



УДК 577.156

ВОССТАНОВЛЕНИЕ И РЕОКИСЛЕНИЕ ДИСУЛЬФИДНЫХ СВЯЗЕЙ В α -ХИМОТРИПСИНЕ, КОВАЛЕНТНО СВЯЗАННОМ С СМ-ЦЕЛЛЮЛОЗОЙ **Бозлов Л. В., Суровцев В. И., Антонов В. И.*

*Институт биоорганической химии им. М. М. Шелякина
Академии наук СССР, Москва,
Институт биохимии и физиологии микроорганизмов
Академии наук СССР, Луцино*

Восстановлением дисульфидных связей в α -химотрипсине, ковалентно связанном с СМ-целлюлозой, с последующими отмывкой и реокислением получены препараты, обладающие 4%-ной исходной активностью и содержащие 60% исходного белка. С-концевой анализ показал, что все три цепи α -химотрипсина присутствуют в реокисленном препарате. Сделан вывод, что в так называемой стабильной фракции иммобилизованного фермента имеется как минимум двухточечное ковалентное связывание с носителем.

При иммобилизации отдельные свойства исходного фермента часто существенно меняются. Причины такого изменения заключаются либо в создании нового микроокружения активного центра, что может приводить, например, к изменению оптимума рН катализа, либо в реализации различных сильных и слабых взаимодействий матрицы носителя с белком, что выражается в изменении конформационной подвижности макромолекулы фермента и обнаруживается по изменению устойчивости к денатурирующим воздействиям тепла и растворителя. Ранее [1–3] при исследовании термоденатурации α -химотрипсина (КФ 3.4.4.5), ковалентно связанного с СМ-целлюлозой, мы установили, что повышенная стабильность иммобилизованного фермента к действию температуры по сравнению с ферментом в растворе обусловлена наличием ковалентных, ионных и водородных связей белка с матрицей носителя. Полученные нами препараты СМС-химотрипсина состояли из двух равных по количеству и существенно отличающихся по скоростям термоденатурации фракций (стабильной и лабильной). Обе эти фракции были более устойчивы к действию температуры, чем α -химотрипсин в растворе. Разрыв ионных и водородных связей между белком и СМ-целлюлозой снижал устойчивость обеих фракций, не изменяя их количественного соотношения. Последнее обстоятельство позволило высказать предположение о различном числе ковалентных связей белка с носителем для этих двух фракций.

Поскольку α -химотрипсин является трехцепочечным белком с дисульфидными мостиками между и внутри цепей, восстановление всех дисульфидных связей и анализ количества остающегося на носителе фиксирован-

* Сокращения: СМС-химотрипсин – α -химотрипсин, ковалентно связанный с карбоксиметилцеллюлозой. ПХМБ – *n*-хлормеркурибензоат натрия.

ного белка могут дать информацию о среднем числе ковалентных связей между молекулой фермента и носителем. Кроме того, регенерация активности при реокислении восстановленного многоцепочечного белка сама по себе должна свидетельствовать о многоточечном ковалентном связывании с матрицей. Известны лишь факты регенерации активности при реокислении восстановленных иммобилизованных одноцепочечных белков: рибонуклеазы, трипсина [4] и химоотрипсина [5], поэтому определенный интерес представляло изучение возможности реокисления иммобилизованного многоцепочечного белка.

α -Химоотрипсин содержит 5 дисульфидных связей, две из которых соединяют попарно цепи *A* и *B*, а также *B* и *C* [6]. Цепь *A* имеет *M* 1250 и содержит одну экспонированную в растворитель аминокислотную группу цистеина-1 [7], которая может ацилироваться карбоксильной группой СМ-целлюлозы. Цепь *B* (*M* 14 000) содержит 8 доступных ϵ -аминогрупп остатков лизина (*N*-концевая аминокислота изолейцина-16 находится внутри молекулы) [7]. Цепь *C* имеет *M* 10 000 и содержит 7 доступных аминокислотных групп, 6 из которых принадлежат остаткам лизина и одна — *N*-концевому аланину-149 [7]. Учитывая эти факты и полагая, что все 16 доступных аминокислотных групп с одинаковой вероятностью могут участвовать в образовании ковалентных связей с матрицей, можем рассчитать, какая часть белка будет удерживаться носителем, а какая стмываться после восстановления дисульфидных связей в зависимости от среднего числа связей на молекулу. Расчет показывает, что при наличии одной связи на молекулу фермента после отмывания продуктов восстановления, не связанных с матрицей, должно удалиться ~55% веса исходного иммобилизованного белка, а при наличии двух связей — только ~30% белка.

Исследования проводили на препарате СМС-химоотрипсина, содержащем по данным аминокислотного анализа 112 мг фермента на 1 г препарата. Дисульфидные мостики в СМС-химоотрипсине восстанавливались β -меркаптоэтанолом при pH 8,3 в присутствии 8 М мочевины. Восстановленный препарат тщательно промыли раствором 4 М NaCl для удаления фрагментов молекулы белка, не связанных с матрицей. По данным аминокислотного анализа полученный препарат восстановленного СМС-химоотрипсина содержал 67,5 мг белка на 1 г препарата. По данным титрования SH-групп ПХМБ все дисульфидные связи были восстановлены. Таким образом, при восстановлении в препарате СМС-химоотрипсина отмывалось 40% белка. Такая картина должна наблюдаться в том случае, когда примерно половина молекул белка в препарате содержит одну связь с матрицей, а половина молекул — две или большее число связей. Если это обстоятельство сопоставить с тем фактом, что СМС-химоотрипсин состоит наполовину из лабильной и наполовину из стабильной в отношении термоденатурации фракций [1], то напрашивается естественное объяснение, что лабильная фракция — это фракция молекул белка, укрепленных на носителе одной связью.

При наличии двух и более связей с матрицей в стабильной фракции СМС-химоотрипсина происходит, по-видимому, закрепление на носителе цепей *B* и *C* молекулы фермента. Как уже было нами рассмотрено в работе [8], взаимная фиксация этих цепей приводит к сохранению субстрат-связывающей способности фермента при высоких значениях pH. Некоторое повышение жесткости пространственной структуры, происходящее при этом, вероятно, приводит также и к стабилизации белка к денатурирующим воздействиям повышенной температуры.

Восстановленный СМС-химоотрипсин был полностью лишен каталитической активности. Окисление восстановленного препарата кислородом воздуха при pH 8,3 привело к регенерации 4% исходной активности, или 6,6% с учетом удаления 40% белка после восстановления. То, что регенерация активности происходила в результате образования необходимых дисульфидных связей при реконструировании активной структуры, подтвержда-

Активность препаратов СМС-химотрипсина после различных видов обработки

Вид обработки	Активность препаратов, % от		
	исходной	исходной с учетом отмывки 40% белка	предыдущего цикла обработки
1-е восстановление	0	0	—
1-е окисление	4	6,6	—
2-е восстановление	0	0	0
2-е окисление	2,4	4	60
1-е окисление после обработки ПХМБ	0	0	—
Обработка 8М мочевиной с последующей регенерацией активности	6,6	—	—

лось отсутствием активности в аналогичным образом обработанном образце, в котором сульфгидрильные группы были предварительно блокированы с помощью ПХМБ (см. таблицу).

Следует отметить, что после денатурации СМС-химотрипсина в 8 М мочевины без восстановления удалось реактивировать (при pH 8,3) только 6,6% фермента. Поэтому низкий процент регенерации активности после реокисления связан, вероятно, не с трудностями правильной рекомбинации цепей при образовании дисульфидных мостиков, а с той реальной долей молекул фермента на носителе, которая способна обратимо денатурировать в растворах 8 М мочевины. В пользу этого свидетельствуют также данные по повторному восстановлению и окислению препарата. При втором цикле операций регенерация активности достигает 60% активности после однократного восстановления и окисления.

Такие же результаты были получены Эпштейном и Анфисеом [4] на одноцепочечном ферменте — СМС-трипсине: первый цикл дал 4% активности, а второй — 60% активности первого цикла.

Закрепление фермента на матрице с фиксацией всех его цепей, следовательно, привело к ситуации одноцепочечного белка. Возникает, однако, вопрос, являются ли молекулы фермента с регенерированной активностью трехцепочечными молекулами или же они могут содержать лишь две цепи — *B* и *C*, в составе которых находятся аминокислотные остатки, формирующие активный центр фермента. Недавно [9] было показано, что для сохранения активности δ -химотрипсина цепь *A*, по-видимому, не нужна. Кроме того, цепь *A* содержит только одну доступную свободную аминогруппу, и вероятность фиксации этой цепи на матрице соответственно в 8 и в 7 раз ниже, чем для цепей *B* и *C*. В связи с этим мы решили путем С-концевого анализа с помощью карбоксипептидазы *A* установить наличие иммобилизованной цепи *A* в окисленном после восстановления и отмывания препарате СМС-химотрипсина. В условиях, при которых карбоксипептидаза *A* отщепляет С-концевой лейцин цепи *A* и С-концевой тирозин цепи *B* (аспарагин цепи *C* при этом не отщепляется [10]), были обнаружены в гидролизате обе эти (и только эти) аминокислоты.

Полученные данные не противоречат возможности одновременного закрепления в одной молекуле фермента всех трех полипептидных цепей, что достижимо лишь при трехточечном, как минимум, ковалентном связывании фермента СМ-целлюлозой.

Поэтому можно считать, что в препарате СМС-химотрипсина примерно половина молекул связана с матрицей одной связью, а остальные молекулы образуют с носителем две, три или больше связей.

Экспериментальная часть

СМС-химотрипсин получали, как описано в работе [1]. Восстановление СМС-химотрипсина проводили по методу [4]. К 150 мг СМС-химотрипсина добавляли раствор 1,44 г мочевины в 1,8 мл *трис*-буфера (рН 8,3) и 0,3 мл β -меркаптоэтанола. Смесь перемешивали в закрытом сосуде 20 ч, СМС-химотрипсин отмывали водой от β -меркаптоэтанола, промывали 30 мл 4 М NaCl и водой и часть лиофилизovali, а часть подвергали окислению.

Окисление проводили путем перемешивания 70 мг восстановленного СМС-химотрипсина в 20 мл *трис*-буфера (рН 8,3) в течение 2 суток. Препарат лиофилизovali.

Аминокислотный анализ кислотных гидролизатов (5,7 М HCl, 105°, 24 ч) препаратов СМС-химотрипсина проводили на аминокислотном анализаторе ВС-200.

Активность препаратов определяли по скорости гидролиза этилового эфира *N*-апетил-*L*-тирозина на рН-стате.

Число SH-групп в восстановленном СМС-химотрипсине определяли спектрофотометрическим титрованием ЦХМБ [4].

С-концевые аминокислоты в реокисленном препарате СМС-химотрипсина определяли с помощью карбоксипептидазы А (фирмы «Calbiochem», США) с последующим дансильрованием гидролизата и хроматографическим разделением ДНС-аминокислот на пластинках с тонким слоем силикагеля фирмы «Eastmann» (США) в системе бензол — пиридин — уксусная кислота (40 : 10 : 1).

ЛИТЕРАТУРА

1. Суворцев В. И., Козлов Л. В., Антонов В. К. (1970) Докл. АН СССР, 195, 1463—1465.
2. Суворцев В. И., Козлов Л. В., Антонов В. К. (1971) Биохимия, 36, 199—204.
3. Суворцев В. И., Козлов Л. В., Антонов В. К. (1972) Биохимия, 37, 1139—1143.
4. Epstein C. J., Anfinsen C. B. (1962) J. Biol. Chem., 237, 2175—2179.
5. Brown J. C., Swaingood H. E., Horton H. R. (1972) Biochem. Biophys. Res. Commun., 48, 1068—1073.
6. Brown J. R., Hartley B. S. (1966) Biochem. J., 101, 214—228.
7. Birkoft J. J., Blow D. M. (1972) J. Mol. Biol., 68, 187—240.
8. Янушаускайте В. Б., Козлов Л. В., Антонов В. К. (1974) Биохимия, 39, 446—453.
9. Grey S. M., Nurse G. R., Visser L. (1973) Biochem. Biophys. Res. Commun., 52, 687—695.
10. Gladner J. A., Neurath H. (1953) J. Biol. Chem., 205, 345—361.

Поступила в редакцию
26.VII.1974

REDUCTION AND REOXIDATION OF DISULFIDE BONDS IN α -CHYMOTRYPSIN COVALENTLY BOUND TO CM-CELLULOSE

L. V. KOZLOV, V. I. SUROVTSEV, V. K. ANTONOV

*M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry,
Academy of Sciences of the USSR, Moscow*

Reduction of disulfide bridges in α -chymotrypsin covalently bound to CM-cellulose, subsequent washing and reoxidation gave the preparation possessing 4 per cent of original activity and 60 per cent of protein content. End-group analysis shows that all three chains of α -chymotrypsin are present in the reoxidated material. It was concluded that at least two — point attachment exists in the so-called «stable» fraction of immobilized enzyme.