащего такое же количество молекул ингибитора (C). Последнее означает, что несмотря на «разбавление» молекул ОМ фрагментами полиакриламида (ПАА) с ММ порядка 10^5 , заметного изменения расстояния между этими молекулами не произошло, т. е. конформация сополимера существенно отличается от конформации статистического клубка. Этот вывод был подтвержден прямым измерением диаметра макромолекул сополимера методом светорассеяния, а также расчетом этого параметра в предположении разных конформаций этих макромолекул. Как показал расчет, средний диаметр макромолекулы для модели гауссовых цепей с учетом эффекта набухания должен составлять 800–850 Å. Экспериментально определенное значение значительно меньше и составляло 520 Å. Причиной этого явления может быть только внутримолекулярное спшивание макромолекул сополимера при взаимодействии между собой молекул ОМ, принадлежащих одной цепи.

Оценку возможных белок-белковых взаимодействий проводили методом флуоресцентной спектроскопии с использованием макромономера ОМ, меченого флуоресцеином или родамином. Как видно из рис. 2, при суммарной концентрации белка в растворе $<0,1$ вес. % интенсивность флуоресценции флуоресцеин-меченого ОМ в смеси с родамин-меченным ингибитором близка к интенсивности флуоресценции индивидуального раствора флуоресцеин-ОМ. При увеличении концентрации белка интенсивность флуоресценции флуоресцеин-ОМ в смеси белков уменьшается вследствие передачи части энергии с донора на акцептор (родамин). Это свидетельствует о том, что в данной системе среднее расстояние между метками (50–80 Å) существенно меньше среднего расстояния, рассчитанного в предположении равномерного распределения молекул ОМ в растворе при данной концентрации (550–600 Å), т. е. в растворе образуются ассоциаты молекул ингибитора. Аналогичное явление наблюдали и при изучении растворов сывороточного альбумина [14]. Более того, в работе [14] показано, что при сополимеризации эти ассоциаты прочно фиксируются на полимерной цепочке, без изменения расстояния между флуорофорами.

Учитывая такую склонность белков к ассоциации, предположили, что в сополимере все молекулы ОМ агрегированы в одно образование, по форме близкое к сферическому. В этом случае фрагменты ПАА между молекулами ОМ в сополимере можно рассматривать как петли, средневквадратичные размеры которых в $\sqrt{2}$ раз меньше размеров линейных цепей,

Таблица 1

Результаты «гомополимеризации» макромономера ОМ

Среднее число связей С=С на молекулу ОМ	[НПОМ] * · 10³, моль/л	[ПСА] ** · 10³, моль/л	Конверсия НПОМ, %
0	2,58	177	12–16
1–2	2,58	177	18–20
3–4	2,58	177	38–40
3–4	2,58	17,7	16–18
3–4	2,58	2,2	3–4
4–5	2,52	174	45–55
4–5	2,52	44,3	25–30

* Продолжительность полимеризации составляет 7,5–8,0 ч; 40°.

** Здесь и в табл. 2 [ТМЭДА]=[ПСА].

Таблица 2

Данные по сополимеризации НПОМ с акриламидом (I) и N-акрилоилглюказамином (II)

[НПОМ] * · 10³, моль/л	[I] · 10³	[II] · 10³	[ПСА] · 10³, моль/л	Общая конверсия мономеров, %
	моль/л	моль/л		
1,61	423	0	44,3	38–41
1,61	423	0	11,0	35–39
0,99	0	107	0,99	7–9
0,99	0	107	1,98	13–17
0,99	0	107	9,80	20–25
0,99	0	107	44,3	35–37

* Число двойных связей в макромолекуле ППОМ не превышает единицы; 40°.

содержащих такое же количество сегментов. Расчет показывает, что средний диаметр макромолекулы сополимера ОМ с акриламидом в этом случае должен быть равен 500–540 Å, что хорошо совпадает с экспериментом.

Естественно, что возмущающее действие белок-белковых взаимодействий на конформацию цепи сополимера должно зависеть от гибкости фрагментов звеньев низкомолекулярного сополимера. Из табл. 3 видно, что действительно замена акриламида на N-акрилоилглюказамин (статистический сегмент поли-N-акрилоилглюказамина составляет ~20 Å вместо 10–12 Å для ПАА приводит к тому, что реальный диаметр макромолекулы сополимера (580 Å) хотя и не достигает значения, характерного для статистического клубка (640–700 Å), но уже существенно больше, чем для сополимера блочного строения (360–400 Å). Сопротивление более жесткой полимерной цепи образованию больших ассоциатов белка и является причиной повышения в 1,5 раза ингибиторной активности сополимера ОМ с акрилоилглюказамином по сравнению с активностью сополимера с акриламидом.

Таблица 3

Некоторые характеристики сополимеров НПОМ с акриламидом (I) и N-акрилоилглюказамином (II)

Сополимер	$M_w \cdot 10^{-3}$	C	Средний диаметр макромолекул, Å			Антитриптическая активность (% от исходной активности ОМ)	
			эксперимент	расчет для моделей			
				статистического клубка	белок-белковых взаимодействий		
I	912±23	4–5	520	820–850	500–560	40±3	
II	1323±49	6–7	580	660–680	370–390	61±4	

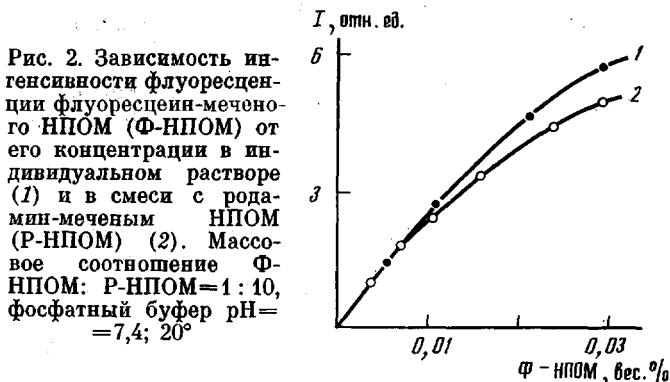


Рис. 2. Зависимость интенсивности флуоресценции флуоресцеин-меченого НПОМ (Ф-НПОМ) от его концентрации в индивидуальном растворе (1) и в смеси с радиоамин-меченым НПОМ (Р-НПОМ) (2). Массовое соотношение Ф-НПОМ: Р-НПОМ = 1 : 10, фосфатный буфер pH = 7,4; 20°

Таким образом, рассмотренные закономерности свидетельствуют о том, что процесс взаимодействия белков и макромономеров на их основе с инициаторами радикальной полимеризации имеет ряд существенных особенностей, обусловленных макромолекулярной природой этих соединений. Учет всех этих особенностей обеспечивает возможность эффективного использования этих реакций для синтеза принципиально новых типов полимерных веществ и материалов, сочетающих в себе свойства синтетического полимера и физиологическую активность связанного с ним белка.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Платэ Н. А., Валуев Л. И., Чупов В. В. // Высокомолек. соед. А. 1985. Т. 27. № 10. С. 2019.
2. Fang Shi-Bi, Inaka Yoshiaki, Takemoto Kelichi // Polymer J. 1985. V. 17. № 3. P. 433.
3. Торчилик В. П., Смирнов В. Н., Чазов Е. И. // Биоорганическая химия. 1978. Т. 4. С. 566.
4. Josefowicz M., Josefowicz I. // Pure Appl. Chem.. 1984. V. 56. № 10. P. 351.
5. Валуева Т. А., Платэ Н. А., Валуев Л. И. А. с. 1404513 СССР. // Б. И. 1988. № 23. С. 138.
6. Платэ Н. А., Валуев Л. И., Егоров Н. С., Аль-Нури М. А. // Прикл. биохимия и микробиология. 1977. Т. 13. № 5. С. 673.
7. Валуева Т. А., Синани В. А., Валуев Л. И., Мосолов В. В., Чупов В. В., Платэ Н. А. // Биотехнология. 1988. Т. 4. № 4. С. 525.
8. Методы вирусологии и молекулярной биологии/Под ред. Хейбл Р., Зальцман Н. Р. М., 1977. С. 257.
9. Валуева Т. А., Маклакова И. А., Валуев Л. И., Мосолов В. В., Платэ Н. А. // Вопр. мед. химии. 1985. Т. 31. № 4. С. 34.
10. Валуев Л. И., Чупов В. В., Платэ Н. А. // Вестн. МГУ. Сер. 2, Химия, 1985. Т. 26. № 4. С. 404.
11. Платэ Н. А., Малых А. В., Ужинова Л. Д., Панов В. П., Розенфельд М. А. // Высокомолек. соед. А. 1989. Т. 31. № 1. С. 198.
12. Платэ Н. А., Малых А. В., Ужинова Л. Д., Можаев В. В. // Высокомолек. соед. А. 1989. Т. 31. № 1. С. 195.
13. Иммобилизованные ферменты. Т. 1. Под ред. Березина И. В., Антонова В. К., Мартинека К. М., 1976. 201 с.
14. Платэ Н. А., Валуев Л. И., Синани В. А., Чупов В. В. // Биотехнология. 1987. Т. 3. № 2. С. 173.

Московский государственный университет
им. М. В. Ломоносова

Поступила в редакцию
10.01.90

Институт нефтехимического синтеза
им. А. В. Топчиева АН СССР

Институт биохимии им. А. Н. Баха
АН СССР

**L. I. Valuev, V. V. Chupov, T. A. Valueva, L. V. Vanchugova,
V. A. Sinani, O. V. Noah, N. A. Platé**

**ON THE STRUCTURE AND PROPERTIES OF WATER-SOLUBLE
PROTEINS DERIVATIVES AND HYDROPHILIC POLYMERS**

S u m m a r y

Interaction of proteins (ovomucoide obtained from the duck eggs) and their unsaturated derivatives with the ammonium persulfate – tetramethylethylenediamine redox system has been studied. As a result of such interaction the water-soluble protein products of enhanced MM are formed. The recombination of macroradicals formed as a result of interaction of protein molecules with primary radicals is the main reaction in this process. Introducing of low-molecular comonomers into this system changes the character of the process because of the predomination of the chain growth reaction. Influence of conditions of polymerization and of the nature of the hydrphilic comonomer on the biological activity of formed products is shown. The reasons of the change of activity of water-soluble proteins derivatives and hydrophilic polymers depending on the rigidity of the polymer chain are discussed.