ВЫСОКОМОЛЕКУЛЯРНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ

Том (А) 34 1992 № 11

УДК 541.64:547.458.6

© 1992 г. Л. И. Валуев, И. М. Шаназарова, Н. А. Платэ

ИММОБИЛИЗАЦИЯ ОВОМУКОИДА НА ДЕКСТРАНАХ

Изучена зависимость антитриптической и антихимотриптической активностей иммобилизованного на окисленном декстране овомукоида от молекулярных параметров полимера-носителя. Показано, что активность овомукоида определяется ММ полимера-носителя, степенью его окисления и количеством молекул белка, иммобилизованного на одной молекуле декстрана.

Ранее нами было обнаружено, что иммобилизация белков на макромолекулах гибкоцепных полимеров приводит к существенному изменению конформации этих молекул в растворе за счет ассоциации молекул белка, принадлежащих одной и той же полимерной цепи [1]. При этом чем выше гибкость полимерной цепи, тем более компактную структуру принимает макромолекула полимера. Повышение жесткости цепи нейтрализует возмущающее действие белков, препятствует образованию ассоциатов белков и тем самым облегчает их взаимодействие с субстратом.

В какой мере аналогичные эффекты проявляются при иммобилизации белков на жесткоцепные полимеры, остается не совсем ясным. А этот вопрос представляет исключительный интерес, так как знание корреляции между химической природой полимера-носителя и биологической активностью иммобилизованного на нем соединения является необходимым при создании новых типов физиологически активных полимеров.

В связи с этим целью настоящей работы является исследование зависимости биологической активности иммобилизованного белка от молекулярных параметров носителя: молекулярной массы и количества функциональных групп, способных реагировать с молекулой белка.

В качестве белка в работе использован овомукоид — ингибитор протеиназ, способ выделения и основные физико-химические характеристики которого описаны в работе [2], а в качестве жесткоцепного полимера — декстран, нашедший широкое применение при синтезе различных полимерных производных физиологически активных веществ [3].

Иммобилизацию овомукоида осуществляли по методике [4] путем предварительного окисления декстрана перйодатом натрия, реакцией образующегося диальдегиддекстрана с овомукоидом и последующим восстановлением боргидридом натрия азометиновой связи между декстраном и овомукоидом. Продукт иммобилизаци отделяли от белка и декстрана гель-фильтрацией на колонке с Сефадексом G-100, уравновешенной фосфатным буфером, pH 8,4. Низкомолекулярные продукты реакции удаляли гель-фильтрацией на колонке с Сефадексом G-25.

Ингибиторную активность овомукоида и его конъюгатов с декстраном измеряли по подавлению протеолитической активности трипсина и α-химотрипсина в соответствии с методикой [5]. Степень окисления овомукоида γ (количество альдегидных групп на 100 звеньев декстрана) определяли спектрофотометрически с помощью 4-амино-3-гидразино-5-меркапто-1,2,4-триазола, который в щелочной среде образует с альдегидами окрашенный

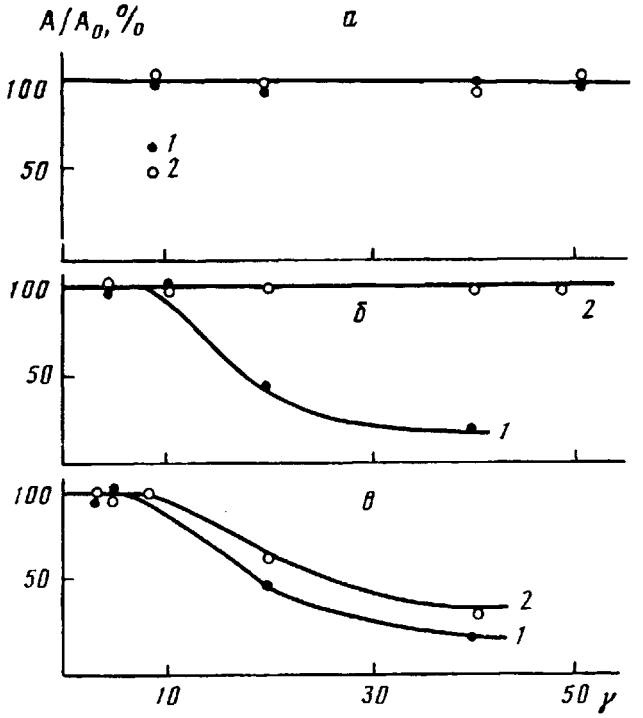


Рис. 1. Зависимость относительной антитриптической (1) и антихимотриптической активности (2) овомукоида от степени окисления декстранов. A и A_0 — активности иммобилизованного и нативного овомукоида. Молекулярная масса декстрана $M \cdot 10^{-4}$ = = 1,0 (*а*); 7,0 (*б*) и 50,0 (*в*)

6-меркапто-3-замещенный *s*-триазоло [4,3-в]-*s*-тетразин, поглощающий в области 520—555 нм [6].

Оценку конформационного состояния молекул овомукоида проводили методом кругового дихроизма. Спектры кругового дихроизма регистрировали на спектрополяриметре «Jasco J-500» (Япония).

Кинетику реакции диальдегиддекстранов с овомукоидом изучали путем титрования оставшихся после реакции свободных аминогрупп овомукоида тринитробензолсульфокислотой [7].

Основной биологической функцией овомукоида — гликопротеина с $M = 3{,}1 \cdot 10^4$, является взаимодействие с сериновыми протеиназами с образованием неактивных комплексов, константы диссоциации которых лежат в области 10^{-7}—10^{-9} моль/л [8]. Овомукоид имеет три независимых реактивных центра — один антихимотриптический и два антитриптических. В состав последних входят остатки лизина, аминогруппы которых могут реагировать с альдегидными группами носителя, что должно приводить к уменьшению антитриптической активности овомукоида; способность взаимодействовать с α-химотрипсином при этом не изменяется. Таким образом, овомукоид является удобной моделью, позволяющей путем измерения антитриптической и антихимотриптической активности ингибитора оценить возможное изменение нативной конформации белка при его иммобилизации и стерические препятствия для взаимодействия иммобилизованного белка с субстратами, а также в чистом виде выявить вклад в изменение активности белка непосредственно химической реакции между его аминогруппами и альдегидными группами носителя.

На рис. 1 приведены зависимости относительной активности иммобилизованного овомукоида от степени окисления декстранов различной молекулярной массы для продуктов мольного состава овомукоид : декстран = = 1 : 1.

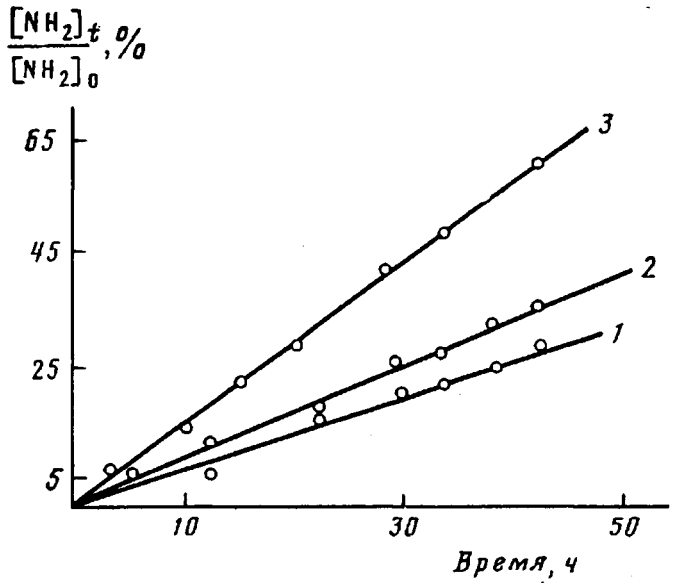


Рис. 2. Кинетика реакции овомукоида с декстранами $M \cdot 10^{-4}$ = 1,0 (*1*); 7,0 (*2*) и 50,0 (*3*). $[NH_2]_0 : [COH]_0 = 1 : 5{,}5$; $[NH_2]_0$ и $[NH_2]$ — исходная и текущая концентрация свободных аминогрупп в молекуле овомукоида

Из рис. 1, *а* видно, что активность овомукоида, иммобилизованного на низкомолекулярном декстране, в пределах ошибки измерения находится на уровне активности нативного ингибитора. Это означает, что короткая жесткая молекула декстрана практически не взаимодействует с аминогруппами реактивных центров овомукоида (овомукоид содержит 16 свободных аминогрупп, две из которых входят в антитриптический центр) и не создает стерических препятствий для взаимодействия ингибитора с ферментами.

Иная картина наблюдается для продукта реакции овомукоида с макромолекулой декстрана, обладающей большим конформационным набором (рис. 1, *б*). Видно, что с увеличением степени окисления декстрана антитриптическая активность конъюгатов уменьшается, что, по-видимому, связано с увеличением вероятности реакции альдегидных групп с аминогруппами активных центров. При этом не происходит существенного изменения конформации овомукоида, а молекула декстрана не создает стерических препятствий для взаимодействия с ферментами, о чем свидетельствует неизменность антихимотриптической активности продуктов реакции.

Для продукта реакции с более высокомолекулярным декстраном (500 000) с увеличением степени окисления наблюдается уменьшение как антитриптической, так и антихимотриптической активностей (рис. 1, *в*). Одной из причин этого явления может быть нарушение нативной конформации молекулы овомукоида в результате реакции с существенно превосходящей ее по размерам макромолекулой декстрана. Однако методом кругового дихроизма было обнаружено, что относительное содержание α-спирали во вторичной структуре овомукоида для нативного белка и его конъюгатов с декстраном одинаково и составляет 29 ± 6%. Следовательно, причиной наблюдаемого уменьшения активности овомукоида является блокирование части аминогрупп антитриптических центров, а также стерические препятствия для взаимодействия овомукоида с ферментами.

Обращает на себя внимание одинаковый характер изменения антитриптической активности для продуктов реакции с декстранами с $M = 7{,}0 \cdot 10^4$ и $5{,}0 \cdot 10^5$. Вероятно, для каждого типа полимеров существует минимальное

Зависимость активности иммобилизованного овомукоида от молекулярной массы декстрана и состава конъюгата (γ = 40)

Молекулярная масса декстрана М·10–4	Количество молекул овомукоида на одной молекуле декстрана	Активность, % от исходной (±6)	
		антитриптическая	антихимотриптическая
1,0	1	100	100
	2	100	100
7,0	1	20	100
	2—3	100	100
50,0	1	20	50
	2—3	100	100

значение молекулярной массы, т. е. минимальный набор конформационных состояний, выше которых возможно «подстраивание» полимерной цепи под глобулу белка с последующим многоточечным химическим взаимодействием. Если это так, то увеличение ММ полимера-носителя должно приводить к возрастанию скорости его взаимодействия с белком, что и наблюдается экспериментально (рис. 2).

По аналогии с гибкоцепными полимерами-носителями при иммобилизации на одной макромолекуле декстрана двух и более молекул овомукоида можно было ожидать понижения активности ингибитора за счет ассоциации молекул овомукоида и возникновения стерических препятствий для взаимодействия с ферментами. Однако оказалось, что в случае низкомолекулярного декстрана активность овомукоида при иммобилизации дополнительной молекулы ингибитора не уменьшается, а для высокомолекулярных декстранов активность даже увеличивается (таблица). Причина этого, по-видимому, заключается в том, что, во-первых, при реакции декстрана с несколькими молекулами овомукоида понижается вероятность его взаимодействия с аминогруппами реактивных центров, а во-вторых, одна, даже достаточно большая макромолекула декстрана не может экранировать доступность реактивных центров двух и более молекул ингибитора.

Таким образом, активность белков, иммобилизованных на жесткоцепных полимерах, определяется главным образом двумя факторами: составом конъюгата и молекулярной массой полимерного носителя. Обнаруженная зависимость позволяет в широких пределах варьировать активность иммобилизованных белков, а главное, обеспечивает возможность регулирования селективности действия белков по отношению к различным субстратам, например полностью или частично подавлять активность по отношению к одним соединениям при сохранении ее по отношению к другим.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *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.
2. *Шульгин М. Н., Валуева Т. А., Кестере Ф. Я., Мосолов В. В.*//Биохимия. 1981. Т. 46. № 3. С. 473.
3. *Чазов Е. И., Смирнов В. Н., Мазаев А. В., Торчилин В. П.*//ЖВХО. 1985. Т. 30. № 4. С. 365.
4. *Reiner R. H., Batz H.-G.*//Macromol. Chem. 1981. B. 182. № 6. S. 1641.
5. *Нортроп Д., Кунитц М., Херриотт Р. М.*//Кристаллические ферменты. М., 1950. С. 242—260.

6. *Erlanger B. F., Edel F., Looper A. G.*//Arch. Biochem. Biophys. 1966. V. 115. № 1. P. 206.
7. *Snyder S. L., Sobocinski P. S.*//Anal. Biochem. 1975. V. 64. № 2. P. 284.
8. *Ванчугова Л. Р., Валуева Т. А., Валуев Л. И., Розенфельд М. А., Синани В. А., Мосолов В. В., Платэ Н. А.*//Докл. АН СССР. 1988. Т. 300. № 3. С. 635.

Институт нефтехимического синтеза им. А. В. Топчиева
Российской академии наук,
Москва

Поступила в редакцию
16.04.92

L. I. Valuev, I. M. Shanazarova, N. A. Platé

IMMOBILIZATION OF OVOMUCOIDE ON DEXTRANES

Summary

The dependence of antitriptic and antichimotriptic activities of ovomucoide immobilized on oxidized dextrane on molecular parameters of polymer carrier has been studied. Activity of ovomucoide is shown to depend on MM of polymer carrier, degree of its oxidation and amount of the protein molecules immobilized on one dextrane molecule.