



УДК 615.31 : 547.96 : 576

КОВАЛЕНТНОЕ СВЯЗЫВАНИЕ ФОСФОЛИПИДОВ
С БЕЛКОВОЙ ГЛОБУЛОЙ В СИСТЕМЕ ОБРАЩЕННЫХ МИЦЕЛЛ*Дукьянов А. Н., Клибанов А. Л., Кабанов А. В.*,
Торчилин В. П., Левашов А. В.*, Мартишек К.****Всероссийский кардиологический научный центр АМН СССР, Москва;*** Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова;**** Институт органической химии и биохимии Чехословацкой
Академии наук, Прага*

В качестве реакционной среды для модификации белков N-оксисукцинимидным эфиром N'-сукцинилфосфатидилэтанолamina предложено использовать систему обращенных мицелл динзооктилсульфосукцината в гексане. В модельных экспериментах показано, что скорость ацилирования аминогрупп глицина в системе обращенных мицелл более чем на порядок превышает скорость гидролиза модификатора. Проведена модификация аминогрупп водорастворимых белков α -химотрипсина и IgG в системе обращенных мицелл. Показано, что модифицированные фосфолипидом белки связываются с липосомами при совместной инкубации без нарушения целостности мембраны.

Задача иммобилизации водорастворимых белков на поверхности липосом приобретает все большее значение для создания средств иммунодиагностики [1] и вакцинации [2], а также реализации идеи направленного транспорта лекарств с помощью липосом [3]. Наиболее перспективный, по нашему мнению, подход для решения этой задачи основан на искусственной гидрофобизации водорастворимых белков с помощью веществ липидной природы и последующем встраивании их в липосомы [4—7]. В качестве реакционной среды для модификации белков водонерастворимыми реагентами предложено использовать систему обращенных мицелл поверхностно-активных веществ в органических растворителях [8—10]. По сравнению с водными растворами при проведении модификации в предложенной системе значительно возрастает выход реакции; кроме того, получаются более гомогенные по степени модификации препараты белка [8—10].

Цель настоящего исследования заключалась в разработке метода модификации водорастворимых белков (α -химотрипсина и IgG) производных фосфолипида (PES-OSu) в системе обращенных мицелл и изучении взаимодействия модифицированных белков с липосомами.

Взаимодействие PES-OSu с аминогруппами глицина в системе обращенных мицелл АОТ в гексане. При проведении модификации белка с помощью PES-OSu в системе обращенных мицелл наряду с ацилированием аминогрупп белка, приводящим к ковалентному связыванию PES с белковой глобулой, может идти побочная реакция — гидролиз модифицирующего реагента. Вопрос о соотношении скорости гидролиза PES-OSu и скорости ацилирования аминогрупп является принципиальным с точки зрения использования системы обращенных мицелл в качестве реакционной среды для модификации белков. В этой связи мы исследовали кинетику взаимодействия PES-OSu с аминогруппами глицина в системе обращенных мицелл АОТ в гексане. Изучение кинетики проводилось в условиях псевдопервого порядка по PES-OSu; глицин был взят в concentra-

Принятые сокращения: АОТ — натриевая соль ди(2-этилгексилевого) эфира сульфоглутарной кислоты; АТЭЕ — этиловый эфир N-ацетил-L-тирозина; ДСС — дидецилгексилкарбодимид; НОСу — N-гидроксисукцинимид; IgG — иммуноглобулин класса G; PE — дипальмитоилфосфатидилэтаноламин; PES — N-сукцинилфосфатидилэтаноламин; PES-OSu — N-оксисукцинимидный эфир PES.

Связывание α -химотрипсина с липосомами *

Препарат α -химотрипсина	Связывание, %	Связанный белок, 10^{-4} моль/моль липид
Немодифицированный	4,9 (5,5)	2,2 (2,5)
α -Химотрипсин+PES, 1 : 5	3,8 (4,4)	1,7 (2,0)
α -Химотрипсин+PES-OSu, 1 : 2	12,2 (17,8)	5,5 (8,0)
	18,7 (51,1)	8,4 (2,3)
α -Химотрипсин+PES-OSu, 1 : 5 **	13,3 (20)	6,0 (9,0)

* Концентрация липидов 8,8 мМ, α -химотрипсина — 40 мкМ. В скобках даны значения, полученные после разрушения липосом тритоном X-100.

** Приведены результаты двух экспериментов.

ции 13 мМ, что по содержанию аминокрупп соответствует концентрации α -химотрипсина 23 мг/мл (см. «Экспериментальную часть»). Время полураспада PES-OSu ($\tau_{1/2}$) во всем диапазоне изученных условий превышает $\tau_{1/2}$ фонового гидролиза (распад PES-OSu в отсутствие глицина в системе) более чем в 10 раз. Скорость ацилирования аминокрупп, как и скорость гидролиза, не зависит от степени гидратации ($[AOT]/[H_2O]$). Обнаружено, что скорость ацилирования аминокрупп глицина в системе обращенных мицелл в значительной степени определяется pH солюбилизованного раствора: $\tau_{1/2}$ при pH 7,8 составляет около 7 мин; при увеличении pH до 8,6 оно уменьшается примерно вдвое; при pH 9,0 реакция проходит полностью менее чем за 4 мин.

Таким образом, модельные эксперименты с низкомолекулярным нуклеофилом глицином показывают, что в выбранных условиях возможно прохождение реакции ацилирования с высоким выходом.

Химическая модификация α -химотрипсина и встраивание его в липосомы. Заклученный в обращенные мицеллы AOT химотрипсин, как и глицин, реагирует с PES-OSu. Модифицированный белок при совместной инкубации с липосомами связывается с ними (табл. 1). При использовании 5-кратного мольного избытка модификатора достигнут выход встраивания от 20 до 50% белка (в различных экспериментах). Получено мольное соотношение белок/липид липосом $2,3 \cdot 10^{-3}$. Модифицированный белок сохраняет 60% каталитической активности.

Химическая модификация IgG и встраивание его в липосомы. Косвенно о модификации молекулы IgG гидрофобным остатком можно судить по изменению его растворимости в водном буферном растворе. Так, в отличие от нативного IgG, растворимость которого более 50 мг/мл, модифицированный белок (мольное соотношение белок/модификатор 1 : 1) растворился лишь в концентрации 0,6 мг/мл только при нагревании в течение 1 ч при 37° С. При соотношении белок/модификатор 1 : 2 белок не растворился и в этих условиях. Обработка IgG солюбилизованных в растворе AOT неактивированным PES не вызывает изменения свойств белка. На основании данных о растворимости препаратов после модификации можно полагать, что происходит по крайней мере частичная пришивка остатков PES к молекулам белка.

Встраивание IgG в липосомы проводили при совместной инкубации. Встроилось до 26% модифицированного белка, получено мольное соотношение белок/липид липосом $1,3 \cdot 10^{-4}$ (табл. 2).

Оценку сохранения целостности липосомной мембраны после иммобилизации белка проводили с помощью водорастворимого флуоресцентного красителя кальцеина, который включали во внутреннюю водную фазу липосом. Вытекший при совместной инкубации с белком кальцеин отделяли в ступенчатом градиенте плотности фиколла. Для всех типов препаратов липосом (как с гидрофобизованным белком, так и без него), перечисленных в табл. 2, после разделения 80% внесенного кальцеина оказывалось во фракции, содержащей липосомы. Следовательно, процедура

Связывание IgG с липосомами *

Препарат IgG	Белок, мкМ	Связывание, %	Связанный белок, 10^{-5} моль/моль липида
Немодифицированные	2,7	<4	<1,8
IgG+PES, 1:2	2,7	<4	<1,8
IgG+PES-OSu, 1:1	2,7	26	12
	1,35	23	5,3
	0,68	15,6	1,8

* Концентрация липида 5,8 мМ.

встраивания белка не вызывает нарушения целостности липосомной мембраны.

Таким образом, в работе продемонстрирована возможность использования PES-OSu для введения липидных остатков в молекулу белка в системе обращенных мицелл и показана способность модифицированных по данному способу α -химотрипсина и IgG встраиваться в липосомы.

Экспериментальная часть

В работе использовали: яичный фосфатидилхолин отечественного производства; AOT (Serva, ФРГ); дипальмитоилфосфатидилэтанолламин, холестерин, α -химотрипсин, АТФЕ (Sigma, США); N-гидроксисукцинимид, дициклогексилкарбодимид (Fluka, Швейцария); кальцеин (Koch-Light, Англия); DEAE-целлюлозу DE-52 (Whatman, Англия); глицин (Merck, ФРГ); иодоген (1,3,4,6-тетрахлор-3 α ,6 α -дифенилгликоурил; Pierce, США); сыворотку крупного рогатого скота. Растворители и компоненты буферных растворов марки х.ч.

ТСХ проводили на пластинках Kieselgel 60 F254 (Merck, ФРГ) в системе хлороформ — метанол — вода, 70:30:5. Для обнаружения пятен использовали: пары иода — неспецифический обнаружитель; реактив Цинцаде ([11], с. 143) — для обнаружения фосфолипидов; нингидрин — для обнаружения NH_2 -содержащих соединений; УФ-излучение — для обнаружения свободного HOSu.

PES-OSu получали согласно методике [12] с некоторыми изменениями: 100 мг (145 мкмоль) PE суспендировали в 10 мл хлороформа, содержащем 73 мкл триэтиламина, добавляли 73 мг (730 мкмоль) янтарного ангидрида и инкубировали 1 ч при 20° С при перемешивании (контроль — исчезновение на хроматограмме смеси нингидрин-положительного пятна). Реакционную смесь диализовали 24 ч против 4 л 50 мМ натрий-ацетатного буфера, рН 4,5, и 2 раза по 24 ч против 4 л воды. Диализ проводили при 4° С. После диализа удаляли из системы хлороформ при пониженном давлении, полученную суспензию PES лиофилизировали. Выход 86 мг. 35 мг (33 мкмоль) полученного PES растворяли в 5 мл хлороформа, добавляли 7,6 мг (66 мкмоль) HOSu и 18 мг (88 мкмоль) DCC. Инкубировали 5 ч при перемешивании, контролируя реакцию по ТСХ. Затем смесь уваривали до объема 0,3 мл, добавляли 4 мг ацетона и 50 мкл 10% раствора MgCl_2 в метаноле, выдерживали 1 ч при 0° С ([11], с. 117). Выпавший осадок отделяли центрифугированием, дважды промывали холодным ацетоном и один раз абсолютным этанолом комнатной температуры. Остаток растворителя удаляли в вакууме, полученный PES-OSu (21 мг) хранили при -20° С в атмосфере аргона. По данным ТСХ, препарат содержит не более 5% примеси PES и HOSu. Использованный в этой части работы хлороформ предварительно промывали водой, высушивали CaCl_2 , перегоняли и хранили под аргоном; триэтиламин перегоняли над нингидрином.

IgG выделяли из сыворотки крупного рогатого скота по стандартной методике [13]. Использовали фракцию, элюируемую стартовым буфером (10 мМ натрий-фосфатный, рН 7,5) с DEAE-целлюлозы. Чистоту препарата белка контролировали с помощью электрофореза в ПААГ в присутствии додецилсульфата натрия [14], полученный препарат содержал 90% IgG от суммарного белка. IgG иодировали Na^{125}I в присутствии иодогена по стандартной методике [15]; препараты ^{125}I -IgG использовали не более чем через 3 сут после мечення.

Измерение скорости гидролиза (аммонолиза) PES-OSu в системе обращенных мицелл. В 2 мл 0,1 М АОТ в гексане солиобилизовали 12,5 мМ боратный буфер (рН 7,8—9,0) или 13 мМ раствор глицина в 12,5 мМ боратном буфере. К полученному прозрачному мицеллярному раствору добавляли 5 мкл 22 мМ раствора PES-OSu в хлороформе. За образованием в системе свободного HOSu следили спектрофотометрически по увеличению оптического поглощения при 260 нм. Измерения проводили для степеней гидратации АОТ 20 и 80. Использовали спектрофотометр УО-2000 (Yanaco, Япония); $\tau_{1/2}$ определяли по методу Гуггенгейма [16].

Химическая модификация белков. В 1 мл 0,1 М раствора ДОТ в гексане солиubilizировали 36 мкл раствора α -химотрипсина (2 мМ в 12,5 мМ боратном буфере, pH 8,0) или 125 мкл раствора IgG (0,33 мМ в том же буфере), прозрачный мицеллярный раствор инкубировали 1 ч. Затем добавляли при интенсивном перемешивании 2% раствор PES-OSu в хлороформе до требуемого мольного избытка (см. табл. 1 и 2) и инкубировали 1,5 ч. В контрольных экспериментах вместо PES-OSu в реакционную систему вводили раствор PES. Из реакционной среды белок осаждали добавлением 5-кратного объема ацетона, охлажденного до -20°C . Осадок отделяли центрифугированием и еще 3 раза промывали холодным ацетоном, из препаратов α -химотрипсина остаток ацетона удаляли при пониженном давлении.

Активность фермента определяли потенциометрически с помощью pH-стада Radiometer RTS-822 (Дания) по начальной скорости гидролиза АТФЕ в 0,1 М КСl, pH 7,5 [17].

Препараты IgG пересаждали из 0,5 М раствора NaCl в 20 мМ фосфатном буфере, pH 8,0, насыщенным раствором сульфата аммония. (При испарении остатка ацетона IgG теряют свою растворимость.)

Приготовление липосом и встраивание в них белков. Липосомы (концентрация липида 17 мМ) из смеси яичного фосфатидилхолина и холестерина (молярное соотношение 1 : 1) получали методом обращения фаз [18], в водную среду добавляли кальций в концентрации 10 мМ. Кальций, не включившийся во внутренний объем липосом, удаляли диализом против 1 л физиологического раствора, содержащего 10 мМ фосфат натрия, pH 7,5 (2 раза; 4°C , 1 сут). Для встраивания белков в липосомы проводили их совместную инкубацию в концентрациях, указанных в табл. 1 и 2 (для α -химотрипсина 14 ч при 4°C ; для IgG 30 мин при 37°C). Липосомы отделяли от несвязавшегося белка и вытекшего из них в процессе встраивания белка кальция в ступенчатом градиенте фикоλλα-70 [19]. Количество связанного с липосомами α -химотрипсина определяли по его каталитической активности (см. выше) в системе липосом и после их разрушения тритоном X-100 (конечная концентрация 1%). Количество IgG определяли, измеряя радиоактивность связанного с ним ^{125}I [15]. Относительное содержание кальция определяли по интенсивности его флуоресценции. Измерения проводили на спектрофлуориметре F-3000 (Hitachi, Япония). Длина волны возбуждения 490 нм, испускания—520 нм.

ЛИТЕРАТУРА

1. Umeda M., Ishimori Y., Yoshikawa K., Takada M., Yasuda T. // J. Immunol. Methods. 1986. V. 95. № 1. P. 15—21.
2. Snyder S. L., Vannier W. E. // Biochim. et biophys. acta. 1984. V. 772. № 3. P. 288—294.
3. Torchilin V. P., Klibanov A. L. // Enzyme and Microb. Technol. 1981. V. 3. № 4. P. 297—303.
4. Sinha D., Karush F. // Biochim. et biophys. acta. 1982. V. 684. № 2. P. 187—194.
5. Huang A., Huang L., Kennell S. J. // J. Biol. Chem. 1980. V. 254. № 16. P. 8015—8018.
6. Torchilin V. P., Klibanov A. L., Smirnov V. N. // FEBS Lett. 1982. V. 138. № 1. P. 117—120.
7. Wessig V., Lasch J., Klibanov A. L., Torchilin V. P. // FEBS Lett. 1986. V. 202. № 1. P. 86—90.
8. Левашов А. В., Кабанов А. В., Хмельницкий Р. А., Березин И. В., Мартишек К. // Докл. АН СССР. 1984. Т. 278. № 1. С. 246—248.
9. Кабанов А. В., Паметкин С. Н., Левашов А. В., Мартишек К. // Биол. мембраны. 1985. Т. 2. № 10. С. 985—995.
10. Кабанов А. В., Клибанов А. Л., Торчилин В. П., Мартишек К., Левашов А. В. // Биоорг. химия. 1987. Т. 13. № 10. С. 1321—1324.
11. Кейтс М. Техника липидологии. М.: Мир, 1975.
12. Kinsky S. C., Loader J. E., Benson A. L. // J. Immunol. Methods. 1983. V. 65. № 3. P. 295—306.
13. Jones V. E. // Immunology. 1969. V. 16. № 3. P. 589—592.
14. Laemmli U. K. // Nature. 1970. V. 227. № 5259. P. 680—685.
15. Fraker P. J., Speck J. S. // Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1978. V. 80. № 4. P. 849—857.
16. Березин И. В., Клевсов А. А. Курс практической и ферментативной кинетики. М.: Изд-во МГУ, 1976. С. 17—23.
17. Torchilin V. P., Goldmacher V. S., Smirnov V. N. // Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1978. V. 85. № 3. P. 983—990.
18. Szoka F., Papahadjopoulos D. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1978. V. 75. № 9. P. 4194—4198.
19. Heath T. D., Macher B. A., Papahadjopoulos D. // Biochim. et biophys. acta. 1981. № 1. P. 66—81.

Поступила в редакцию

4.IX.1987

После доработки

30.XI.1987

PHOSPHOLIPIDS COVALENT BINDING WITH PROTEINS
IN SYSTEM OF REVERSE MICELLES

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

*Cardiology Research Centre, Academy of Medical Sciences
of the USSR, Moscow;*

* *M. V. Lomonosov Moscow State University, Department of Chemistry;*

** *Institute of Organic Chemistry and Biochemistry,
Czechoslovak Academy of Sciences, Prague*

Acylation of protein amino groups by N'-hydroxysuccinimide ester of N-succinyl phosphatidylethanolamine in reverse micelles of diisooctylsulphosuccinate in hexane was studied. The experiment in a model system (glycine solution in reverse micelles) showed rate of acylation of amino groups to be by over an order of magnitude higher than rate of hydrolysis. Water-soluble proteins (α -chymotrypsin and IgG), modified by means of this method, can effectively bind liposomes without disturbing the integrity of liposomal membrane.