

УДК 541.64:547.962

## ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ПОЛИМЕРНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ТРИПСИНА С ЕГО БЕЛКОВЫМ ИНГИБИТОРОМ<sup>1</sup>

© 1995 г. Л. И. Валуев, О. Н. Зефирова, А. В. Мамаева,  
И. М. Шаназарова, В. В. Чупов, Н. А. Платэ

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

Поступила в редакцию 08.09.94 г.

Осуществлена ковалентная иммобилизация трипсина и его ингибитора (овомукоида из белка утиных яиц) на водорастворимых полимерах. Показано, что активности иммобилизованных белков изменяются в зависимости от природы полимеров: при иммобилизации на гибкоцепном полиакриламиде наблюдается понижение активности иммобилизованных белков за счет образования внутримолекулярных ассоциатов их молекул. При этом полимерные цепи не создают дополнительных, стерических препятствий для взаимодействия иммобилизованных белков с соответствующими субстратами. Использование жесткоцепных декстранов с различной длиной цепи позволяет полностью сохранить активности иммобилизованных белков и регулировать характер взаимодействия между иммобилизованным ферментом и иммобилизованным ингибитором.

Химическая модификация белков природными и синтетическими полимерами – практически единственный путь создания принципиально новых типов веществ и материалов, сочетающих свойства полимеров с биологической активностью иммобилизованных на них белков. Конъюгаты полимеров с белками можно рассматривать как привитые сополимеры, свойства которых определяются конформационным состоянием составляющих их компонентов. Очевидно, что знание особенностей взаимодействия макромолекул полимера с полипептидной цепью белка открывает широкие возможности в плане целенаправленного регулирования биологической активности и специфики действия иммобилизованных белков. Дополнительный интерес к этой проблеме определяется также тем обстоятельством, что в живых организмах большинство белков функционируют в мембранныесвязанном состоянии или в виде комплексов с другими высокомолекулярными соединениями. Выяснение роли полимерносителя в проявлении физиологической активности иммобилизованного белка несомненно поможет понять механизм действия этих соединений в живых организмах.

Цель настоящей работы – изучение влияния природы полимерной цепи на характер взаимодействия двух иммобилизованных белков, в качестве которых использованы наиболее типичные представители реагирующих между собой в

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

живых системах соединений: протеолитический фермент и его белковый ингибитор.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали бычий трипсин ("Sigma", США) и его ингибитор – овомукоид из белка утиных яиц, выделенный и очищенный по ранее разработанной методике [1].

Иммобилизацию белков на полиакриламиде (ПАА) осуществляли ацилированием белка хлорангидридом акриловой кислоты с последующей радикальной сополимеризацией ненасыщенного производного трипсина (или овомукоида) с акриламидом в водном растворе [2]. Для получения сополимеров использовали ненасыщенные производные, содержащие в среднем одну двойную связь на макромолекулу (определен титрованием свободных аминогрупп тринитробензолсульфокислотой до и после введения двойных связей [3]).

Сополимеризацию проводили в водном растворе при комнатной температуре. Инициатором служила окислительно-восстановительная система персульфат аммония + N, N, N', N'-тетраметил этилендиамин. Продукты полимеризации разделяли гель-фильтрацией на колонке с сефарозой-4В, используя для детектирования оптической плотности фракций спектрофотометр U-3410 ("Hitachi", Япония) с проточной кюветой.

Иммобилизацию трипсина и овомукоида на декстранах различной ММ проводили окислением декстрана персидатом натрия, реакцией образующегося диальдегиддекстрана с белком и восстановлением азометиновой связи боргидридом

натрия [4]. Выделение конечных продуктов осуществляли гель-фильтрацией на колонках с Сепадексом G-100 и G-25.

Ингибиторную активность овомукоида и его полимерных производных измеряли по подавлению протеолитической активности трипсина или его полимерных производных, которую в свою очередь определяли по низкомолекулярному ( $N$ - $\alpha$ -бензоил- $D,L$ -аргинин-*n*-нитроанилид-БАПА) [5] или высокомолекулярному (казеин) [6] субстратам.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Молекула овомукоида – гликопroteина с  $M = 3.1 \times 10^4$  содержит два антитриптических центра, т.е. в нативном состоянии способна взаимодействовать с двумя молекулами трипсина с образованием прочных комплексов с константой диссоциации порядка  $10^{-9}$  моль/л [7], каталитическая активность трипсина в которых полностью подавлена (рис. 1, кривая 1).

В результате иммобилизации на гибкоцепном ПАА (ММ сополимера, на одной макромолекуле которого иммобилизовано в среднем пять молекул овомукоида, равна  $8 \times 10^5$ ) антитриптическая активность овомукоида уменьшается и составляет  $45 \pm 3\%$  от активности нативного ингибитора, т.е. одна молекула иммобилизованного овомукоида взаимодействует в среднем с 0.9 молекулами нативного трипсина (рис. 1, кривая 2). Аналогичный результат был получен в работе [8], в которой было предположено, что уменьшение активности овомукоида при его иммобилизации обусловлено стерическими препятствиями для взаимодействия овомукоида с достаточно высокомолекулярным трипсином (ММ трипсина составляет  $2.1 \times 10^4$ ). Основанием для такого пред-

положения послужило обнаруженное в указанной работе явление ассоциации молекул овомукоида, иммобилизованных на одной макромолекуле гибкоцепного полимера. Эта ассоциация приводит к существенному поджатию полимерного клубка и делает недоступной для фермента часть активных центров ингибитора.

Вместе с тем не исключено, что определенный вклад в уменьшение активности иммобилизованного овомукоида вносит денатурирующее действие полимера на нативную конформацию связанного с ней белка. Такой эффект наблюдали в работе [9] при иммобилизации трипсина и пероксидазы на гомо- и сополимерах  $N$ -алкилзамещенных акриламидов.

С целью определения причины изменения активности белков при их иммобилизации на водорастворимых полимерах нами было изучено взаимодействие нативного овомукоида с иммобилизованным трипсином – сополимером ненасыщенного производного трипсина и акриламида, одна макромолекула которого содержит в среднем три молекулы трипсина и имеет  $M \sim 7 \times 10^5$ . Оказалось, что нативный овомукоид может ингибировать только  $59 \pm 3\%$  иммобилизованного трипсина. Оставшаяся часть неингибиированного фермента не способна взаимодействовать с овомукоидом, но сохраняет каталитическую активность по отношению к низкомолекулярному субстрату – БАПА (рис. 1, кривая 3). Активность же иммобилизованного трипсина по отношению к высокомолекулярному субстрату (казеину с  $M \sim 7.5 \times 10^4$ ) существенно понижается (рис. 2).

Оценку структуры сополимеров акриламида с трипсином (с точки зрения возможности образования ассоциатов молекул белка между собой) проводили методом флуоресцентной спектроскопии,

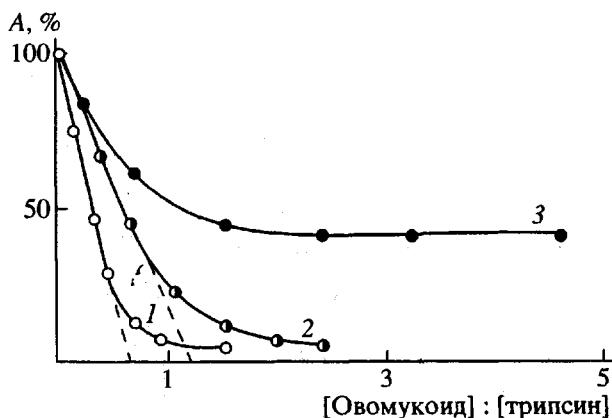


Рис. 1. Зависимость остаточной протеолитической активности  $A$  трипсина от мольного соотношения [овомукоид] : [трипсин] для систем нативный трипсин + нативный овомукоид (1), ПАА-овомукоид + нативный трипсин (2) и нативный овомукоид + ПАА-трипсин (3). Субстрат БАПА.

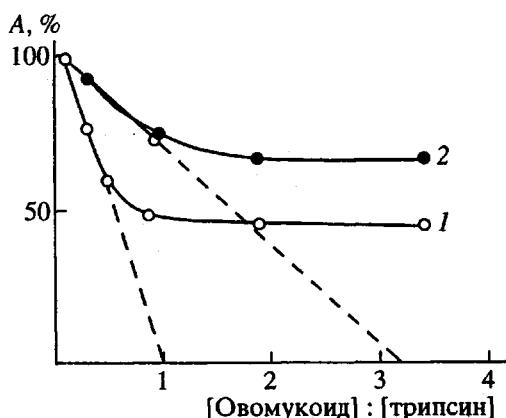


Рис. 2. Зависимость остаточной протеолитической активности иммобилизованного на ПАА трипсина от концентрации нативного (1) и иммобилизованного на ПАА овомукоида (2). Субстрат казеин.

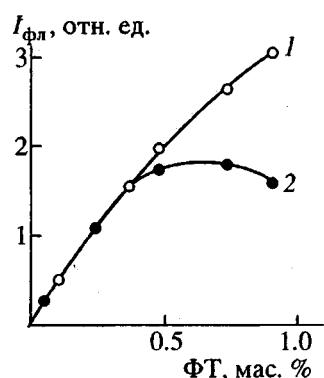


Рис. 3. Зависимость интенсивности флуоресценции  $I_{\text{фл}}$  флуоресцеин-меченого трипсина (ФТ) от его концентрации в индивидуальном растворе (1) и в растворе его смеси с родамин-меченым трипсином (2). Массовое соотношение ФТ : РТ = 1 : 10, pH 7.4, 20°C,  $\lambda = 518$  нм.

используя родамин- и флуоресцеин-меченные макромономеры трипсина [10]. Из рис. 3 видно, что при суммарной концентрации меченых белков в растворе выше 0.5 мас. % интенсивность флуоресценции флуоресцеин-трипсина в смеси с родамин-трипсином меньше, чем интенсивность флуоресцеин-трипсина в его индивидуальном растворе. Это означает, что в растворе молекулы трипсина существуют в виде ассоциатов, в которых часть энергии передается от донора (флуоресцеин) к акцептору (родамин). В работе [11] показано, что при сополимеризации такого рода макромономеров с акриламидом белковые ассоциаты прочно фиксируются на полимерной цепи без изменения расстояния между флуорофорами. Последнее означает, что в исследуемом сополимере акриламида с трипсином последний "закреплен" на полимерной цепи в виде тримера, и такое строение конъюгатов белков с водорастворимыми полимерами, вероятно, характерно для большинства белков, проявляющих склонность к самоассоциации за счет белок-белковых взаимодействий.

Если это так, то активность белков, иммобилизованных на водорастворимых полимерах, должна определяться только количеством молекул белка на одной макромолекуле (числом молекул белка в ассоциатах), а сама полимерная цепь не должна создавать никаких препятствий для взаимодействия иммобилизованного белка с субстратом. Другими словами, роль полимерной цепи должна сводиться только к фиксации ассоциатов белков в растворе. Действительно, активность тримеров овомукоида и тримеров  $\alpha$ -химотрипсина, полученных сшиванием белков, составляет 60 - 70% от активности нативных белков [12, 13], т.е. находится на уровне обнаруженной нами активности тримеров трипсина, связанных достаточно длинными отрезками полимерной цепи ( $59 \pm 3\%$ ). Кроме того, если предпо-

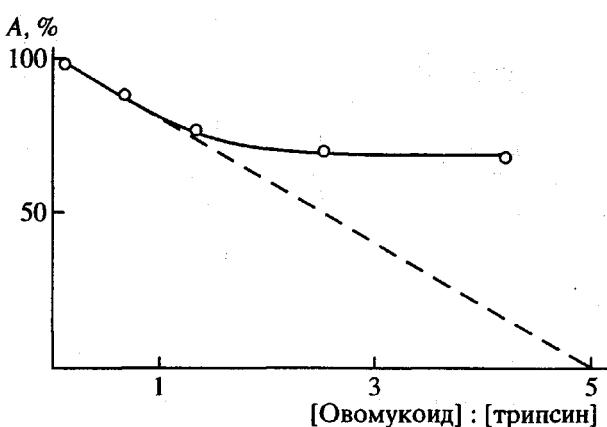
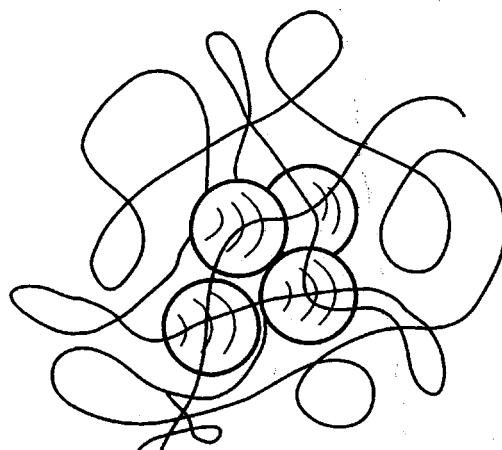


Рис. 4. Зависимость остаточной активности трипсина от мольного соотношения [овомукоид] : [трипсин] для иммобилизованных на ПАА белков. Субстрат БАПА.

ложение о роли полимера-носителя верно, то при взаимодействии двух сополимеров (сополимера трипсина с акриламидом и сополимера овомукоида с тем же мономером) степень подавления активности трипсина должна составлять 27% (59% от 45%, где 59 и 45 – степени сохранения активности трипсина и овомукоида при их иммобилизации на ПАА соответственно), что находится в хорошем соответствии с экспериментальными данными (рис. 4, табл. 1). При этом увеличения активности, связанного с возможными кооперативными взаимодействиями белков на сополимерах, в системе не наблюдается.

Можно предложить две модели структуры сополимеров ПАА-белок. Первая (модель 1) представляет собой образование из ассоциатов белка, вокруг которых в виде петель расположены отрезки цепей ПАА. Такие клубки являются достаточно "рыхлыми" для проникновения небольших молекул субстрата, и активность белковых ассоциатов не отличается от активности сополимеров, содержащих такое же количество иммобилизованного белка:



Модель 1

**Таблица 1.** Зависимость степени ингибирования протеолитической активности трипсина овомукoidом в различных системах (субстрат БАПА)

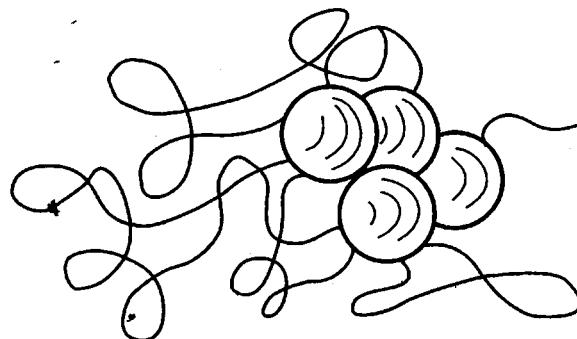
Система	Схематическое строение*	Степень ингибирования трипсина, % ( $\pm 3\%$ )
Нативный трипсин + нативный овомукoid		100
Нативный трипсин + сополимер ПАА-овомукoid		45
Сополимер ПАА-трипсин + нативный овомукoid		59
Сополимер ПАА-трипсин + сополимер ПАА-овомукoid		27 (расчет) 30 (эксперимент)

\* Заштрихованная область соответствует степени сохранения активности иммобилизованного белка.

Однако эта модель не позволяет объяснить наблюдавшиеся активности двух белков, иммобилизованных на достаточно высокомолекулярных носителях. В этом случае активность иммобилизованного белка должна определяться только доступностью активных центров ассоциированных молекул белка для субстрата. Другими словами, должна существовать пороговая молекулярная масса субстрата, выше которой активность иммобилизованного белка не будет зависеть от нее. Действительно, как видно из табл. 2, активность иммобилизованного трипсина уменьшается с ростом ММ субстрата и при достижении ее значения, равного  $7.5 \times 10^4$  (казеин), перестает изменяться.

Более вероятной представляется другая структура (модель 2), в которой белковый ассоциат как бы отделен от полимерной цепи и не экранируется ею, а весь конъюгат в целом имеет гантелеобразную форму и напоминает модель структуры

привитого сополимера с пространственно разделенными компонентами:



Модель 2

Активная роль полимерной цепи проявляется при использовании жесткоцепных полимеров. Из рис. 5 видно, что иммобилизованные на декстрапане с  $M = 10^4$  или  $5 \times 10^5$  овомукoid и трипсин полностью сохраняют свою активность не только при взаимодействии с нативным, но и с иммобилизованным субстратом даже при содержании на одной полимерной цепи до четырех молекул белка. Жесткая полимерная цепь препятствует самоассоциации иммобилизованных на ней белков и тем самым облегчает их взаимодействие не только с низкомолекулярным, но и с высокомолекулярным субстратом.

Таким образом, установленные в работе закономерности однозначно свидетельствуют о том, что активность белка, иммобилизованного на гибкочепных водорастворимых полимерах, по

**Таблица 2.** Протеолитическая активность сополимера ПАА-трипсин по отношению к различным субстратам

Субстрат	Молекулярная масса субстрата, $M \times 10^{-4}$	Протеолитическая активность сополимера, %
БАПА	0.3	100
Овомукoid	3.1	59
Казеин	7.5	30
ПАА-овомукoid	70.0	30

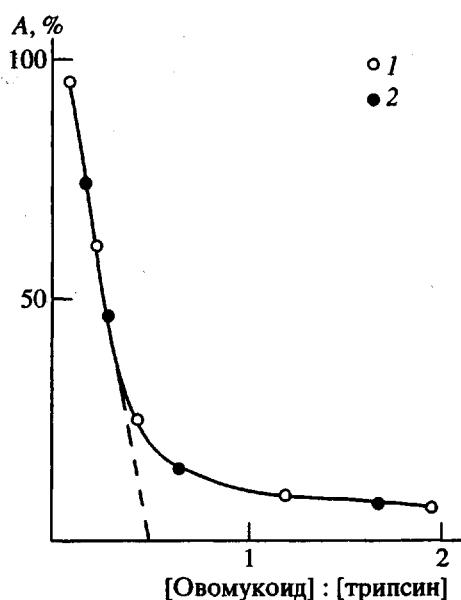


Рис. 5. Зависимость остаточной протеолитической активности иммобилизованного на дектранах трипсина от концентрации овомукоида, иммобилизованного на тех же дектранах с  $M = 10^4$  (1) и  $5 \times 10^5$  (2). Субстрат БАПА.

отношению к высокомолекулярным субстратам определяется только белок-белковыми взаимодействиями и составом образующихся в результате таких взаимодействий ассоциатов. В этом случае полимерная цепь как бы отделена от ассоциатов белков и не экранирует их активные центры, а ее роль сводится только к фиксации образующихся ассоциатов. При иммобилизации на жесткоцепных полимерах удается предотвратить образова-

ние ассоциатов белков и тем самым добиться проявления ими максимальной активности.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Шульгин М.Н., Валуева Т.А., Кестере Ф.Я., Мосолов В.В. // Биохимия. 1981. Т. 46. № 3. С. 473.
- Platé N.A., Valuev L.I., Chuprov V.V. // Pure Appl. Chem. 1984. V. 56. № 10. P. 1351.
- Snyder S.L., Sobocinski P.S. // Anal. Biochem. 1975. V. 64. № 2. P. 284.
- Reiner R.H., Batz H.G. // Makromol. Chem. 1981. B. 182. № 6. S. 1541.
- Валуева Т.А., Маклакова И.А., Валуев Л.И., Мосолов В.В., Платэ Н.А. // Вопросы мед. химии. 1985. Т. 31. № 4. С. 34.
- Нортроп Д., Кунитц М., Херриотт Р.М. Кристаллические ферменты. М.: Изд-во иностр. лит., 1950. С. 242.
- Валуева Т.А., Синани В.А., Валуев Л.И., Чупров В.В., Платэ Н.А. // Биотехнология. 1988. Т. 24. № 3. С. 305.
- Валуев Л.И., Чупров В.В., Валуева Т.А., Ванчугова Л.В., Синани В.А., Ноа О.В., Платэ Н.А. // Высокомолек. соед. А. 1991. Т. 33. № 1. С. 75.
- Валуев Л.И., Зефирова О.Н., Обыденнова И.В., Платэ Н.А. // Высокомолек. соед. А. 1993. Т. 35. № 1. С. 83.
- Синани В.А., Валуев Л.И., Чупров В.В., Платэ Н.А. // Высокомолек. соед. А. 1988. Т. 30. № 10. С. 2088.
- Платэ Н.А., Валуев Л.И., Валуева Т.А., Ванчугова Л.В., Постников В.А., Синани В.А., Чупров В.В. // Докл. АН СССР. 1989. Т. 307. № 3. С. 652.
- Platé N.A., Valuev L.I., Valueva T.A., Chuprov V.V. // Biomaterials. 1993. V. 14. № 1. P. 51.
- Martinek K., Berezin I.V. // J. Solid-Phase Biochemistry. 1977. V. 2. № 4. P. 343.

### Interaction of Polymeric Derivatives of Trypsin with Its Protein Inhibitor

L. I. Valuev, O. N. Zefirova, A. V. Mamaeva, I. M. Shanaazarova, V. V. Chupov, and N. A. Platé

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

**Abstract** – Trypsin and its inhibitor (ovomucoid from duck egg whites) were immobilized on water-soluble polymers. The activities of immobilized proteins were found to be controlled by the nature of polymer chain. Immobilization on a flexible-chain polyacrylamide resulted in a decreased activity of the immobilized proteins because of the intramolecular association of their molecules. Polymer chains did not give rise to any additional steric hindrances for the interaction of the immobilized proteins with their substrates. When the proteins were immobilized on rigid-chain dextrans with different chainlengths, the activity of immobilized proteins was fully retained. In addition, the interaction between the immobilized enzyme and the immobilized inhibitor could be controlled.