



БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

Том 19 * № 9 * 1993

УДК 547.441;577.122;542.953

© 1993 Н. П. Кузнецова, Р. Н. Мишаева, С. В. Кольцова,
Л. Р. Гудкин, Л. М. Страгович, Е. Г. Большаякова

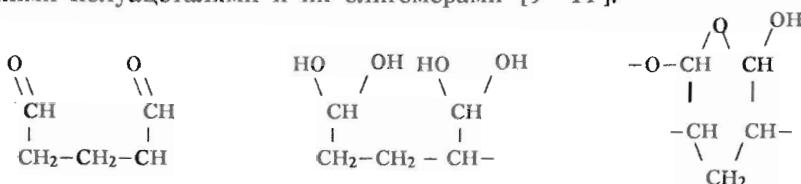
ОБРАЗОВАНИЕ СТАБИЛЬНЫХ ПРОДУКТОВ ПРИ ВЗАИМОДЕЙСТВИИ ГЛУТАРОВОГО АЛЬДЕГИДА С НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫМИ РЕАГЕНТАМИ

Институт высокомолекулярных соединений РАН, Санкт-Петербург

Изучено взаимодействие глутарового альдегида с рядом низкомолекулярных реагентов, обычно использующихся для прекращения реакций ковалентной сшивки белков глутаровым альдегидом,— лизином, три(гидроксиметиламинометаном), сульфатом аммония, бисульфитом натрия, боргидридом калия. Проведено сравнение реакционной способности этих реагентов. О стабильности продуктов конденсации глутарового альдегида с реагентами судили по их устойчивости к действию гидроксиламина.

В настоящее время широкое распространение получил метод химической модификации и сшивки белковых молекул глутаровым альдегидом (GA) [1, 2]. Реакция протекает в мягких условиях при комнатной температуре в нейтральных водных растворах, при которых белки не претерпевают конформационных изменений. Своеобразие взаимодействия белков с GA состоит в образовании продуктов, стабильных в широком диапазоне pH, ионной силы растворов и температур [3, 4]. Реакции же белков с монофункциональными альдегидами (формальдегид, ацетальдегид, пиродоксаль и др.), в результате которых образуются гидролизующиеся при низких значениях pH Шиффовы основания [5], обычно полностью обратимы. Несмотря на то что реакция GA с белками изучалась многими исследователями [2, 3, 6—8], механизм ее до сих пор не выяснен, что связано как со сложностью белковой макромолекулы, так и с неоднородностью и полифункциональностью GA.

Глутаровый альдегид $O=CH-(CH_2)_3-NC=O$ — химически весьма активное соединение и в мономерной форме неустойчив. В слабокислых растворах ($pH \sim 5$) альдегидная форма GA находится в равновесии с гидратированной формой, циклическими полуацеталами и их олигомерами [9—11].



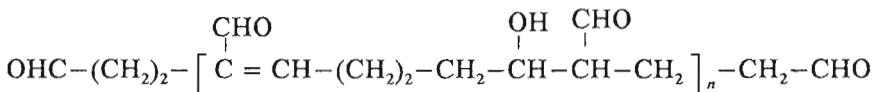
звено альдегида

звено
гидратированного
альдегида

звено
циклического
полуацетала

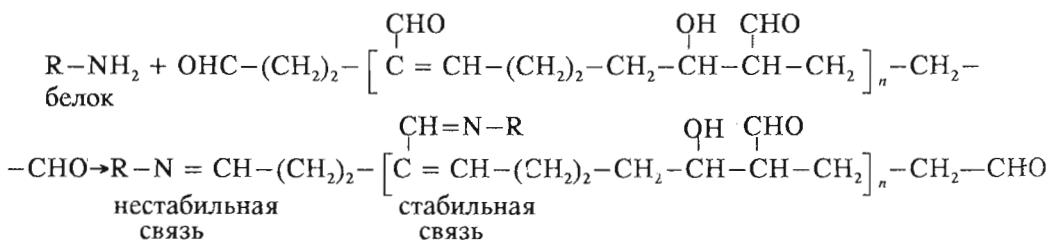
Продукты взаимодействия GA с аминогруппами белков, полученные в слабокислой среде, нестабильны и легко гидролизуются на исходные компоненты [11—13].

В нейтральных и слабощелочных растворах (рН 5—8) в результате альдольной конденсации с последующей дегидратацией GA переходит в α,β -ненасыщенные альдегидные олигомерные производные [3], образуя структуры типа замещенного акролеина $\begin{array}{c} \text{CHO} \\ | \\ \text{C} = \text{C} - \text{HC} = \text{O} \\ / \beta \quad \alpha \end{array}$, в которых двойная этиленовая связь сопряжена с двойной связью альдегидной группы [7, 11—13]. В олигомерной форме GA может быть представлен в следующем виде:



Но следует учитывать, что в водных растворах GA всегда присутствует набор олигомерных продуктов его конденсации, включающих в себя как линейные, так и циклические звенья с сопряженными и несопряженными альдегидными группами.

Предполагается, что при взаимодействии GA с белками в нейтральных и слабощелочных растворах [7] обычные альдегидные группы GA образуют с аминогруппами белка неустойчивые альдиминные связи. Полученные Шиффовы основания могут легко гидролизоваться до исходных компонентов. Альдегидные же группы GA, сопряженные с двойной связью, вероятно, способны образовывать необычайно устойчивые альдиминные связи (стабильные Шиффовы основания).



Ричардс и Ноулес предположили также [3], что первичные аминогруппы белков могут атаковывать этиленовую двойную связь в α,β -непредельном олигомере GA по типу реакции Михаэля, представляющей собой сопряженное присоединение нуклеофилы к α,β -ненасыщенным системам, и образовывать стабильные продукты. Это предположение подтверждается авторами работы [4], показавшими, что при взаимодействии GA с ϵ -аминогруппами остатков лизина в трипсине кроме неустойчивых при низких значениях рН Шиффовых оснований образуются продукты, устойчивые в условиях кислотного гидролиза. В пользу образования стабильных продуктов (хотя и не ясно, какой химической природы) говорят и имеющиеся данные о том, что гидроксималин не снимает полностью модификацию казеина, вызванную GA, тогда как Шиффовы основания, образованные при модификации этого белка формальдегидом и глиоксалем, разрушаются гидроксималином [5].

Для прекращения реакции конденсации аминных групп белка с альдегидными группами GA и нейтрализации непрореагировавших альдегидных групп GA в ряде случаев используют специальные низкомолекулярные реагенты: аминокислоты, соли аммония, трис(гидроксиметиламинометан), бисульфит натрия, боргидриды металлов.

В данной работе сделана попытка сравнить реакционную способность перечисленных соединений (терминаторов реакции конденсации).

В качестве одного из таких терминаторов использовался лизин. Изучение взаимодействия GA с лизином являлось информативным в двух аспектах: 1) лизин как терминатор реакции конденсации GA с белком; 2) как модель взаи-

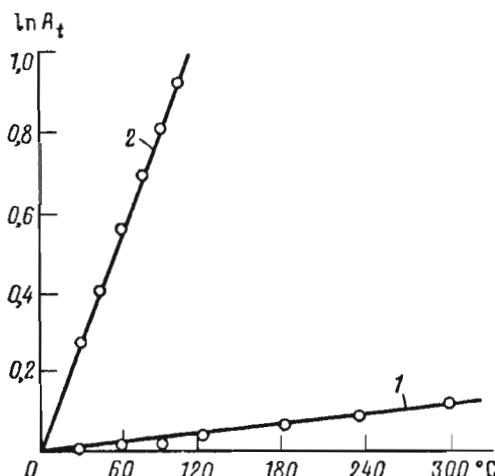


Рис. 1

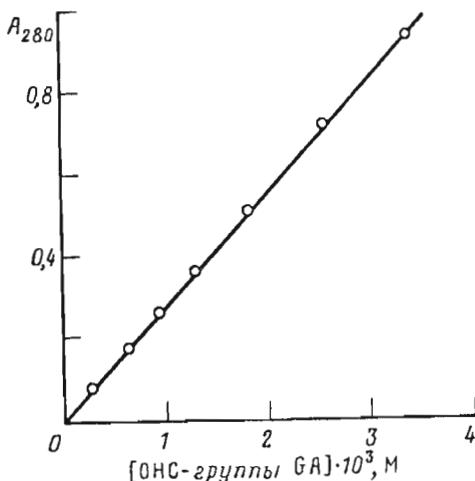


Рис. 2

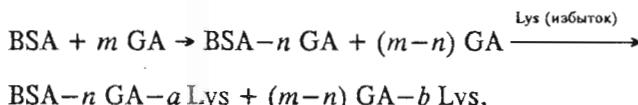
Рис. 1. Кинетика реакции конденсации лизина с глутаровым альдегидом при 22° С и pH 5,9 (1) и 7,5 (2). [Lys] 0,9·10⁻³ М или [H₂N-группы] 1,8·10⁻³ М; [OHC-группы GA] 1,8·10⁻² М

Рис. 2. Зависимость оптического поглощения (A_{280}) продуктов конденсации глутарового альдегида с лизином от концентрации альдегидных групп в реакционной смеси. Время инкубаций 24 ч, температура смеси 10° С, [Lys] 12,5·10⁻³ М, pH 7,0

модействия GA с аминокислотными остатками белковой макромолекулы, поскольку известно, что в реакции модификации белков GA участвуют в основном ε-аминогруппы остатков лизина этих белков [2, 8, 14, 15].

Образование продуктов реакции GA с лизином сопровождается появлением полосы поглощения в ультрафиолетовой области спектра в диапазоне длин волн 260—280 нм [15]. Изменение оптического поглощения (A) при λ 280 нм в результате реакции лизина с GA можно использовать для кинетического анализа системы. Так, по наклону начального прямолинейного участка зависимости $\ln A_t$ от времени (A_t — оптическое поглощение в отсчетный момент времени) графически были определены величины констант скорости реакции конденсации при pH 5,9 и 7,5. Как следует из рис. 1, при изменении pH реакционной смеси от 5,9 до 7,5 (при 22° С) константа скорости конденсации возрастает более чем на порядок (с 0,7·10⁻³ до 8,8·10⁻³ с⁻¹), что обусловлено, вероятно, увеличением концентрации непротонированных реакционноспособных аминогрупп лизина. Изменение констант скорости реакции лизина с GA при варьировании температуры реакционной смеси от 6 до 22° С при pH 7,0 позволило оценить энергию активации системы: 26 кДж/моль. Эта величина сопоставима с определенными ранее значениями энергии активации реакции белков с GA [2, 15], что может указывать на идентичность механизмов протекающих процессов.

Увеличение концентрации одного из компонентов в реакции лизина с GA при сохранении постоянной избыточной концентрации другого приводит к линейному возрастанию оптического поглощения продуктов реакции в ультрафиолетовой области спектра (рис. 2). На основании этого можно определить количество альдегидных групп GA, не связавшихся с белком при его модификации, в случае, когда определение альдегидных групп методом потенциометрического титрования не может быть использовано ввиду высокой буферной емкости раствора. Так, например, сравнение гель-хроматограмм продуктов конденсации BSA с GA при последующей остановке реакции добавлением избытка лизина, происходящей по схеме



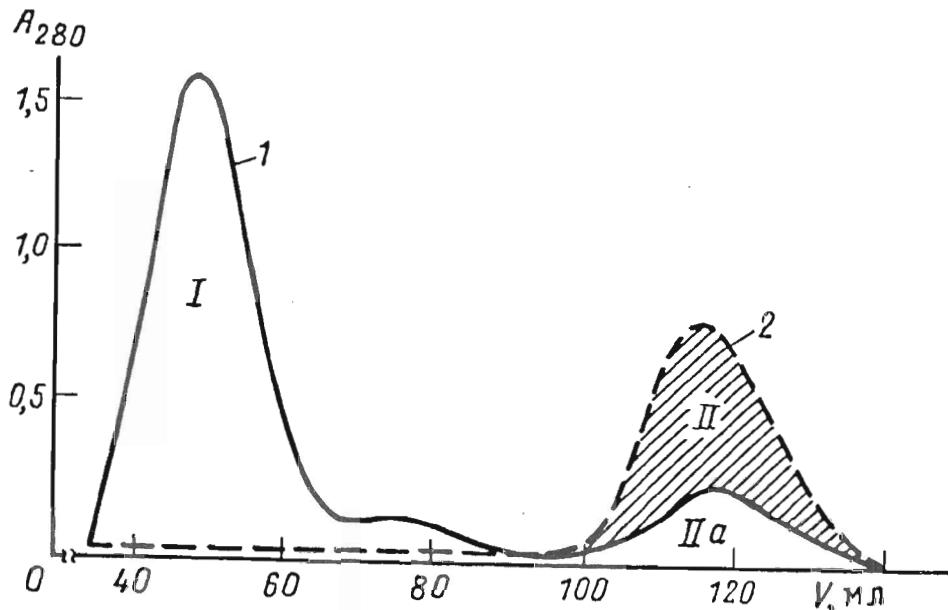


Рис. 3. Результаты хроматографии на ультрагеле Aca44 в 0,1 М фосфатном буфере, pH 7,0, при 10°C продуктов реакции BSA с глутаровым альдегидом с последующим добавлением лизина (I) и продуктов реакции лизина с глутаровым альдегидом (2). Размер колонки 1,6×60 см; объем нанесения — 0,5 мл реакционной смеси. Пик I — конденсат BSA-nGA-aLys; пик II и IIa — продукты конденсации GA-bLys. Время инкубации 1 ч для BSA + GA и 24 ч после добавления лизина. Исходные концентрации в реакционных смесях (I) и (2): BSA $5 \cdot 10^{-4}$ М, ОНС-групп GA 0,094 М, Lys 0,5 М

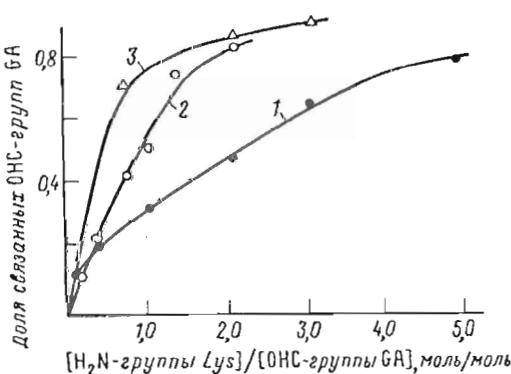


Рис. 4

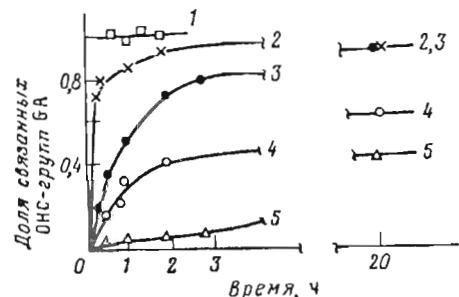


Рис. 5

Рис. 4. Зависимость доли альдегидных групп GA, образовавших стабильные продукты при реакции с аминогруппами лизина, от соотношения компонентов в исходной реакционной смеси. Гидроксилиамин добавляли после инкубации смеси в растворе с pH 7,0 в течение 1 ч при 6°C (1) и 22°C (2) и в течение 20 ч при 22°C (3)

Рис. 5. Кинетика реакции GA с боргидридом калия (1) и образования стабильных продуктов с бисульфитом натрия (2), лизином (3), сульфатом аммония (4) и трисом (5). Исходное соотношение [реагент]/[ОНС-группы GA] 2 моль/моль. [ОНС-группы] 0,1 М, 6°C, pH 7,0

и продуктов реакции лизина с GA при исходных постоянных концентрациях лизина и GA показывает (рис. 3), что площадь пика IIа пропорциональна количеству альдегидных групп, а следовательно, и молекул GA, оставшихся не связанными с белком после образования конъюгата BSA—nGA. Разность площадей пиков II и IIа (заштрихованная на рис. 3) коррелирует с количеством альдегидных групп в этом конъюгате. Используя линейную зависимость, представленную на рис. 2, по величине пика IIа можно определить количество альдегидных групп в реакционной смеси BSA с GA, не связавшихся с BSA.

В дальнейшем при сравнении реакционной способности указанных выше терминаторов реакции конденсации исследовались только стабильные производные, образующиеся при реакции этих соединений с GA. Стабильность продуктов взаимодействия реагентов с GA определялась по их устойчивости к действию гидроксилиамина, который использовался и для определения количества непрореагировавших альдегидных групп.

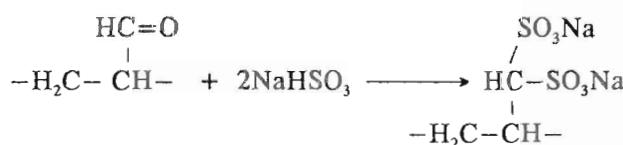
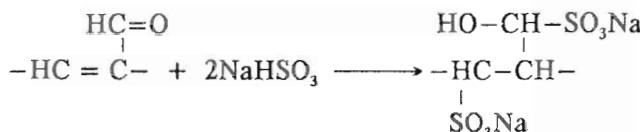
Образование стабильных продуктов в результате реакции альдегидных групп GA с аминогруппами лизина исследовано в зависимости от исходного соотношения [H₂N-группы Lys] / [OHC-группы GA], времени и температуры реакции.

При избытке альдегидных групп в реакции лизина с GA в течение 1 ч участвует только одна аминогруппа лизина (рис. 4, I и 2). Можно предположить, что это менее протонированная α -NH₂-группа, имеющая более низкое значение *pK* (для α -NH₂- и ϵ -NH₂-групп 8,95 и 10,5 соответственно). При эквимолярных соотношениях групп [NH₂] / [CHO] в реакцию с образованием стабильных продуктов в течение 1 ч вступает только 30% (при 6° С) и 50% (при 22° С) альдегидных групп GA. Это было подтверждено параллельным определением концентрации аминогрупп, оставшихся свободными в этих условиях. Только длительная инкубация реакционной смеси (20 ч при 22° С) приводит к участию в реакции и второй аминогруппы лизина.

Сравнение реакционной способности ряда других реагентов в выбранных нами условиях (pH 7,0, заданная температура) показало, что наиболее медленно с GA реагирует три(гидроксиметиламинометан) (рис. 5). В течение 20 ч в реакцию вступает около 50% общего количества альдегидных групп GA при соотношении 2,5 моль три(гидроксиметиламинометан) на 1 моль OHC-групп GA (рис. 6). В случае реакции GA с сульфатом аммония половина альдегидных групп связывается при исходном соотношении 1 моль сульфата аммония на 1 моль альдегидных групп.

Боргидрид калия полностью восстанавливает альдегидные группы до спиртовых за 20–30 мин, для восстановления 1 моль OHC-групп GA достаточно 0,5 моль KBH₄ (рис. 6).

Особо следует остановиться на реакции GA с бисульфитом натрия. В работе Маргеля [11] сообщается, что бисульфит натрия реагирует по-разному с сопряженными и несопряженными альдегидными группами GA, причем продукты получаются или стабильные, или обратимо гидролизующиеся:



Продукты последней реакции нестабильны. Как следует из рис. 6, реакция бисульфита натрия с GA завершается практически полностью (>90%) с образованием стабильных продуктов при исходном соотношении 2 моль NaHSO₃ на

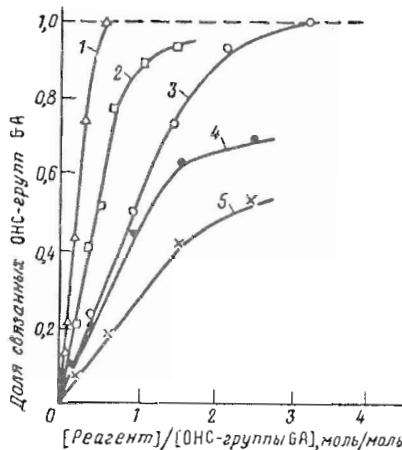


Рис. 6. Зависимость от исходного соотношения реагентов связывания альдегидных групп в реакции глутарового альдегида с боргидридом калия (1), а также образования стабильных продуктов с лизином (2), бисульфитом натрия (3), сульфатом аммония (4) и тризом (5). Время инкубации 20 ч, 22° С

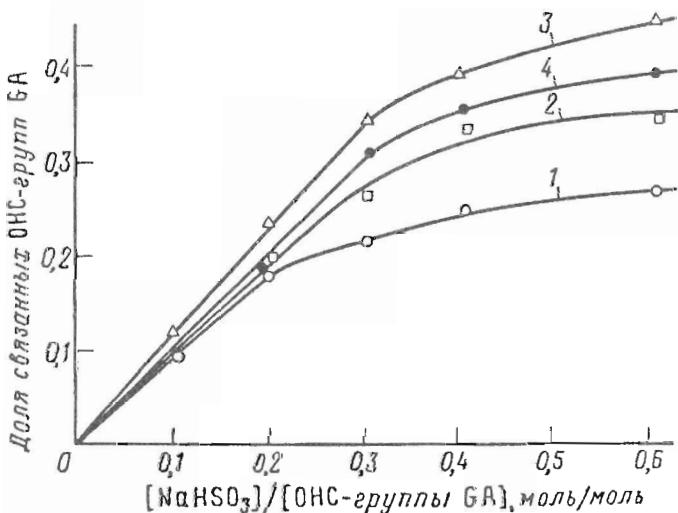


Рис. 7. Зависимость от соотношения $[NaHSO_3]/[ОНС\text{-группы ГА}]$ в реакционной смеси доли связанных альдегидных групп при 12° С через 30 мин (1), 1,5 ч (2), 4 ч (3) и при 25° С через 15 мин (4)

1 моль ОНС-групп ГА, что соответствует приведенной схеме [11]. Наиболее подробно нами рассмотрено связывание бисульфита натрия с ГА при малых мольных соотношениях $NaHSO_3/\text{ОНС-группы}$ — от 0,1 до 0,6 (рис. 7). Из рис. 7 и начального участка кривой 3 рис. 6 видно, что количество стабильно связанных ОНС-групп ГА не согласуется со схемой, приведенной Маргелем, которая, по всей вероятности, отражает предельное насыщение альдегидных групп ГА (2 моль $NaHSO_3$ на 1 моль ОНС-групп ГА). При низких соотношениях $[NaHSO_3]/[\text{ОНС-группы}]$ (до 0,2—0,3 в зависимости от времени инкубации и температуры реакционной смеси) наблюдается линейная зависимость, соответствующая связыванию эквимольного количества реагентов (1 моль $NaHSO_3$ с 1 моль ОНС-групп ГА), механизма которого неясен. С увеличением соотношения компонентов (более 0,3) прямая пропорциональность между долей стабильно

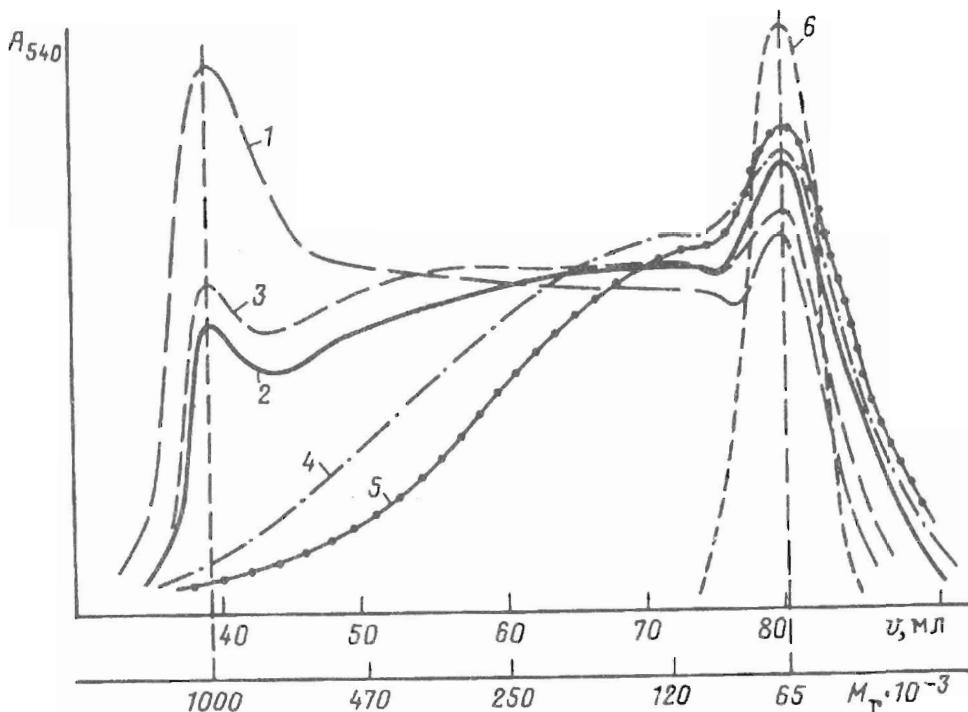


Рис. 8. Гель-хроматография на колонке (1,8×60 см) с сефарозой 6Б продуктов реакции гемоглобина с GA [17]. Реакция продолжается без добавления терминатора (1). Через 1 ч добавляется КВН₄ (КВН₄/ОНС-группы GA = 0,5 моль/моль) (2) или NaHSO₃ в соотношении NaHSO₃/ОНС-группы GA (моль/моль) 0,4 (3), 1,1 (4) и 1,5 (5), 6 — немодифицированный гемоглобин. Скорость элюции 12 мл/ч, 0,05 М фосфатный буфер, pH 7,1. На оси абсцисс параллельно с объемом элюата приведены значения молекулярных масс соответствующих модифицированных продуктов согласно работе [18]

связанных альдегидных групп GA и исходным соотношением компонентов в реакционной смеси нарушается. По всей вероятности, в этих условиях включается механизм, соответствующий схеме Маргеля, который полностью реализуется при соотношениях $[NaHSO_3]/[ОНС-группы GA]$ более 0,6, что зависит от температуры и времени реакции.

Следует отметить, что избыток бисульфита натрия может способствовать разрушению альдиминных связей в Шиффовых основаниях, образованных при взаимодействии белка с GA [16]. На рис. 8 представлены результаты гельпроникающей хроматографии продуктов конденсации гемоглобина с GA. Использование бисульфита натрия в качестве терминатора этой реакции (соотношение GA/гемоглобин = 20 : 1, моль/моль; концентрация гемоглобина $7,7 \cdot 10^{-4}$ М; pH 7,0; 10° С) показывает, что увеличение количества NaHSO₃, добавленного через 1 ч после начала реакции спшивания гемоглобина глутаровым альдегидом, уменьшает содержание высокомолекулярных производных модифицированного гемоглобина, т. е., вероятно, связано с разрушением межмолекулярных сшивок (рис. 8, 4, 5). Добавление в конце реакции гемоглобина с GA лизина или КВН₄ в качестве терминаторов не меняет молекулярно-массового распределения спищих продуктов.

Таким образом, рассмотренные реакции ряда реагентов с GA представляют интерес при использовании их как терминаторов в реакции конденсации белков с GA, а также при выборе оптимальных условий нейтрализации избыточных альдегидных групп в образованных продуктах конденсации. Из всех исследованных терминаторов реакции наибольшей реакционной способностью обладает боргидрид

калия (рис. 6), который восстанавливает, как известно, не только альдегидные группы, но и альдиминные связи в Шиффовых основаниях [19].

Экспериментальная часть

Применяли следующие реагенты: боргидрид калия, сульфат аммония, трис(гидроксиметиламинометан) — отечественного производства марки х.ч., лизин солянокислый (Serva, Германия), BSA (Calbiochem, США). Гемоглобин получали из донорской крови [20]. Бисульфит натрия готовили перед использованием [21], его концентрацию определяли иодометрически.

Содержание свободных аминогрупп в лизине и после его реакции с GA оценивали с помощью 2,4,6-тринитробензолсульфокислоты [22].

В работе использовали 25% водный раствор глутарового альдегида (Reanal, Венгрия), который очищали вакуумной перегонкой с отбором средних фракций (температура кипения 21—23 и 24—29° С при давлении 2,7—4,0 гПа). Концентрацию альдегидных групп определяли методом дифференциальной pH-метрии с гидроксиламином [23]. Долю связанных с терминатором альдегидных групп рассчитывали по разности между их исходным и конечным содержанием.

Гельпроникающую хроматографию проводили на ультрогеле Aca44 (LKB, Швеция) и на сепарозе 6Б (Pharmacia, Швеция). Колонки для хроматографии предварительно уравновешивали буферными растворами определенной ионной силы и pH. Общую концентрацию гемоглобиновых производных определяли спектрофотометрически при длине волны 540 нм [24].

Реакцию конденсации GA с исследуемыми реагентами при изучении образования их стабильных продуктов проводили при инкубации данной смеси в течение определенного времени и при определенной температуре, после чего к отобранный пробе добавляли равный объем раствора гидроксиламина (рН 3,7), как требуется по методу определения свободных альдегидных групп [23].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Фрейдлин Г. А., Голубков Л. А., Адамова М. И. Глутаровый альдегид. М.: НИИТЭХИМ, 1983. 44 с.
2. Hopwood D.//Fixation in Histochemistry/Ed. P. Y. Stoward. L.: Chapman Hall, 1973. P. 47—84.
3. Richard F. M., Knowles J. R.//J. Mol. Biol. 1968. V. 37. № 1. P. 231—233.
4. Казанская Н. Ф., Кост О. А., Березин И. В.//Биоорган. химия. 1975. Т. 1. № 9. С. 1337—1344.
5. Глинка А. В., Воронина А. С.//Биоорган. химия. 1977. Т. 3. № 8. С. 1070—1077.
6. Lubig R., Kusch R., Röper K., Zahn H.//Monatshefte Chem. 1981. B. 112. S. 1313—1323.
7. Monsan P., Puzo G., Mazarguil H.//Biochimie. 1975. V. 57. № 11—12. P. 1281—1292.
8. Habeeb A. F. S. A., Hiramoto R.//Arch. Biochem. and Biophys. 1968. V. 126. № 1. P. 16—26.
9. Hardy P. M., Nichols A. C., Rydon H. N.//Chem. Commun. 1969. № 10. P. 565—566.
10. Whippel E. B., Ruta M.//J. Organ. Chem. 1974. V. 39. № 12. P. 1666—1668.
11. Margell S.//J. Polym. Sci. 1984. V. 22. № 1. Part 2. P. 3521—3533.
12. Margel S., Rembaum A.//Macromolecules. 1980. V. 13. № 1. P. 19—24.
13. Rembaum A., Margel S.//Brit. Polym. J. 1978. V. 10. № 4. P. 275—280.
14. Hopwood D., Allen C. R., McCabe M.//Histochem. J. 1970. V. 2. № 2. P. 137—150.
15. Кузнецова Н. П., Самсонов Г. В.//Высокомолекулярн. соединения. А. 1986. Т. 28. № 3. С. 643—648.
16. Кузнецова Н. П., Гудкин Л. Р., Самсонов Г. В.//Биоорган. химия. 1990. Т. 16. № 1. С. 41—46.
17. Кузнецова Н. П., Кленин С. И., Волкова Л. А., Гудкин Л. Р., Самсонов Г. В.//Высокомолекулярн. соединения. А. 1989. Т. 31. № 7. С. 1539—1543.
18. Кузнецова Н. П., Самсонов Г. В.//Высокомолекулярн. соединения. А. 1985. Т. 27. № 12. С. 2611—2614.
19. Means G. E., Feeney R. E. Chemical Modification of Proteins. Holden-Day Inc., 1971. P. 149.
20. Rabiner S. F.//J. Exp. Med. 1967. V. 126. № 6. P. 1127—1132.

21. Карякин Ю. В., Ангелов И. И. Чистые химические реагенты. М.: ГНТИ хим. лит-ры, 1955. С. 397—398.
22. Fields R.//Biochem. J. 1971. V. 124. № 3. P. 581—590.
23. Roe H. R.//Analyt. Chem. 1951. V. 23. № 12. P. 1758—1760.
24. Кушаковский М. С. Клинические формы повреждения гемоглобина. Л.: Медицина, 1968. С. 23.

Поступила в редакцию
30.VII.1992

После доработки
11.III.1993

*N. P. Kuznetsova, R. N. Mishaeva, S. V. Koltsova,
L. R. Gudkin, L. M. Stragovich, E. G. Bolshakova*

FORMATION OF STABLE PRODUCTS IN THE INTERACTION OF GLUTARALDEHYDE WITH LOW WEIGHT REAGENTS

*Institute of Macromolecular Compounds, Russian Academy of Sciences,
S.-Petersburg*

The interaction of glutaraldehyde with a number of low weight reagents — lysine, tris(hydroxymethyl aminomethane), ammonium sulfate, sodium bisulfite, potassium borohydride, generally used to stop the reaction of covalent binding of proteins by glutaraldehyde, was studied. The stability of condensation products of these reagents with glutaraldehyde was evaluated by their resistance to hydroxylamine.