



УДК 577.112.4 : 542.951

**ЭФФЕКТИВНОСТЬ АЦИЛИРОВАНИЯ АМИНОГРУПП БЕЛКА
ХЛОРАНГИДРИДАМИ ЖИРНЫХ КИСЛОТ В СИСТЕМЕ
ОБРАЩЕННЫХ МИЦЕЛЛ АЭРОЗОЛЯ ОТ В ОКТАНЕ****Кабанов А. В., Клибанов А. Л.*, Торчилин В. П.*,
Мартинек К.***, Левашов А. В.***Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова,
кафедра химической энзимологии;*** Всесоюзный кардиологический научный центр
Академии медицинских наук СССР, Москва;**** Институт органической химии и биохимии
Чехословацкой Академии наук, Прага*

Исследована модификация водорастворимого фермента (α -химотрипсина) [^3H] пальмитоилхлоридом в системе обращенных мицелл аэрозоля ОТ в октаноле. Показано, что степень модификации фермента в мицеллярной системе зависит от молярного соотношения реагентов [пальмитоилхлорид]/[белок]. Реакция модификации характеризуется широким оптимумом pH (7,5–10) и проходит с высокой скоростью.

В настоящее время биотехнология и медицина нуждаются в разработке надежных и эффективных способов иммобилизации белков (ферментов) на гидрофобных носителях (как синтетических, так и природного происхождения) [1–3]. Один из возможных подходов к решению этой задачи заключается в искусственной гидрофобизации белков путем их химической модификации водонерастворимыми реагентами [4–10].

Так, в целях улучшения связывания гидрофильного белка с липидными мембранами предложено проводить его модификацию хлорангидридами жирных кислот [5, 7] или производными фосфолипидов [4, 8]. В результате модификации молекула белка приобретает гидрофобные «якорные» группы, обуславливающие ее адсорбцию на мембране [4, 5, 7, 8]. Использование таких искусственно гидрофобизованных белков открывает широкие возможности для создания систем направленного транспорта лекарств в организме [3, 11], а также в фундаментальных исследованиях для моделирования взаимодействий ферментов с биомембранами [12, 13].

Следует, однако, отметить, что модификация белков водонерастворимыми реагентами в водной среде сопряжена с рядом осложнений методического характера [14]. В частности, на примере реакции ацилирования аминокетильных групп α -химотрипсина стеароилхлоридом было показано, что в водном растворе количественно удается получить только высокомодифицированные препараты фермента, содержащие от 6 до 12 жирнокислотных остатков на молекулу белка [14]. (Причина этого, по-видимому, заключается в гетерогенности реакционной системы [14]. Реакция с белком происходит на поверхности микрокапель реагента, причем начавшаяся гидрофобизация белка способствует более прочной его адсорбции на капле реагента и тем самым его дальнейшему ацилированию [12, 14].)

Другая методическая трудность обусловлена тем, что в водной среде наряду с модификацией белка часто идет побочная реакция: гидролиз модифицирующего агента. Это приводит к необходимости введения в реакционную систему значительных (100- и 1000-кратных) его избытков [5, 7], что также затрудняет проведение реакции.

Эти затруднения были преодолены [14] при переходе от водной среды к микрогетерогенному коллоидному раствору, характеризующемуся низким (<5%) содержанием воды, — системе обращенных мицелл поверхностно-активных веществ (ПАВ) в органическом растворителе. При солю-

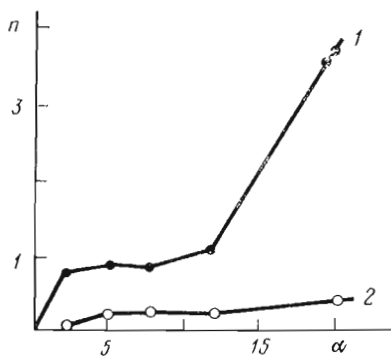


Рис. 1

Рис. 1. Зависимость степени модификации α -химотрипсина [^3H]пальмитоилхлоридом от соотношения реагентов ($\alpha = [\text{пальмитоилхлорид}]/[\text{ХТ}]$) в системе АОТ – вода – октан. n – число ковалентно (1) или нековалентно (2) связанных с молекулой белка жирнокислотных остатков (пояснения см. в «Экспер. части»). Условия модификации: концентрация АОТ – 0,1 М, ХТ – 0,1 мМ; $[\text{H}_2\text{O}]/[\text{АОТ}] = 20$; 0,04 М боратный буфер, рН 9,5

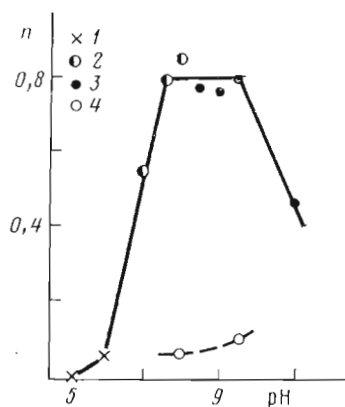


Рис. 2

Рис. 2. Зависимость от рН среды степени модификации α -химотрипсина [^3H]пальмитоилхлоридом в системе обращенных мицелл. n – число ковалентно (1–3) или нековалентно (4) связанных с молекулой белка остатков пальмитиновой кислоты. Условия модификации: концентрация АОТ – 0,1 М, ХТ – 0,1 мМ; $[\text{H}_2\text{O}]/[\text{АОТ}] = 20$; $[\text{пальмитоилхлорид}]/[\text{ХТ}] = 5$; 0,02 М фосфат-ацетатный (1), 0,1 М фосфатный (2), 0,1 М боратный буфер (3, 4)

билизации в такой системе молекула белка включается во внутреннюю водную полость обращенной мицеллы, приобретая своего рода оболочку из моно слоя гидратированного ПАВ [15]. Водонерастворимый реагент локализуется не только в объемной фазе органического растворителя, он также может встраиваться в поверхностный слой обращенной мицеллы, входя в контакт с модифицируемой группой белка.

Ранее [12, 14] было проведено ацилирование аминокрупп водорастворимых ферментов (α -химотрипсин, трипсин) стеароилхлоридом в системе обращенных мицелл аэрозоля ОТ (АОТ) в октане. Показано, что в мицеллярном растворе с высоким выходом ($>80\%$) могут быть получены препараты гидрофобизованных ферментов, содержащие 1–2 жирнокислотных остатка на молекулу белка и сохраняющие каталитическую активность [12, 14]. (Такие «частично гидрофобизованные» ферменты представляют особый интерес при моделировании взаимодействия водорастворимых белков с биомембранами [12].) Целью настоящей работы являлось изучение эффективности модификации α -химотрипсина (ХТ) в системе обращенных мицелл [^3H]пальмитоилхлоридом.

Мы обнаружили, что степень модификации фермента в мицеллярной системе не зависит от его концентрации, степени гидратации и концентрации АОТ, а определяется только молярным соотношением реагентов ($[\text{пальмитоилхлорид}]/[\text{ХТ}]$) в системе (рис. 1). Отметим, что модификация белка в системе обращенных мицелл проходит при использовании существенно меньших избытков хлорангидрида, чем в водном растворе: уже в условиях 2–5-кратного избытка пальмитоилхлорида могут быть получены препараты, содержащие один остаток жирной кислоты на молекулу белка (рис. 1).

Ацилирование аминокрупп белков хлорангидридами карбоновых кислот проводят, как правило, в слабощелочных растворах (рН 8,0) (см., например, [16]). При проведении этой реакции в системе обращенных мицелл следует учитывать, что «локальное значение рН» во внутренней водной полости обращенных мицелл может существенно отличаться от рН солибилизируемого водного раствора [15]. Кроме того, из-за низкого содержания водной фазы мицеллярный раствор обладает малой буферной емкостью. В этой связи мы изучили рН-зависимость реакции модифика-

ции α -химотрипсина пальмитоилхлоридом в системе обращенных мицелл. Из рис. 2 видно, что реакция имеет широкий оптимум pH (7,5—10,0).

Скорость модификации белка в системе обращенных мицелл, по-видимому, очень велика. Реакция завершается за время смешения реагентов (десятки секунд).

Следует отметить, что выбор компонентов (ПАВ, органических растворителей), образующих системы обращенных мицелл, исключительно широк [15]. В этих системах могут быть солюбилизованы самые различные по природе белки [15]. Поэтому можно надеяться, что предложенный подход [14] для модификации белков водонерастворимыми реагентами универсален и найдет широкое применение в химии белков.

Экспериментальная часть

В работе использовали α -химотрипсин (КФ 3.4.21.1; Koch-Light, Великобритания); аэрозоль ОТ (АОТ, натриевая соль ди-2-этилгексилевого эфира сульфоянтарной кислоты) и хлористый тионил (Merck, ФРГ); иодоген (1,3,4,6-тетрахлор-3 α ,6 α -дифенилгликолурил) (Pierce, США); раствор иодистого натрия, меченного ^{125}I (удельная радиоактивность 0,5 мКи/мкл; Amersham, Великобритания). Пальмитоилхлорид, меченный тритием (^3H пальмитоилхлорид), получали действием хлористого тионила на смесь пальмитиновой кислоты (Sigma, США) и ^3H пальмитиновой кислоты (Amersham, Великобритания). Полученный препарат очищали перегонкой в вакууме (температура плавления 41°С, что соответствует данным [17]; удельная радиоактивность 0,17 нКи/мкмоль). Остальные реактивы отечественного производства имели квалификацию ч. и ч.д.а.

Получение препарата α -химотрипсина, меченного ^{125}I , проводили по методике, аналогичной описанной в работе [18]. В пробирку, содержащую 40 нмоль твердого иодогена, вносили 100 мкл 0,2 мМ раствора α -химотрипсина в 20 мМ фосфатном буфере, pH 6, 9, и 3 мкл Na^{125}I . Систему инкубировали 30 мин при 20°С. Раствор белка отделяли от иодогена и дализовали (15 ч, 4°С) против 600 мл 1 мМ HCl , используя мембрану из целлюлозы (Visking, США). Для контроля за содержанием в полученном препарате свободной, не связанной с белком метки белок осаждали 10% раствором трихлоруксусной кислоты и определяли радиоактивность осадка и супернатанта. Не менее 80% метки оказывается связанной с белком.

α -Химотрипсин, меченный ^{125}I (удельная радиоактивность 17 нКи/мкмоль), модифицировали ^3H пальмитоилхлоридом по методике, аналогичной описанной в работе [14]. При модификации варьировали соотношения [пальмитоилхлорид]/[ХТ] (2—20), $[\text{H}_2\text{O}]/[\text{АОТ}]$ (10—25), концентрацию фермента в системе (28—100 мкМ), pH (для 20 мМ фосфат-ацетатного буфера 5—6, для 0,1 М фосфатного 7—8, для 0,1 М боратного 8,5—11). Белок осаждали из системы обращенных мицелл ацетоном. В полученных препаратах определяли радиоактивность ^{125}I и трития и рассчитывали число остатков пальмитиновой кислоты, связанных с одной молекулой белка.

При изучении кинетики модификации α -химотрипсина пальмитоилхлоридом реакцию останавливали через определенные промежутки времени, осаждая белок из реакционной системы ацетоном. (Было показано, что пальмитоилхлорид не взаимодействует с осажденным белком.)

Для определения количества нековалентно связывающейся с белком пальмитиновой кислоты (образующейся при модификации белка в результате гидролиза пальмитоилхлорида) изменяли порядок добавления реагентов в реакционную систему. С этой целью в 0,1 М АОТ в октано ввели пальмитоилхлорид и солюбилизовали буферный раствор ($[\text{H}_2\text{O}]/[\text{АОТ}]=4$). Мицеллярную систему инкубировали при 20°С 5—6 ч и только после этого в нее добавляли концентрированный раствор белка. Последующее инкубирование системы и выделение белка проводили так, как описано выше.

Измерение радиоактивности препаратов, меченных тритием, проводили с помощью β -счетчика Rackbeta-II (ЛКВ, Швеция), используя сцинтилляционную жидкость Unisolve-100, в которой солюбилизовали 3—7% водного раствора образца (эффективность счета 20—22%).

Измерение радиоактивности препаратов, меченных ^{125}I , проводили с помощью γ -счетчика Minigamma-1275 (ЛКВ, Швеция) с эффективностью счета 54%.

При измерении радиоактивности двойной метки (^{125}I — ^3H) учитывали фоновую β -радиоактивность, регистрируемую в канале трития при распаде ^{125}I . Величина фона не превышала 30% от измеряемой величины. Ошибка измерения не превышала 10%.

ЛИТЕРАТУРА

1. Блотехнология/Ред. Баев А. А. М.: Наука, 1984. 309 с.
2. Введение в прикладную энзимологию // Ред. Вережин И. В., Мартинек К. М.: Изд-во МГУ, 1982. 383 с.
3. Torchilin V. P. // Liposome technology. V. 3/Ed. Gregoriadis G. Boca Raton, Florida: CRC Press, 1984. P. 79—94.

4. *Sinha D., Karush F.* // Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1979. V. 90. № 2. P. 554–560.
5. *Торчилин В. П., Клибанов А. Л.* // Биоорган. химия. 1980. Т. 6. № 5. С. 791–793.
6. *Budker V. G., Mustaev A. A., Pressman E. K., Roschke V. V., Vakrusheva T. E.* // Biochim. et biophys. acta. 1982. V. 688. № 2. P. 541–546.
7. *Goldmacher V. S.* // Biochem. Pharmacol. 1983. V. 32. № 7. P. 1207–1210.
8. *Torchilin V. P., Klibanov A. L., Smirnov V. N.* // FEBS Lett. 1982. V. 138. № 1. P. 117–120.
9. *Remy M. H., Bourdillion C., Thomas D.* // Biochim. et biophys. acta. 1985. V. 829. № 1. P. 69–75.
10. *Shimada A., Yazawa E., Arai S.* // Agric. Biol. Chem. 1982. V. 46. № 1. P. 173–182.
11. *Torchilin V. P., Klibanov A. L., Ivanov N. N., Gluchkova M. A., Koteliansky V. E., Kleinman H. K., Martin G. S.* // J. Cell. Biochem. 1985. V. 28. P. 23–29.
12. *Кабанов А. В., Наметкин С. Н., Левашов А. В., Мартинек К.* // Биол. мембраны. 1985. Т. 2. № 10. С. 985–995.
13. *Кабанов А. В., Левашов А. В., Мартинек К.* // Вестн. МГУ. Сер. 2. Химия. 1986. Т. 27. № 26. С. 592–596.
14. *Левашов А. В., Кабанов А. В., Хмельницкий Ю. Л., Березин И. В., Мартинек К.* // Докл. АН СССР. 1984. Т. 278. № 1. С. 246–249.
15. *Хмельницкий Ю. Л., Левашов А. В., Клячко Н. Л., Мартинек К.* // Успехи химии. 1984. Т. 53. № 4. С. 545–565.
16. *Якуницкая Л. М., Беляков Н. В., Самарцев М. А., Кёстнер А. И.* // Биохимия. 1983. Т. 48. Вып. 10. С. 1596–1603.
17. Handbook of chemistry and physics. V. 17/Ed. Hodgman C. D. Cleveland: Chemical Rubber Publ. Co., 1951. 1414 p.
18. *Markwell M. A. K., Fox C. F.* // Biochemistry. 1978. V. 17. P. 4807–4817.

Поступила в редакцию
3.II.1987

EFFICIENCY OF PROTEIN AMINO GROUP ACYLATION WITH FATTY ACID CHLORIDES IN REVERSED MICELLES OF AEROSOL OT IN OCTANE

KABANOV A. V., KLIBANOV A. L.*, TORCHILIN V. P.*,
MARTINEK K.**, LEVASHOV A. V.

*M. V. Lomonosov Moscow State University; * All-Union Gardiological
Scientific Centre, Moscow; ** Institute of Organic Chemistry and
Biochemistry, Academy of Sciences of CSSR, Prague*

The characteristics of water-soluble enzyme (α -chymotrypsin) modification with [^3H] palmitoyl chloride in the reversed Aerosol OT micelles in octane were determined. The degree of enzyme modification depends on the molar ratio [palmitoyl chloride]/[protein]. The modification reaction is characterized by the wide pH-optimum range and proceeds with high speed.