



УДК 577.156

**ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ТРИПСИНА,
КОВАЛЕНТНО СВЯЗАННОГО С ВОДОРАСТВОРИМЫМИ
ПОЛИКАРБОНОВЫМИ КИСЛОТАМИ***Иванова Г. П., Миргородская О. А., Панарин Е. Ф.,
Москвичев Б. В.**Всесоюзный научно-исследовательский технологический институт антибиотиков
и ферментов медицинского назначения, Ленинград*

Сопоставлен характер инактивации нативного трипсина с инактивацией трипсина, присоединенного с помощью водорастворимого карбодимида к сополимеру винилпирролидона и кротоновой кислоты. Показано, что химическая модификация фермента приводит к снижению скорости автолитической денатурации. Термоденатурация модифицированного трипсина, не осложненная автолизом, протекает с большей скоростью, чем термоденатурация нативного трипсина. Для модифицированного фермента по сравнению с нативным отмечается сдвиг оптимума рН в щелочную область, что, по-видимому, связано с кажущимся изменением рК имидазольной группы трипсина, участвующей в стадии дезацилирования. Показано, что модификация трипсина приводит к понижению средства фермента к своему ингибитору и ингибиторам сыворотки крови.

Иммобилизация ферментов на нерастворимых полимерных и минеральных матрицах широко используется при получении различных биокатализаторов, предназначенных для решения аналитических и технологических задач [1]. Для этих же целей могут применяться ферменты, связанные с водорастворимыми линейными полимерами, которые, по-видимому, будут характеризоваться гораздо меньшим диффузионным сопротивлением, чем нерастворимые системы. Водорастворимые полимерные производные ферментов могут найти широкое применение непосредственно в медицинской практике в качестве лекарственных препаратов, в которых сочетаются преимущества, присущие обычным иммобилизованным ферментам, как, например, повышенная стабильность, с возможностью введения их в организм в виде гомогенных растворов.

Цель настоящей работы — изучение физико-химических свойств водорастворимого полимерного производного трипсина, полученного при химическом связывании фермента с сополимером винилпирролидона и кротоновой кислоты (ВПК) с помощью водорастворимого карбодимида (*n*-толуолсульфонат-N-циклогексил-N'-β-(4-метилморфолиний)этилкарбодимид).

Химическое взаимодействие трипсина с поликарбоневой кислотой в присутствии карбодимида осуществлено на основе реакции конденсации между карбоксильными группами полимера и аминогруппами фермента — по-видимому, между ε-аминогруппами лизина и концевыми α-аминогруппами полипептидной цепи белка. Такое взаимодействие сопровождается инактивацией фермента (рис. 1). Наиболее сильное падение

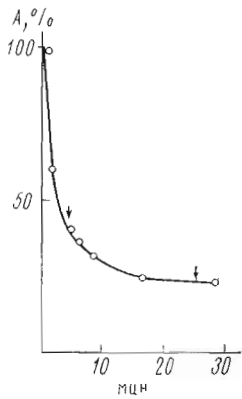


Рис. 1

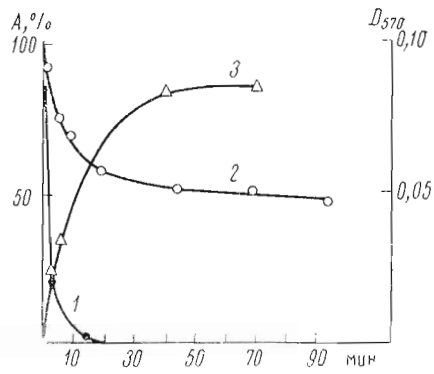


Рис. 2

Рис. 1. Остаточная активность трипсина (A , %) в процессе его иммобилизации на сополимере типа ВПК. Стрелками на рисунке указаны моменты отбора проб реакционной смеси для анализа компонентного состава методом тонкослойной гелевой хроматографии

Рис. 2. Инактивация нативного (1) и модифицированного (2) трипсина, измеренная по изменению казеинолитической активности (A , %) и по накоплению α -аминового азота (D_{570}) (3) при температуре 55° , рН 7,85

активности наблюдается в первые минуты связывания. Результаты изучения хроматографической подвижности компонентов реакционной смеси показывают, что уже через 4 мин после начала процесса наряду с исходным трипсином появляется в значительном количестве вещество, подвижность которого совпадает с подвижностью голубого декстрана с $M 1 \cdot 10^6$ (сефадекс G-150, Superfine), и, следовательно, большая доля фермента переходит в форму связанного с полимером трипсина. Через 25 мин весь трипсин оказывается в связанном с полимером состоянии и движется со скоростью, соответствующей подвижности голубого декстрана. Фермент, химически связанный с полимером, обладает более высокой термостабильностью (рис. 2, 2) по сравнению с нативным ферментом (рис. 2, 1). Вид кривой инактивации связанного трипсина указывает на гетерогенность полученного препарата, в котором можно выделить по крайней мере две фракции, различающиеся между собой по термостабильности. Соотношение активности во фракциях равно $\sim 1 : 1$. Одна из этих фракций оказывается стабильной при 55° и рН 7,8, другая подвергается заметной инактивации, но с меньшей скоростью, чем нативный трипсин. Сопоставление скоростей инактивации модифицированного фермента (рис. 2, 2) с накоплением α -аминового азота (рис. 2, 3) показывает, что, как и для нативного фермента, в этих условиях имеет место автолитическая денатурация. Специальными опытами показано, что связанный фермент сохраняет свою активность полностью при рН 7,8 и температуре 4° в течение 3 месяцев, в то время как нативный фермент в этих условиях на девятые сутки теряет $\sim 50\%$ своей активности. Высокая устойчивость модифицированного трипсина по отношению к автолизу, видимо, связана с наличием сильного электростатического отталкивания друг от друга отрицательно заряженных молекул модифицированного фермента, препятствующего их взаимодействию. Другой фактор, обуславливающий пониженную скорость автолиза связанного трипсина, определяется тем, что в процессе связывания фермента подвергаются химической модификации остатки лизина, непосредственно вблизи которых осуществляется разрыв пептидных связей при автолизе фермента.

Сопоставление термостабильности нативного и модифицированного фермента при рН 4,5 и температуре 55° , когда вклад автолиза в определе-

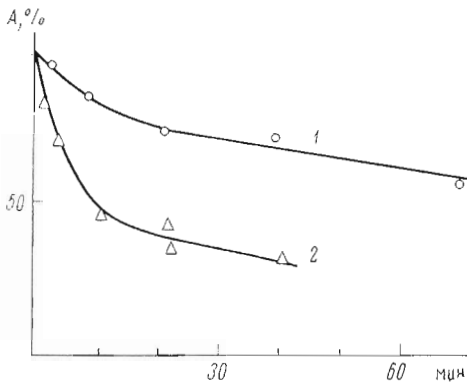


Рис. 3

Рис. 3. Скорость инактивации нативного (1) и модифицированного сополимером (2) трипсина при температуре 55° и pH 4,5

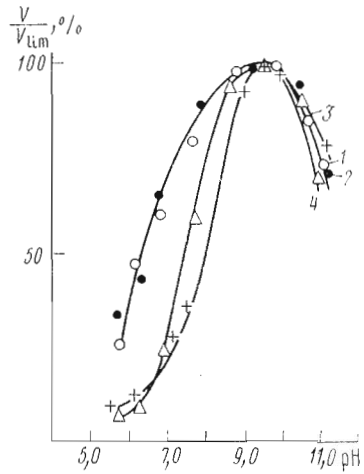


Рис. 4

Рис. 4. Зависимость от pH скорости гидролиза $BzArgOEt$ нативным трипсином при ионной силе μ 0,10 (1), нативным трипсином при μ 0,10 в присутствии $5 \cdot 10^{-2}$ мг/мл сополимера (2), модифицированным трипсином при μ 0,02 (3) и модифицированным трипсином при μ 0,10 (4)

нии параметров денатурации фермента невелик (рис. 3), показывает, что модифицированный трипсин инактивируется с большей скоростью, чем нативный. Переход pH от 7,8 к 4,5 сопровождается деионизацией карбоксильных групп сополимера, приводящей к существенным конформационным перестройкам цепи полиэлектролита, которые влекут за собой деформацию самой белковой глобулы, химически связанной с полимером, и к денатурации фермента.

Роль, которую играет полимерное микроокружение фермента в определении величин кинетических параметров инактивации связанного трипсина по сравнению с нативным, по-видимому, должна быть значительна и при определении параметров взаимодействия с субстратом.

Сравнение скорости ферментативного гидролиза этилового эфира *N*-бензоил-*L*-аргинина при разных значениях pH и ионной силы раствора (μ) для нативного трипсина, трипсина в присутствии полимера и трипсина, химически связанного с этим полимером (рис. 4), показывает, что величина оптимума pH для связанного фермента смещена в щелочную область, причем смещение тем больше, чем меньше ионная сила раствора. Сдвиг оптимума pH в щелочную область в присутствии полианионов или при химической модификации сериновых протеаз полианионами отмечался ранее [2, 3]. Следует подчеркнуть, что в описываемом нами случае именно химическая модификация приводит к смещению оптимума pH, поскольку оптимум pH нативного трипсина совпадает с аналогичной величиной для трипсина в присутствии полимера в тех концентрациях, которые соответствуют таковым в препарате модифицированного фермента. Смещение pH оптимума для фермента, связанного с поликарбоновой кислотой, по-видимому, обусловлено кажущимся сдвигом рК имидазольной группы, участвующей в стадии дезацилирования под действием электростатического поля сополимера. Согласно литературным данным [4], величину этого сдвига (Δ рК) можно оценить, сравнивая pH, при которых максимальная скорость ферментативного гидролиза этилового эфира *N*-бензоиларгинина равна половине ее предельного значения для нативного и модифицированного трипсина (pH и pH' соответственно). Для мо-

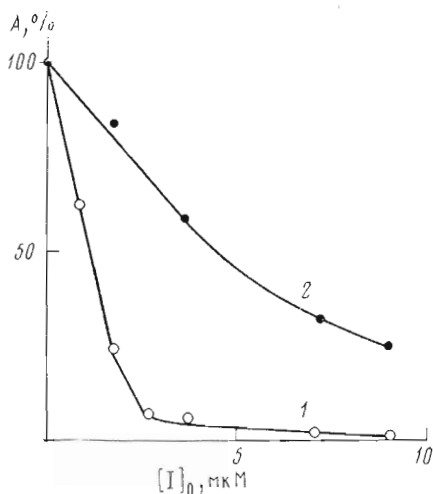


Рис. 5

Рис. 5. Остаточная активность (A , %) нативного (I) и химически модифицированного поликарбонической кислотой трипсина (2) при инкубации с соевым ингибитором при pH 8,0 в присутствии 10^{-5} M раствора CaCl_2 в течение 10 мин: по оси абсцисс — исходная концентрация ингибитора в смеси, обладающей протеолитической активностью, соответствующей концентрации активного трипсина $3 \cdot 10^{-6}$ M

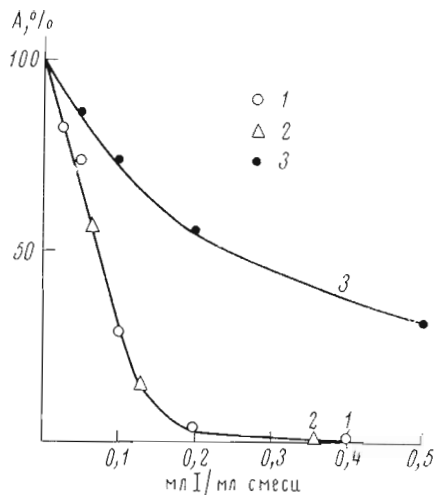


Рис. 6

Рис. 6. Остаточная активность (A , %) в присутствии сыворотки крови человека нативного трипсина (1), трипсина в присутствии полимера (2) и трипсина, химически модифицированного этим полимером (3): по оси абсцисс — количество сыворотки в 1 мл на 1 мл ингибируемого раствора с протеолитической активностью, соответствующей концентрации трипсина $3 \cdot 10^{-6}$ M

дифицированного фермента при ионной силе μ , равной 0,02, $\Delta pK = (pH' - pH) = 1,7$. При повышении значения μ до 0,10 ΔpK снижается до 1,3. Величина смещения ΔpK , найденная нами для трипсина, химически связанного с полианионами, при μ 0,10 значительно выше величин, приведенных в работе [2] и характерных для систем, где фермент может взаимодействовать с полианионами в основном электростатически. С образованием обратимо диссоциирующих комплексов [2] различие между ферментом, химически связанным с полимером, и ферментом, находящимся в присутствии полиэлектролита, проявляется в том, что связанный фермент подвержен гораздо меньшему влиянию ионной силы на состояние имидазола гистидина, ответственного за дезацилирование фермента. Электростатическое поле полимера здесь оказывает более сильное влияние, чем в системах, представляющих собой смесь фермента и полимера, взаимодействующих между собой.

Электрохимическое окружение фермента, возникающее при его связывании с поликислотами, оказывает влияние на взаимодействие фермента с ингибиторами (рис. 5, 6). Предполагается, что равенство активностей нативного и модифицированного трипсина соответствует одинаковой молярной концентрации активного фермента в обеих формах. Отсутствие линейной зависимости степени ингибирования от концентрации внесенного ингибитора $[I]_0$ для модифицированного фермента указывает на сопоставимость величин концентраций внесенного ингибитора и константы ингибирования K_i . Для нативного трипсина в случае соевого ингибитора (рис. 5) известно, что $K_i = 1,5 \cdot 10^{-10}$ M [5], т. е. $K_i \gg [I]_0$. Допуская, что введение субстрата не приводит к изменению сродства ингибитора к ферменту в свободном и связанном состоянии, можно оценить K_i связанного фермента, рассчитывая ее по формуле

$$K_i = [E]([I]_0 - [EI])/[EI],$$

где $[E]$ — равновесная концентрация свободного фермента, не связанного с ингибитором, определяемая по остаточной казеинопептической активности; $[EI]$ — равновесная концентрация фермента, связанного с ингибитором, определяемая по разности между исходной концентрацией фермента $[E]_0$ и остаточной концентрацией фермента, рассчитанной на основании определения казеинопептической активности. Вычисленная величина для связанного фермента $K_i = 2 \cdot 10^{-6}$ М отличается от K_i нативного фермента в 10^4 раз. Химическое связывание фермента с поликарбоновой кислотой приводит к снижению сродства фермента к ингибитору из сои. В снижении величины K_i для модифицированного поликислотой фермента определяющим фактором, по-видимому, является эффект электростатического отталкивания между полианионом связанного трипсина и молекулой ингибитора, в условиях эксперимента имеющего заряд того же знака (величина ИЭТ для соевого ингибитора ~ 4).

Одновременно с изменением сродства к соевому ингибитору изменяется сродство модифицированного трипсина и к ингибиторам сыворотки крови. Как следует из рис. 6, ингибирование полимерного фермента протекает в гораздо меньшей степени, чем нативного, в то время как присутствие сополимера в не связанном с ферментом состоянии не влияет на степень ингибирования нативного трипсина.

Экспериментальная часть

В работе использовали трипсин фирмы Spofa (ЧССР), дополнительно очищенный гель-хроматографией на сефадексе G-50 по методу, описанному ранее [6], ингибитор трипсина из сои и этиловый эфир *N*-бензоил-*L*-аргинина фирмы Reanal. Сополимер винилпирролидона с кротоновой кислотой с содержанием кротоновой кислоты 25 мол. % синтезирован по методу, описанному ранее [7]. Сыворотка крови человека получена на 3-й станции переливания крови Ленинграда. *n*-Толуолсульфонат-*N*-циклогексил-*N'*- β -(4-метилморфолиний)этилкарбодимид синтезирован в отделе биохимии ИОХ СО АН СССР.

Концентрацию активного трипсина (нативного и модифицированного) рассчитывали на основании результатов определения активности фермента. Удельная активность использованного в работе нативного фермента составляла 31,0 ед/мг белка. Предполагается, что весь белок в очищенном исходном препарате является активным ферментом и что равные активности нативного и модифицированного ферментов соответствуют равным количествам активного трипсина в обеих формах. Протеолитическую активность трипсина и его модифицированных форм определяли по модифицированной методике Кунитца [8].

Эстеразную активность трипсина определяли с этиловым эфиром *N*-бензоиларгинина спектрофотометрически по описанной методике [9], α -аминный азот — по Муру и Штейну [10], белок — по методу Лоури [11].

Контроль за степенью ковалентного связывания трипсина с сополимером осуществляли с помощью гель-хроматографии в тонком слое сефадекса G-150 в 0,05 М трис-НСl-буфере, рН 8,0. Зоны фермента проявляли, как описано Иохансоном [12].

Связывание трипсина сополимером проводили после предварительной активации полимера карбодимидом в растворе по методике работы [13]. Инактивацию нативного и модифицированного трипсина определяли при исходной концентрации активного трипсина $5 \cdot 10^{-6}$ М.

Для изучения ингибирования 1 мл смеси, содержащей $3 \cdot 10^{-6}$ М активного трипсина или его модифицированной формы и $(1,8-9,0) \cdot 10^{-6}$ М ингибитора из соевых бобов или 0,02—0,5 мл сыворотки крови в 0,05 М трис-НСl-буфере при рН 8,0, инкубировали при температуре 20° в течение 10 мин и затем определяли остаточную протеолитическую активность $[A]$. Исходную активность $[A]_0$ определяли в опыте без ингибитора.

Авторы приносят свою благодарность члену-кор. АН СССР Д. Г. Кнорре за участие в обсуждении материалов настоящего сообщения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Суровцев В. И. (1975) Успехи соврем. биологии, 80, 3 (6), 370—381.
2. Стрельцова З. А., Браудо Е. Е., Толстогузов В. Б. (1975) Биооргав. химия, 1, 267—272.
3. Goldstein L., Katschalski E. (1968) Z. anal. Chem., 243, 375—376.
4. Dixon M. (1953) Biochem. J., 55, 164—170.
5. Green N. M. (1953) J. Biol. Chem., 205, 535—551.
6. Кольцова С. В., Гликина Н. В., Илларионова Н. Г., Самсонов Г. В. (1971) Молекулярн. биология, 5, 225—230.
7. Ушаков С. Н., Кропачев В. А., Трухманова Л. Б., Груз Р. И., Маркелова Т. М. (1967) Высокомолек. соед., X(A), 1806—1813.
8. Нортроп Д., Куницц М., Херриотт Р. (1950) Кристаллические ферменты, с. 303—306, ИЛ, М.
9. Schwert G. W., Takenaka Y. (1955) Biochim. et biophys. acta, 10, 570—575.
10. Moore S., Stein W. (1948) J. Biol. Chem., 176, 367—388.
11. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. (1951) J. Biol. Chem., 193, 265—275.
12. Johansson B. G., Rybo L. (1962) Acta chem. scand., 16, 2067—2068.
13. Кнорре Д. Г., Миргородская О. А., Шубина Т. Н. (1964) Кинетика и катализ, 5, 642—648.

Поступила в редакцию
12.IV.1976
После доработки
16.VI.1976

PHYSICO-CHEMICAL CHARACTERISTICS OF WATER-SOLUBLE TRYPSIN IMMOBILIZED ON POLYCARBOXYLIC ACIDS

IVANOVA G. P., MIRGORODSKAYA O. A., PANARIN E. F.,
MOSKVITCHEV B. V.

*The All-Union Research Technological Institute
of Antibiotics and Enzymes, Leningrad*

A comparison was made of the inactivation of native trypsin with that of trypsin immobilized by using water-soluble carbodiimide on the copolymer of vinylpyrrolidone and crotonic acid. Chemical modification of the enzyme was shown to result in decreasing the rate of autolytic denaturation. When not complicated by the autolysis, thermodenaturation of the immobilized trypsin proceeded at a higher rate than that of the native trypsin. A shift of the pH optimum to the alkaline region was noted with the immobilized enzyme as compared to that of native trypsin, which was evidently due to the apparent change of pK-value in the imidazole group of trypsin that took part in deacylation process. Trypsin immobilization was revealed to result in reduced trypsin affinity for the inhibitor from soya beans, as well as for the blood serum inhibitors.
