

УДК 541.64:532.77

## ХИМИЧЕСКАЯ МОДИФИКАЦИЯ АЦЕТИЛХОЛИНЭСТЕРАЗЫ КАРБОКСИЛСОДЕРЖАЩИМИ ВОДОРАСТВОРIMYMI СОПОЛИМЕРАМИ<sup>1</sup>

© 1994 г. Ю. А. Осинкин\*, С. Н. Попович\*, В. В. Чупов\*\*, Н. А. Платэ\*\*

\*Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова  
119899 Москва, Ленинские горы

\*\*Институт нефтехимического синтеза им. А.В. Топчиеva Российской академии наук  
117912 Москва, Ленинский пр., 29

Поступила в редакцию 12.01.94 г.

Изучены особенности ковалентного связывания ацетилхолинэстеразы с водорастворимыми сополимерами акриламида и акриловой кислоты. Показано, что использование конденсирующего агента (реагента Вудворда) обеспечивает полное сохранение ферментативной активности ацетилхолинэстеразы в полимерных производных в отличие от продуктов, получаемых радикальной сополимеризацией ненасыщенного производного фермента с соответствующими мономерами.

Химическая модификация ферментов синтетическими полимерами, заключающаяся в ковалентном связывании двух макромолекул различной химической природы приводит как правило к повышению стабильности биомолекул и является удобным методом их иммобилизации, если при этом не происходит инактивации фермента [1]. Ранее нами было показано, что введение ненасыщенных связей C=C в молекулы ферментов и последующая радикальная сополимеризация полученных макромономеров с гидрофильными сомономерами в присутствии счищающих агентов или без них позволяет получать различные полимерные производные с регулируемой ферментативной активностью [2 - 4]. Несмотря на то, что этот метод применим для иммобилизации широкого круга ферментов, использование его для создания высокоактивных препаратов иммобилизованных В-эстераз (в частности, ацетилхолинэстераз) оказалось неудовлетворительным из-за чрезвычайно высокой чувствительности этих ферментов к действию свободных радикалов в растворах. В то же время полимер-иммобилизованные холинэстеразы являются перспективными материалами для обнаружения и дезактивации токсичных фосфорорганических соединений в различных детектирующих и аналитических устройствах [5].

В этой связи цель настоящей работы – получение водорастворимых полимерных производных ацетилхолинэстераз, ковалентно связанных с полимерным носителем и сохраняющих высокий уровень ферментативной активности.

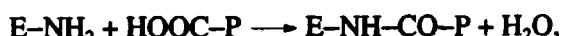
<sup>1</sup>Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (код проекта 93-03-181011).

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали эритроцитарную ацетилхолинэстеразу (АХЭ) электрического угря (3.1.1.7), имеющую ММ 260000 с удельной активностью 1350 ед. – за единицу активности принимали количество фермента, гидролизующее 1 мкмоль ацетилхолина в минуту в растворе с pH 8.0 при 37°C. Катализическую активность иммобилизованной АХЭ определяли по ацетилхолину в соответствии с работой [6]. В качестве водорастворимого карбоксилсодержащего полимерного носителя использовали статистический сополимер, полученный радикальной сополимеризацией смеси 92 мол. % акриламида с 8 мол. % акриловой кислоты с  $\bar{M}_n = 5 \times 10^4$ . Определенная методом потенциометрического титрования концентрация карбоксильных групп в сополимере составила  $9.1 \times 10^{-4}$  моль/г. В качестве конъюгирующего агента использовали N-этил-5-фенилизоксазолий-3'-сульфонат (реагент Вудворда) [7]. Иммобилизацию АХЭ осуществляли следующим образом. К 1 мл раствора сополимера в фосфатном буферном растворе с pH 4 - 8 прибавляли требуемое количество реагента Вудворда, после инкубирования в течение 10 - 15 мин при комнатной температуре к реакционной смеси добавляли  $(3 - 13) \times 10^{-8}$  моль фермента, раствор выдерживали в течение 1 ч и продукты разделяли методом гель-фильтрации на колонке с Сефадексом G-200 (1 × 20 см), уравновешенной бидистиллированной водой. Спектры кругового диахроизма регистрировали на спектрополяриметре "Jasco J-500 C", используя кюветы с длиной оптического пути 2 см.

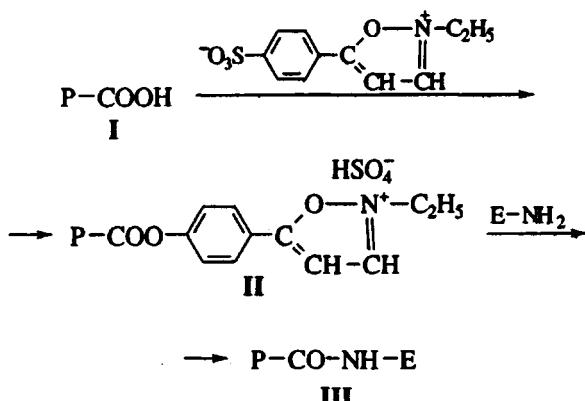
## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При ковалентном связывании АХЭ с карбоксилодержащими полимерами в присутствии конденсирующих агентов, например водорасторимых карбодиимидов, участвуют главным образом свободные аминогруппы фермента (как правило,  $\epsilon$ -аминогруппы остатков лизина) [8]



где Е – фермент, Р – полимер.

В присутствии реагента Вудворда схема реакции иммобилизации может быть представлена следующим образом:



Характерной особенностью данной последовательности реакций является относительная устойчивость промежуточного соединения II, что позволяет кинетически разделить процессы модификации носителя и иммобилизации фермента. При взаимодействии сополимера с реагентом Вудворда оптическая плотность раствора возрастает в течение 5 - 15 мин, после чего перестает изменяться. Контроль за образованием соединения II, поглощающего при 400 нм ( $\epsilon = 7000$  л/(моль см)) показал, что активация карбоксильных групп сополимера протекает достаточно быстро.

Реакция активированного эфира II со свободными аминогруппами фермента приводит к образованию высокомолекулярных продуктов.

На рис. 1 приведены данные по гель-фильтрации исходного сополимера I, продукта II и конечного продукта III, из которых видно, что результатом второй стадии является практическое полное связывание фермента с полимером. Об этом свидетельствует исчезновение пиков 1 и 2, отвечающих сополимеру и АХЭ, и появление пика, относящегося к продукту с более высокой молекулярной массой (пик 3).

Выделенный и очищенный полимерный конъюгат обладает высоким уровнем ферментативной активности по ацетилтиохолину, которая определяется совокупностью параметров проведения реакции иммобилизации: pH раствора, концентрацией фермента и количеством активированных групп.

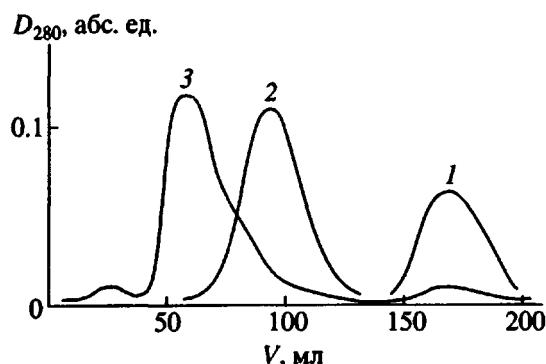


Рис. 1. Кривые гель-фильтрации сополимера акриламида с акриловой кислотой (1), нативной (2) и иммобилизованной на сополимере АХЭ (3). Колонка с Сефадексом G-200 размером 1 × 20 см, элюент вода, скорость элюции 0.2 мл/мин, концентрация сополимера 10 г/л, АХЭ  $1.2 \times 10^{-7}$ , конъюгата  $7.2 \times 10^{-3}$  моль/л; pH 6.0.

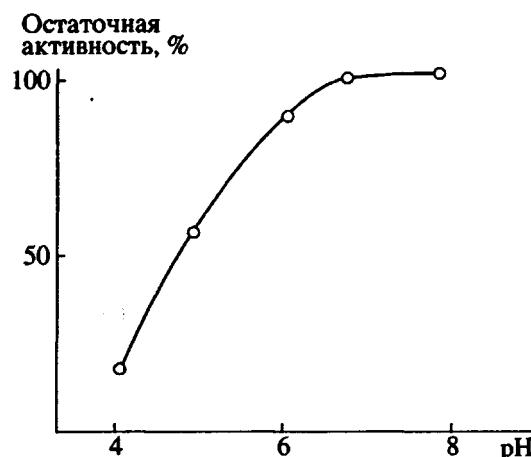


Рис. 2. Зависимость активности АХЭ по ацетилтиохолину от pH.  $T = 37^\circ\text{C}$ .

На рис. 2 приведена зависимость остаточной активности нативной АХЭ от величины pH раствора, из которого видно, что фермент устойчив при нейтральных и щелочных значениях pH и полностью инактивируется в кислой среде.

Таблица 1. Данные по иммобилизации АХЭ на сополимере акриламида и акриловой кислоты (концентрация сополимера 10 г/л, реагент Вудворда  $4 \times 10^{-3}$  моль/л, АХЭ 12.3 моль/л)

| pH  | Концентрация активированного эфира $c \times 10^4$ , моль/л | Активность фермента, % от исходной ( $\pm 1\%$ ) |
|-----|---|--|
| 4.5 | $5.0 \pm 1.0$   | 16   |
| 6.0 | $4.1 \pm 0.9$   | 85   |
| 6.5 | $3.3 \pm 0.9$   | 74   |
| 7.0 | $0.9 \pm 0.4$   | 50   |

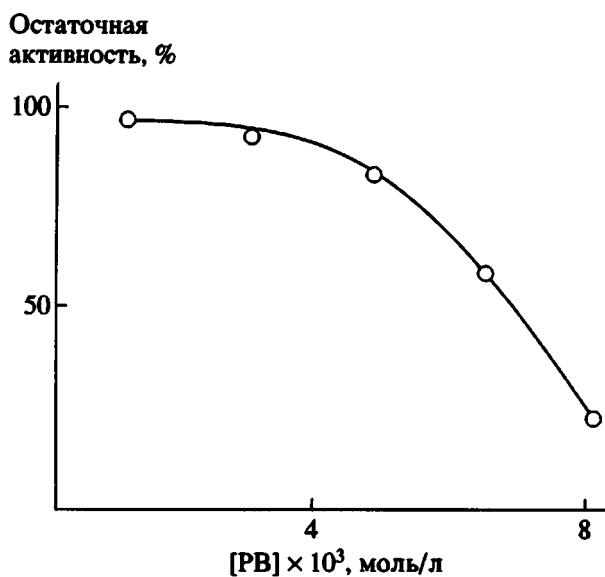


Рис. 3. Зависимость эффективности иммобилизации АХЭ от концентрации реагента Вудворда (PB) при pH 7.0 и 20°C. Концентрация сополимера 5 г/л, АХЭ  $3.6 \times 10^{-8}$  моль/л.

Из данных табл. 1 следует, что ферментативная активность иммобилизованных препаратов АХЭ пропорциональна концентрации активированного эфира II и зависит от pH среды, возрастаая с увеличением pH.

При постоянной величине pH 7.0 (где активность нативного фермента высока) и постоянной концентрации активированного эфира остаточная активность иммобилизованной АХЭ уменьшается с ростом количества фермента (табл. 2), что связано с хорошо известным фактом усиления белок-белковых взаимодействий с ростом концентрации фермента в сополимерах [9].

В то же время зависимость остаточной активности от концентрации используемого для ковалентного связывания реагента Вудворда (рис. 3) показывает заметное понижение реакционной способности активных центров фермента при концентрации конденсирующего агента выше

Таблица 2. Влияние концентрации фермента на остаточную активность иммобилизованной на сополимере акриламида и акриловой кислоты АХЭ (концентрация сополимера 10 г/л, реагента Вудворда  $4 \times 10^{-3}$  моль/л, активированного эфира  $4.1 \times 10^{-4}$  моль/л, pH 6.0)

| Концентрация фермента<br>$c \times 10^8$ , моль/л | Активность фермента, %<br>от исходной ( $\pm 1\%$ ) |
|---|---|
| 3.6   | 89  |
| 7.0   | 91  |
| 9.2   | 86  |
| 12.9  | 84  |

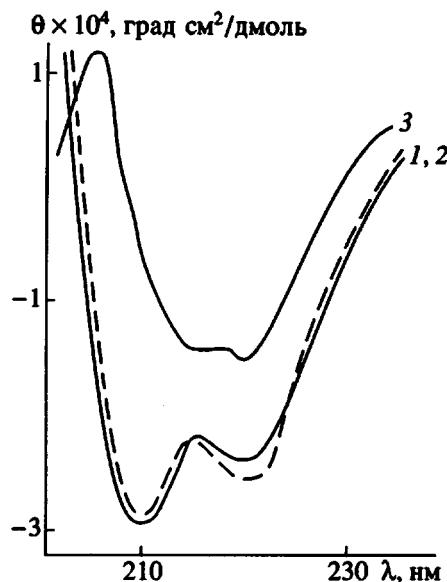
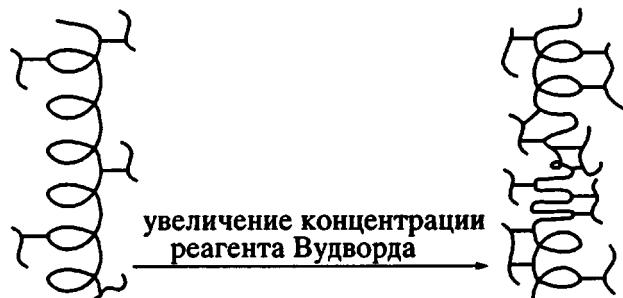


Рис. 4. Спектры кругового диэлектрического дихроизма водных растворов нативной АХЭ (1) и иммобилизованной при концентрации реагента Вудворда  $4 \times 10^{-4}$  (2) и  $8 \times 10^{-3}$  моль/л (3).

$6 \times 10^{-3}$  моль/л, т.е. в условиях, благоприятных для многоточечного связывания АХЭ с полимером.

Совокупность полученных данных позволяет предположить, что при многоточечном креплении АХЭ к карбоксилсодержащему сополимеру нарушается пространственная структура белковой молекулы, в результате чего ее ферментативная активность уменьшается. Действительно, из приведенных на рис. 4 спектров кругового диэлектрического дихроизма водных растворов нативной и иммобилизованной АХЭ видно, что увеличение концентрации реагента Вудворда сопровождается уменьшением степени спиральности белка, связанного с полимером, т.е. изменением его конформационного состояния, что может быть представлено следующей схемой:



Таким образом, использование реагента Вудворда для получения водорастворимых полимерных производных В-эстераз позволяет как полностью сохранить ферментативную активность иммобилизованной АХЭ, так и регулировать ее за счет изменения концентрации фермента на полимере и его конформационного состояния.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Martinek K., Berezin I.V.* // *J. Solid. Phase Biochem.* 1977. V. 2. № 4. P. 343.
2. *Платэ Н.А., Валуев Л.И., Чупов В.В.* // Высокомолек. соед. А. 1985. Т. 27. № 10. С. 2019.
3. *Plate N.A., Valuev L.I., Chupov V.V.* // *Pure Appl. Chem.* 1984. V. 56. № 10. P. 1351.
4. *Андранинов А.К., Чупов В.В., Валуев Л.И., Платэ Н.А.* // Докл. АН СССР. 1991. Т. 318. № 6. С. 1250.
5. *Iao T., Sato M.* // *Anal. Chem. Acta.* 1985. V. 172. P. 371.
6. *Eilman G.L.* // *Biochem. Pharmacol.* 1961. V. 7. № 2. P. 88.
7. *Woodward R.B., Olofson R.A.* // *J. Am. Chem. Soc.* 1961. V. 83. P. 1007.
8. *Degani Y., Miron T.* // *Biochim. Biophys. Acta.* 1970. V. 212. № 2. P. 362.
9. *Платэ Н.А., Валуев Л.И., Валуева Т.А., Ванчугова Л.В., Постников В.А., Синани В.А., Чупов В.В.* // Докл. АН СССР. 1989. Т. 307. № 3. С. 652.

## Chemical Modification of Acetylcholinesterase with Water-Soluble Carboxyl-Containing Copolymers

Yu. A. Osinkin\*, S. N. Popovich\*, V. V. Chupov\*\*, and N. A. Platé\*\*

\*Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119899 Russia

\*\*Topchiev Institute of Petrochemical Synthesis, Russian Academy of Sciences,  
Leninskii pr., 29, Moscow, 117912 Russia

**Abstract** – Covalent binding of acetylcholinesterase to water-soluble copolymers of acrylamide and acrylic acid was studied. It was found that in contrast to radical copolymerization of the double-bond containing enzyme derivative, using Woodward's reagent as the condensing agent preserves the enzymatic activity of polymer-immobilized acetylcholinesterase.