



УДК 577.150.2;577.156.3

АКТИВАЦИЯ ТРИПСИНОГЕНА С ПОМОЩЬЮ
СВЕТОЧУВСТВИТЕЛЬНОГО ЦИС-ЦИННАМОИЛТРИПСИНА *Березин И. В., Айвина Р. Б., Бронников Г. Е.,
Казанская Н. Ф.

Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова

Предложено светочувствительное стабильное производное Тр — *цис*-ЦТР, изомеризация которого под действием света (λ 313 нм) — приводит к образованию лабильного быстро гидролизующегося *транс*-ЦТР. Высвобождающийся при гидролизе последнего Тр инициирует реакцию автоактивации Тг. Таким образом, импульс света вызывает автокаталитическую реакцию. Измерены константы скоростей реакций деацилирования *цис*- и *транс*-ЦТР (соответственно $2,6 \cdot 10^{-5}$ и $1,2 \cdot 10^{-2}$ с $^{-1}$, рН 8,0, 25°). 500-кратная разница в константах позволяет получить значительный интервал (60 мин) в периодах индукции активации добавленного природного предшественника Тр — Тг — в растворах, подвергнутых и не подвергнутых действию света.

Ферментативные системы с сопряженной реакцией автоактивации, способные безгранично усиливать первичный световой сигнал, должны содержать высокочувствительные к свету источники катализатора — фермента. Основой таких систем являются производные фермента, инактивированные обратимо таким образом, чтобы их реактивация вызывалась действием света. Так, например, может быть использовано неактивное производное ацилированного по активному центру фермента, имеющее различную способность к гидролизу ацильной группы в *цис*- и *транс*-форме. Под действием света происходит *цис-транс*-изомеризация ацильной части, и образовавшееся лабильное производное ацилфермента гидролизуется с высвобождением фермента, вступающего далее в реакцию автоактивации.

В предыдущих работах [1—3] было показано, что *транс*-изомер, (N,N,N-триметиламино)-циннамоилтрипсина, являясь стабильным соединением в условиях оптимума рН каталитической активности фермента (см. таблицу), при действии УФ-света превращается в *цис*-изомер, который гидролизуется с образованием свободного активного Тр в 10 раз быстрее *транс*-изомера. В присутствии Тг образовавшиеся под действием

* Сокращения: Тр — трипсин; Тг — трипсеноген; *транс*-Ци — *транс*-циннамоилтрипсиназол; *цис*- и *транс*-ТМАЦ-Тр — *цис* и *транс*-(N, N, N-триметиламино)-циннамоилтрипсин; *цис*- и *транс*-ЦТР — *цис*- и *транс*-циннамоилтрипсин.

света молекулы фермента вызывают автокаталитическое превращение зимогена, приводя к накоплению катализатора в системе. Разница между периодами индукции автокаталитической активации Тг в случае облученного и необлученного растворов составляет 25—30 мин в условиях опыта [1, 2].

В данной работе для эффективного фотоиницирования автоактивации Тг предложен другой светочувствительный ацилтрипси — *цис*-ЦТр. По сравнению с вышеописанным случаем в системе, содержащей *цис*-ЦТр, наблюдается значительная разница между периодами индукции автоактивации Тг в темноте и после освещения, поскольку скорости гидролиза лабильного и стабильного стереоизомеров ацилфермента различаются в 500 раз.

Действие УФ-света на *транс*-ЦТр, так же как и в случае *транс*-ТМАЦ-Тр [2], вызывает спектральные изменения, характерные для *транс*→*цис*-изомеризации производных β-арилакриловых кислот [4, 5]. На рис. 1 представлены кинетические кривые деацилирования необлученного (кривая 1) и облученного (кривая 2) УФ-светом (λ 313 нм) раствора *транс*-ЦТр. Облучение раствора ацилфермента до образования фотостационарной смеси изомеров [2] проводили при pH 3,0, когда оба стереоизомера ЦТр стабильны. Величина конечного уменьшения оптической плотности для кривой 1 ($\Delta D_{\text{транс}}^0$) соответствует процентному содержанию *транс*-ЦТр в навеске. Для кривой 2 оптическая плотность, соответствующая началу реакции, ниже, чем для кривой 1, вследствие того, что коэффициент

экстинкции *цис*-изомера ацилфермента меньше, чем *транс*-изомера. Как видно из рис. 1, после облучения УФ-светом раствора *транс*-ЦТр (кривая 2) концентрация ацилфермента, способного быстро деацилировать, уменьшается (падения оптической плотности до конечного значения не происходит). Константы скорости деацилирования, вычисленные из кинетических кривых 1 и 2, одинаковы и равны $1,2 \times 10^{-2} \text{ с}^{-1}$ (см. таблицу), что согласуется с данными работы [6] для константы скорости деацилирования *транс*-ЦТр. Следовательно, образующийся при изомеризации *транс*-изомера *цис*-ЦТр имеет константу скорости деацилирования на несколько порядков ниже, чем исходный *транс*-изомер. Данные рис. 1 позволяют также вычислить содержание *транс*-ЦТр в фотостационарной смеси изомеров из соотношения отрезков $\Delta D'_{\text{транс}}$ и $\Delta D_{\text{транс}}^0$.

При облучении светом (λ 313 нм) фотостационарная концентрация *цис*-ЦТр достигала 60—65%.

Светочувствительный *цис*-ЦТр в отличие от *транс*-изомера не может быть получен прямой реакцией *цис*-ЦИ с Тр, так как константа скорости этой реакции слишком низка. Поэтому *цис*-ЦТр синтезировали путем облучения *транс*-ЦТр УФ-светом (λ 313 нм) до образования фотостационарной смеси изомеров, затем проводили гидролиз *транс*-изомера ацилфермента до свободного Тр и инактивацию последнего. В условиях опыта *цис*-измер ацилфермента не гидролизует.

Величины констант скоростей деацилирования *цис*- и *транс*-ЦТр приведены в таблице. В этой же таблице для сравнения даны константы скоростей деацилирования *цис*- и *транс*-изомеров ТМАЦ-Тр, взятые из работы [2]. Как видно из данных таблицы, поведение *цис*- и *транс*-изомеров

Константы скоростей деацилирования *цис*- и *транс*-изомеров ацилтрипсинов — производных коричной кислоты
0,05 М буфер *трис*-HCl, pH 8,0;
0,05 М CaCl₂; 20°

Ацилтрипсин	Изомер	$k_3, \text{с}^{-1}$
ЦТр	<i>цис</i>	$2,6 \cdot 10^{-5} *$
	<i>транс</i>	$1,2 \cdot 10^{-2}$
ТМАЦ-Тр	<i>цис</i>	$6,7 \cdot 10^{-4}$
	<i>транс</i>	$6,3 \cdot 10^{-5} *$

* В присутствии 2 мМ бензамидина.

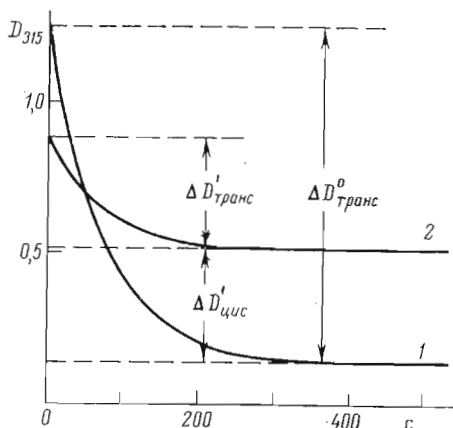


Рис. 1. Кинетические кривые деактивирования необлученного (1) и облученного (2) УФ-светом (313 нм) раствора *транс*-1[Тр]. Условия: $[транс-1[Тр]]_0 = 4,5$ мг/мл; 0,05 М буфер трис-НСl, pH 8,0; 0,05 М $CaCl_2$; 20°

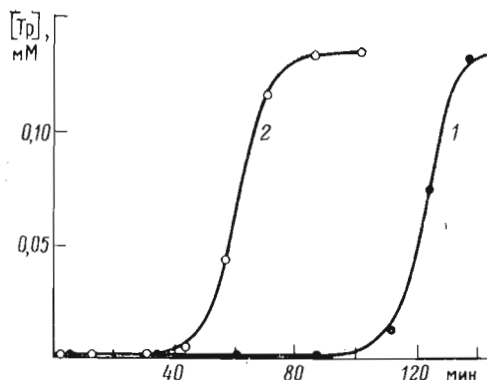
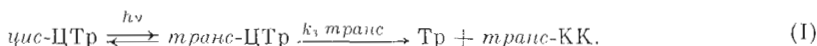


Рис. 2. Фотоиницирование автоактивации Тр с помощью светочувствительного *цис*-ЦТр; активация зимогена в присутствии необлученного (1) и облученного в течение 4 мин (2) раствора *цис*-ЦТр. Условия: $[Тр]_0 = 5$ мг/мл; $[цис-ЦТр] = 0,75$ мг/мл; 0,05 М буфер трис-НСl pH 8,0; 0,05 М $CaCl_2$; 20°

ацилтрипсинов — производных коричной кислоты, содержащей и не содержащей положительно заряженную триметиламиногруппу в *пара*-положении, различно. Если в случае ТМАЦ-Тр стабильным к гидролизу является *транс*-изомер, то в случае ЦТр — *цис*-изомер. С другой стороны, различие в скоростях гидролиза стабильного и лабильного изомеров в случае ТМАЦ-Тр равно 10, а в случае ЦТр — 500. Таким образом, *цис*-ЦТр является более эффективным светочувствительным ацилтрипсином, чем *транс*-ТМАЦ-Тр.

При действии УФ-света на *цис*-ЦТр происходит образование *транс*-изомера, который быстро гидролизуется (период полураспада ~55 с) с образованием свободного активного фермента и коричной кислоты:



Затем инициированные светом молекулы фермента автокаталитически размножаются за счет сопряженной «темновой» реакции автоактивации Тр:

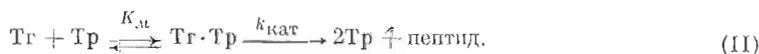


Рис. 2 иллюстрирует кинетику автокаталитического накопления Тр в присутствии необлученного (кривая 1) и облученного (кривая 2) растворов *цис*-ЦТр. Автоактивация Тр в освещенном образце полностью заканчивается за времена, когда в неэкспонированном растворе нет изменения концентрации катализатора. Разница между периодами индукции автокаталитической реакции облученного и необлученного образцов составляет 60 мин, что в 2–2,5 раза больше, чем в ранее описанной светочувствительной системе [1–3]. Таким образом, применение *цис*-ЦТр в качестве светочувствительного ацилтрипсина увеличивает чувствительность автокаталитической системы к первичному сигналу.

Экспериментальная часть

транс-ЦИ синтезировали по методу [7] ацилированием имндазола циннамоилхлоридом в бензольном растворе; Т. пл. 134°. Все остальные используемые реагенты описаны ранее [1, 2].

транс-ЦТр получали ацилированием активного центра фермента *транс*-ЦИ при pH 6,0. За реакцией ацилирования наблюдали при 335 нм по скорости исчезновения поглощения *транс*-ЦИ. Коэффициент экстинкции *транс*-ЦИ при данной длине волны равен $9,36 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}\text{см}^{-1}$ [7]. Реакцию ацилирования Тр (~20 мкМ) избытком субстрата (~0,15 мМ) проводили в 200 мл 0,025 М раствора CaCl_2 , содержащего 10 об.% ацетонитрила, в ячейке pH-стата при pH 6,0 и 20°. Через 30 мин реакционную смесь подкисляли до pH 3,0. Для выделения *транс*-ЦТр реакционную смесь концентрировали путем лиофилизации, отделяли низкомолекулярные продукты реакции методом гель-фильтрации при pH 3,0 и 0° и раствор лиофилизовали. Полученный препарат содержал 40% *транс*-ЦТр, 5–10% активного фермента и инертные белки.

Для получения *цис*-ЦТр подкисленный до pH 3,0 раствор *транс*-ацилфермента перед концентрированием облучали УФ-светом (λ 313 нм) в цилиндрическом кварцевом сосуде при постоянном перемешивании в течение 4 ч. После концентрирования раствора путем лиофилизации до 20–30 мл pH реакционной смеси повышали до 8,0 для того, чтобы неизомеризовавшийся нестабильный *транс*-ЦТр гидролизровался. *цис*-ЦТр в этих условиях стабилен. Освободившийся Тр обрабатывали 200-кратным избытком диизопропилфторфосфата в течение 1 ч и затем 20-кратным по отношению к остаточной примеси фермента избытком *n*-нитрофенилового эфира *n'*-гуанидинбензойной кислоты в течение 20 мин при pH 8,0. После подкисления раствора до pH 3,0 низкомолекулярные соединения отделяли гель-фильтрацией на сефадексе G-25, и пик, содержащий белок, лиофилизовали. Полученный препарат содержал 10% *цис*-ЦТр (определяли по полному гидролизу ацилфермента) и 0,7% активного фермента.

Ферментативную активность Тр определяли по стандартной методике [8] путем гидролиза этилового эфира *N*- α -бензоил-*L*-аргинина на pH-стате марки «Radiometer» (Дания). За кинетикой деацилирования *цис*-ЦТр следили по скорости появления свободного Тр при инкубации раствора ацилфермента в течение двух суток в темноте при pH 8,0 и в присутствии 2 мМ бензамидина (для предотвращения автолиза фермента). За кинетикой деацилирования *транс*-ЦТр следили спектрофотометрически по уменьшению поглощения ацилфермента при 315 нм. Разностный коэффициент экстинкции *транс*-ЦТр относительно Тр при этой длине волны равен $12\,100 \text{ M}^{-1}\text{см}^{-1}$ [6]. Фотохимические измерения проводили по методикам, описанным в работах [1, 2, 4, 5].

ЛИТЕРАТУРА

1. Березин И. В., Казанская Н. Ф., Айсина Р. Б. (1972) Докл. АН СССР, 207, 1383–1386.
2. Айсина Р. Б., Васильева Т. Е., Казанская Н. Ф., Тиходеева А. С., Березин И. В. (1973) Биохимия, 38, 601–607.
3. Казанская Н. Ф., Айсина Р. Б., Березин И. В., Москва, август (1972). Тезисы доклада на 4-м Международном биофизическом конгрессе, секция Е Iа.
4. Березин И. В., Варфоломеев С. Д., Мартинек К. (1970) Докл. АН СССР, 193, 932–935.
5. Martinek K., Varfolomeyev S. D., Berezin I. V. (1971) Eur. J. Biochem., 19, 242–249.
6. Bender M. L., Kaiser E. T., J. Amer. Chem. Soc. (1962) 84, 2556–2561.
7. Schonbaum G. R., Zerner B., Bender M. L. (1961) J. Biol. Chem., 236, 2930–2935.
8. Schwert G. W., Takenaka Y. (1955) Biochim. et biophys. acta, 16, 570–575.

Поступила в редакцию
23.IX.1975

ACTIVATION OF TRYPSINOGEN WITH LIGHT-SENSITIVE
CIS-CINNAMOYLTRYPSIN

BEREZIN I. V., AISINA R. B., BRONNIKOV G. E., KAZANSKAYA N. F.

M. V. Lomonosov State University, Moscow

A new light-sensitive stable acyl-trypsin, *cis*-cinnamoyltrypsin has been proposed. On light exposure ($\lambda=313$ nm) it is isomerized into *trans*-isomer. The ratio of rate constants of the hydrolysis of these isomers is equal to 500 ($2.6 \cdot 10^{-5}$ s $^{-1}$ for *cis*-isomer and $1.2 \cdot 10^{-2}$ s $^{-1}$ for *trans*-isomer, pH 8.0, 25° C). Such difference provides a large interval between the induction period of autoactivation of trypsinogen in exposed and unexposed solutions.
