



УДК 577.15.02

ТЕРМОДИНАМИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ СТАБИЛИЗАЦИИ
ИММОБИЛИЗОВАННЫХ ФЕРМЕНТОВ

Козлов Л. В.

*Институт биоорганической химии им. М. М. Шелякина
Академии наук СССР, Москва*

Выдвинута гипотеза, объясняющая наблюдаемую «необратимую» денатурацию иммобилизованных ферментов исходя из представлений о термодинамически равновесных процессах. В опытах по обратимой и необратимой термоденатурации иммобилизованных и растворимых модифицированных ферментов обнаружено, что иммобилизация и модифицирование полимерами приводят к снижению энтропии денатурации и энтропии активации этого процесса. Связанное с этим снижение энтальпии вносит дестабилизирующий вклад. Изменение кинетической и термодинамической стабильности ферментов при их иммобилизации обусловлено соотношением энтропийного и энтальпийного вкладов. Анализ термодинамических и активационных параметров денатурации позволяет предполагать, что в целом белок при его модифицировании приближается к денатурированному и активированному состоянию по координате конформационных изменений процесса денатурации.

Одной из важных задач, решаемых иммобилизацией ферментов, является повышение их устойчивости к денатурирующим воздействиям среды, приводящее к возможности более длительного использования соответствующих ферментных препаратов в технологических процессах, лабораторной практике и медицине. Как критерий стабильности белков чаще всего рассматривается их устойчивость к воздействию тепла — термостабильность. Поэтому наиболее детально изучено влияние нагревания ферментов (в том числе иммобилизованных или модифицированных растворимых) на сохранение активности и нативных свойств.

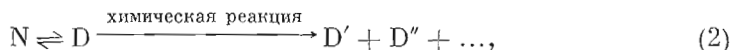
Исследования тепловой денатурации нативных, иммобилизованных и растворимых модифицированных ферментов показали, что процесс денатурации может быть как обратимым (и идущим до равновесного состояния, зависящего от температуры), так и необратимым (и идущим до конца) [1–3].

Если рассматривать процесс денатурации белка как переход между двумя состояниями (см., например, [4]), то такой процесс теоретически обратим:



где N — нативная форма белка, D — денатурированная. Однако процесс может идти практически до конца в области достаточно высоких температур, что определяется значением константы равновесия K. Тем не менее всегда можно найти условия, при которых происходит регенерация нативной структуры (некоторые примеры см. ниже).

Часто наблюдаемая необратимость процесса для растворимых белков может вызываться дальнейшими превращениями денатурированной D-формы, главным образом вследствие химических, практически необратимых реакций (равновесие которых сильно смещено в сторону образования новых продуктов), что было строго показано в случае автолиза белков:



где D' , D'' , ... — продукты деградации или других химических реакций. Последующие реакции выводят денатурированную форму белка из участия в равновесии с нативной формой и сдвигают равновесие вправо.

Как было показано [1, 2, 5], иммобилизация, а также модификация растворимыми высокомолекулярными полимерами приводят к препаратам, устойчивым к автолизу, что позволяет изучать термоденатурацию без осложняющего влияния автолиза. В частности, это позволило внести существенную поправку в представления о влиянии pH среды на денатурацию α -химотрипсина [5] и изучать денатурацию в условиях, не осложненных автолизом [1—3, 5—9]. Сорбционная иммобилизация ферментов, предварительно модифицированных высокомолекулярными растворимыми соединениями [2, 7, 10, 11] или низкомолекулярным красителем [12—16], а также ряд других способов иммобилизации [17] позволяют получать препараты ферментов, используемые в различных технологических процессах [14, 18—20]. Отсутствие межмолекулярных контактов иммобилизованных белковых молекул, которые могли бы привести к ферментативному гидролизу (автолизу), показано при изучении процесса активации иммобилизованного пепсиногена [21]. Возникающая гетерогенность иммобилизованных белков в отношении их температурной стабильности объясняется гетерогенностью препаратов по числу ковалентных связей, образующихся между молекулами белка и носителем [22]. Весь этот накопленный к настоящему времени экспериментальный материал позволяет высказать определенные суждения о характере влияния иммобилизации ферментов на изменение их устойчивости к температурным воздействиям.

Изменение устойчивости иммобилизованных ферментов к тепловой денатурации связано как с изменением кинетической стабильности, т. е. активационных параметров реакции термоденатурации, так и с изменением термодинамической стабильности, т. е. равновесных параметров. Термодинамическую стабильность можно изучать на основании исследования обратимой денатурации, когда можно фиксировать достижения равновесий (1) для каждой данной температуры (рис. 1). Однако в большинстве случаев при исследовании тепловой денатурации иммобилизованных ферментов наблюдается так называемая необратимая денатурация. Рассмотрим определение самого термина «необратимость» и причины (механизмы) наблюдаемых необратимых термоденатурационных процессов.

Под необратимой денатурацией часто понимают такой процесс, который приводит к получению формы белка, не восстанавливающей своих нативных свойств после снятия денатурирующего воздействия [23]. При этом совершенно справедливо подчеркивается, что ренатурация белка идет с исключительно малой скоростью [23] и в течение разумного времени опыта денатурированный белок не может превратиться в правильно свернутую термодинамически стабильную конформацию из-за высокого кинетического барьера для обратной реакции [24]. Однако если учесть, что в работах [23, 24] (где авторы считали, что процесс термоденатурации иммобилизованного трипсина был необратимым), во-первых, не достигалась 100%-ная потеря активности и, во-вторых, наблюдался процесс медленной ренатурации при температурах 20 и 37°С [24], вряд ли следовало считать эту термоденатурацию необратимым процессом.

Можно предположить два критерия, по которым следует судить об обратимости или необратимости процесса:

Рис. 1. Кинетика тепловой денатурации при pH 7,5 сепарон-Н1000-Glc-трипсина [3]

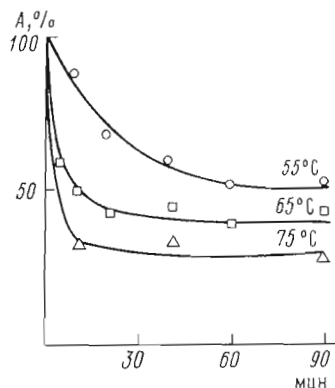


Рис. 1

Рис. 2. Относительная интенсивность флуоресценции при 330 нм α -химотрипсина (1) и ПАМ-химотрипсина (2) в зависимости от температуры при pH 5,5 [9]

Рис. 3. Активность α -химотрипсина (1) и ПАМ-химотрипсина (2) в зависимости от температуры инкубации при pH 5,5 [9]

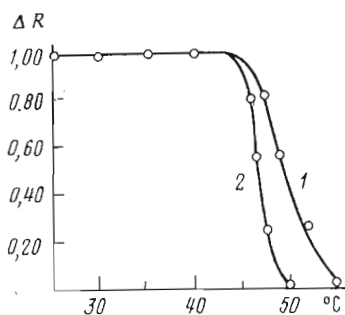


Рис. 2

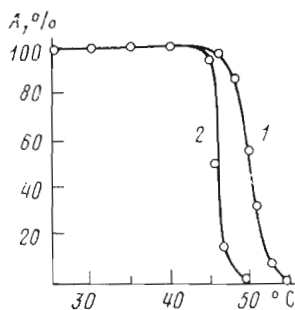


Рис. 3

1) если при всех температурах перехода (денатурации) всегда достигается 100%-ная потеря свойств нативного белка (или кинетика процесса такова, что достижение полной денатурации ожидается), то процесс необратим. Если же для каждой температуры имеется свой предел денатурации (достижение равновесия), то скорее всего этот процесс обратим;

2) другим критерием обратимости процесса является возможность ренатурации денатурированного белка при выдерживании его при температуре, несколько более низкой, чем температура денатурации. Однако при сильном снижении температуры часто не наблюдается заметной ренатурации, что может объясняться высоким активационным барьером этой реакции и поэтому очень низкой скоростью. Отсутствие наблюдаемой ренатурации при низких температурах (например, комнатной) часто является причиной ошибочных заключений о необратимости процесса.

В работе [3] было показано, что для одного из препаратов трипсина, иммобилизованного на сепароне Н1000, покрытом глюкозой (сепарон-Н1000-Glc-трипсин), для каждой температуры денатурации имеется свое предельное значение падения активности, ниже которого активность не падает при увеличении времени термообработки (рис. 1). Аналогичное явление наблюдалось для препаратов α -химотрипсина и химотрипсина, связанного с сополимером акриловой и малеиновой кислот (ПАМ-химотрипсин), где для каждой температуры имелось свое конечное значение изменения флуоресценции (рис. 2) и ферментативной активности (рис. 3) [9], что, согласно вышеприведенному критерию 1, должно свидетельствовать в пользу обратимой денатурации. Действительно, в работе [2] обнаружена ренатурация денатурированного химотрипсина и ПАМ-химотрипсина по восстановлению спектров флуоресценции (рис. 4) и активности (рис. 5) при длительной инкубации при 25°C. Таким образом, процесс денатурации удовлетворял и второму критерию и был обратимым.

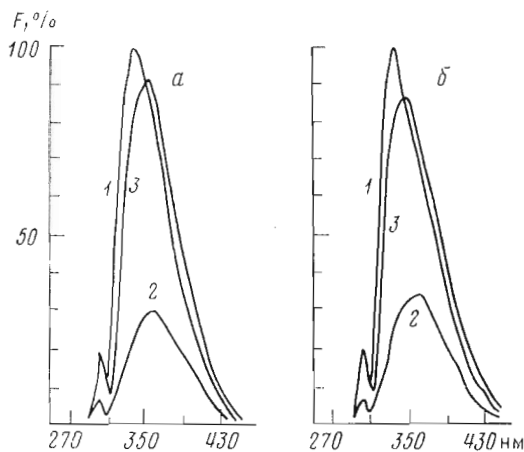


Рис. 4

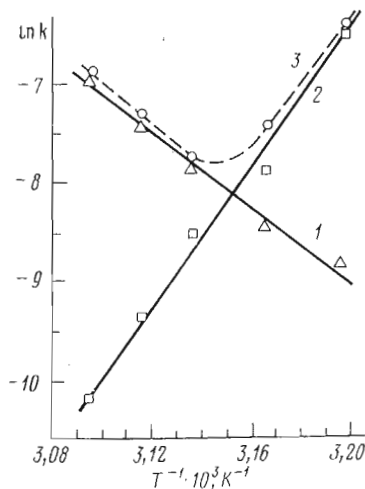


Рис. 6

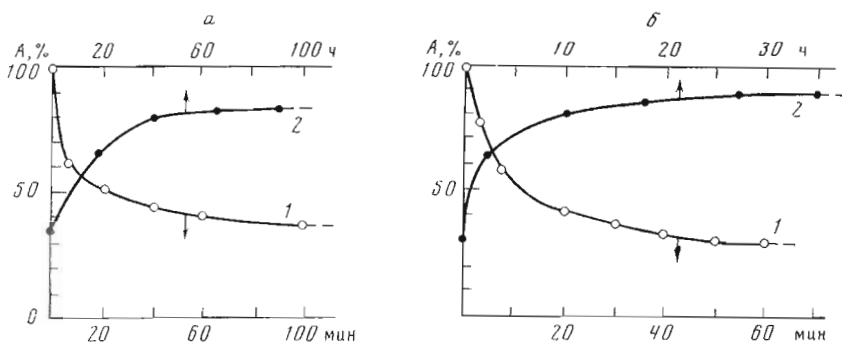


Рис. 5

Рис. 4. Спектры флуоресценции (рН 5,5) при денатурации (50° С) и ренатурации (25° С) ПАМ-химотрипсина (а) и α -химотрипсина (б): 1 – исходный, 2 – после денатурации, 3 – после ренатурации [2]

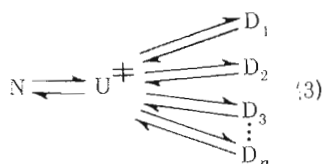
Рис. 5. Кинетика денатурации при 50° С (1) и ренатурации при 25° С (2) α -химотрипсина (а) и ПАМ-химотрипсина (б) при рН 5,5 [2]

Рис. 6. График Аррениуса для обратимой денатурации ПАМ-химотрипсина при рН 5,5: 1 – денатурация, 2 – ренатурация, 3 – релаксация [2]

Следует отметить, что если процесс обратим, то наблюдаемая константа скорости денатурации на самом деле представляет собой константу скорости достижения равновесия (релаксации) и равна сумме двух констант: константы скорости денатурации и константы скорости ренатурации. Поэтому температурная зависимость этой константы может иметь минимум, т. е. вначале с повышением температуры измеряемая скорость денатурации падает, а затем растет (рис. 6).

Во многих случаях наблюдаемая денатурация, согласно этим критериям, носит необратимый характер. Одна из причин необратимости денатурации — наличие следующей за обратимой, химической стадией, что показано выше уравнением 2. Можно предложить еще два механизма, объясняющих феноменологически необратимый характер денатурации. По первому из них, нативный белок N из активированного состояния U^+ переходит не в одно денатурированное состояние D, а в n таких состояний,

каждое со своей константой равновесия между N- и D-формами:



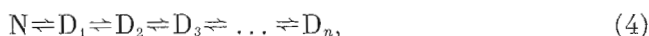
$$K_1 = \frac{[D_1]}{[N]}, \quad K_2 = \frac{[D_2]}{[N]}, \quad \dots, \quad K_n = \frac{[D_n]}{[N]}.$$

В таком случае в равновесии общая концентрация белка $[E]_0$ равна $[E_0] = [N] + [D_1] + [D_2] + \dots + [D_n] = [N] + K_1[N] + K_2[N] + \dots + K_n[N]$ и концентрация нативной формы в равновесии:

$$[N] = \frac{[E]_0}{1 + K_1 + K_2 + \dots + K_n}.$$

При большом количестве денатурированных форм и достаточно больших значениях индивидуальных констант равновесия (когда денатурация имеет место) такой обратимый процесс денатурации выглядит как необратимый и, согласно вышеприведенному критерию 1, протекает практически до конца ($[N] \rightarrow 0$). Согласно приведенному механизму, увеличение наблюдаемой константы реакции денатурации (равной сумме индивидуальных констант) по сравнению с механизмом «перехода между двумя состояниями» приводит к снижению температурного интервала, необходимого для ренатурации белка. Отсутствие заметной ренатурации в этих условиях является результатом высоких кинетических барьеров реакции.

Другой механизм состоит из цепи последовательных превращений денатурированных форм:



$$K_1 = \frac{[D_1]}{[N]}; \quad K_2 = \frac{[D_2]}{[D_1]}; \quad \dots \quad K_n = \frac{[D_n]}{[D_{n-1}]},$$

$$[E]_0 = [N] + K_1[N] + K_1K_2[N] + \dots + K_1K_2 \dots K_n[N]$$

и

$$[N] = \frac{[E]_0}{1 + K_1 + K_1K_2 + K_1K_2K_3 + \dots + K_1K_2K_3 \dots K_n}.$$

При этом концентрация нативной формы еще ниже, чем в случае, описываемом уравнением 3, при значениях индивидуальных констант, больших или равных 1. Оба механизма объясняют наблюдаемое возрастание константы равновесия по сравнению с переходом между двумя состояниями при всех прочих равных условиях, что означает дестабилизацию белка, который денатурирует до конца в тех условиях, когда он денатурировал бы до равновесного состояния, если бы имел место переход между двумя состояниями.

Если эти механизмы действительно справедливы, то замена процесса перехода с многими денатурированными состояниями механизмом «перехода между двумя состояниями» могла бы привести к ренатурации белка, ранее необратимо денатурированного. Действительно, данные ряда работ могут служить указанием на такую возможность. Так, было найдено, что тепловая денатурация α -химотрипсина, иммобилизованного на СМ-целлюлозе (СМС-химотрипсин), выглядит как необратимая [1, 6]. Однако при денатурации того же препарата 8 М мочевиной можно реактивировать ~7% активности. Тот же результат был получен при восстановлении в этом препарате дисульфидных связей в 8 М мочевины с последующим окислением в отсутствие катализаторов тиол-дисульфидного обмена [22]. Не очень высокий процент реактивации объясняется прежде всего тем, что

α -химотрипсин является трехцепочечным белком и значительная часть белка (до 40%) отмывается с носителя после восстановления дисульфидных связей. Кроме того, выход реактивированного фермента был бы, по-видимому, существенно выше, если бы при восстановлении использовались катализаторы тиол-дисульфидного обмена (см., например, [25, 26], где было показано, что даже для одноцепочечного белка — иммобилизованного трипсина выход реактивированного фермента в отсутствие катализаторов тиол-дисульфидного обмена был еще ниже, в то время как с катализаторами достигал очень высоких значений).

Таким образом, изменение условий денатурации, т. е. замена термоденатурации денатурацией 8 М мочевиной (с или без восстановления дисульфидных связей), приводит к более реактивируемой форме денатурированного белка. Вероятно, при разворачивании глобулы белка 8 М мочевиной реализуется меньше конформеров денатурированного белка с выраженными локальными минимумами свободной энергии (полное разворачивание) и механизм денатурации приближается к механизму «перехода между двумя состояниями».

Еще более нагляден пример перевода термоденатурированного иммобилизованного белка в развернутую форму в присутствии 8 М мочевины с восстановлением дисульфидных связей. В этом случае необратимо термоденатурированный белок удавалось полностью реактивировать после удаления денатуранта (мочевины) и реокисления дисульфидных связей в присутствии катализаторов тиол-дисульфидного обмена [23—27]. Можно предположить, что при этом осуществляется перевод множества денатурированных форм термоденатурированного белка в одну форму полностью развернутого белка, что облегчает реактивацию по механизму «перехода между двумя состояниями».

Из этого рассмотрения следует, что в случае так называемой необратимой денатурации, по-видимому, реализуются механизмы (3) и (4) или, что более вероятно, сочетание этих механизмов.

Рассмотрим влияние иммобилизации на равновесные термодинамические параметры денатурации в тех случаях, когда наблюдалась обратимая термоденатурация. В одной серии опытов это были растворимые препараты химотрипсина, ковалентно связанного с сополимером акриловой и малеиновой кислот (ПАМ) или полималеиновой кислотой (ПМК), а также электростатические комплексы фермента с полиакриловой кислотой молекулярной массы 10^6 и 10^4 (ПАК 10^6 и 10^4), ПАМ и ПМК (табл. 1) [2]. В другой серии опытов наблюдалась обратимая денатурация одного из препаратов трипсина, иммобилизованного на геле сепарона, покрытого глюкозой (табл. 2) [3], причем другой препарат, отличающийся, по-видимому, большим числом ковалентных связей белка с матрицей, о чем свидетельствовало наличие двух форм — относительно лабильной и стабильной, денатурирует необратимо.

Для всех обратимо денатурирующих препаратов величины энтальпии ΔH° и энтропии ΔS° денатурации существенно ниже соответствующих параметров реакции денатурации исходных немодифицированных белков. Снижение энтропии денатурации означает, что для осуществления процесса денатурации модифицированного белка необходимы меньшие конформационные изменения по сравнению с денатурацией исходного (немодифицированного) белка (причины этого будут показаны ниже). При этом происходит снижение и энтропии денатурации, и энтропии активации процесса денатурации. Этим же объясняется и уменьшение энтальпии денатурации и соответствующего активационного параметра: меньшие конформационные изменения требуют меньших затрат тепловой энергии на реализацию процесса.

Однако с точки зрения изменения устойчивости белка при его иммобилизации уменьшение энтропии и энтальпии, происходящее симбатно, приводит к противоположным эффектам. Если снижение энтропии повы-

Термодинамические и активационные параметры термоденатурации препаратов химотрипсина при pH 5,5 [2]

Препарат	Денатурация				Ренатурация		Температура перехода, °C
	ΔH° , ккал/моль	ΔS° , э. е.	ΔH^\ddagger , ккал/моль	ΔS^\ddagger , э. е.	ΔH^\ddagger , ккал/моль	ΔS^\ddagger , э. е.	
Химотрипсин	223	692	165	435	-56	-243	49,6
Химотрипсин+ПАК 10 ⁶	120	377	59	110	-61	-268	45,0
Химотрипсин+ПАК 10 ⁴	118	370	60	112	-58	-256	44,8
Химотрипсин+ПАМ	106	334	55	97	-51	-237	44,1
ПАМ-химотрипсин	110	346	38	44	-74	-307	44,1
Химотрипсин+ПМК	93	295	57	105	-38	-195	43,0
ПМК-химотрипсин	97	304	61	117	-36	-185	45,6

Таблица 2

Термодинамические и активационные параметры термоденатурации препаратов трипсина при pH 7,3-7,9 [3]

Препарат	Денатурация				Ренатурация		Температура перехода, °C
	ΔH° , ккал/моль	ΔS° , э. е.	ΔH^\ddagger , ккал/моль	ΔS^\ddagger , э. е.	ΔH^\ddagger , ккал/моль	ΔS^\ddagger , э. е.	
Трипсин (pH 2,2) [28]	30	93	67	+142	37	+49	49,4
Трипсин (сухой) [29]	Необратимая		23	-25	—	—	—
Сепарон-Glc-трипсин I	10	30	45	+62	36	+32	60,2
Сепарон-Glc-трипсин II	Необратимая		43	+51	—	—	—
лабильная фракция	»		21	-14	—	—	—
Целлюлоза-трипсин	»		23	-6	—	—	—
лабильная фракция	»		19	-23	—	—	—
стабильная	»						

шает устойчивость (в случае равновесных параметров — термодинамическую, в случае активационных — кинетическую), то снижение энтальпии приводит к дестабилизации. Поэтому изменение устойчивости белка при его иммобилизации зависит от соотношения изменения величин энтальпии и энтропии. Так, во всех примерах табл. 1 уменьшаются и термодинамическая, и кинетическая стабильности. В случае же препарата трипсина, иммобилизованного на сепароне, как кинетическая, так и термодинамическая стабильности возрастают. Увеличение термодинамической стабильности выражается в возрастании температуры денатурационного перехода на $\sim 10^\circ\text{C}$.

Энтропия активации процесса денатурации коррелирует с числом связей белка с матрицей. Так, в работе [22] было показано, что две фракции нерастворимого химотрипсина, иммобилизованного на СМ-целлюлозе, — стабильная и лабильная — различаются числом ковалентных связей между белком и носителем: одна связь имеется в случае лабильной фракции и две-три — в случае стабильной. Это согласуется и с существенным снижением энтропии активации реакции денатурации при переходе от нативного химотрипсина к лабильной, а затем стабильной фракции: 126, 30 и -15 э. е. (табл. 3) [1]. Невалентные взаимодействия приводят к тому же эффекту. Так, при увеличении плотности заряженных групп в полимерах при переходе от полиакриловой кислоты к сополимеру акриловой и малеиновой кислот и к полималеиновой кислоте возрастает число электростатических связей с белком, что показано также и прямым титрованием [27]. Это приводит к уменьшению энтропии дена-

Активационные параметры термоденатурации препаратов химотрипсина при pH 7,3–7,6

Препарат	ΔH^\ddagger , ккал/моль	ΔS^\ddagger , э. е.	Литература
α -Химотрипсин	57	+126	[30]
Декстран-химотрипсин	71	+141	[8]
Альгинат-химотрипсин			
лабильная фракция	55	+99	[8]
стабильная »	17	-24	[8]
СМС-химотрипсин растворимый			
стабильная фракция	1,5	-75	[7]
СМС-химотрипсин нерастворимый			
лабильная фракция	33	+30	[1]
стабильная »	21	-15	[1]
Сепарон-Glc-химотрипсин			
лабильная фракция	47	+64	[3]
стабильная »	38	+35	[3]
Сферон-E-химотрипсин			
стабильная фракция	18	-23	[3]
Целлюлоза-химотрипсин			
лабильная фракция	13	-33	[3]
стабильная »	8	-52	[3]

турации и энтропии активации процесса денатурации соответствующих электростатических комплексов с химотрипсином (табл. 1) [2].

Другим примером влияния образования множественных связей на энтропию активации термоденатурации является исследование денатурации препаратов β -галактозидазы, ее производного — белка, модифицированного хлортриазиновым красителем — активным ярко-оранжевым КХ, содержащим три сульфогруппы (в молекулу белка включаются две молекулы красителя [15]) и препарата окрашенного фермента, сорбированного на DEAE-сефадексе [16]. Как было показано [12], молекула красителя может образовывать в белке межцепочечные солевые связи. Поэтому введение в белок сульфогрупп уже приводит к некоторым конформационным ограничениям, что выражается в небольшом снижении энтропии активации реакции денатурации (табл. 4). Фиксация же такого белка на DEAE-сефадексе за счет электростатических связей приводит к дальнейшему ограничению числа возможных конформеров в активированном состоянии при денатурации, что выражается еще более существенным снижением энтропии.

Данные табл. 1 и 4, а также значительное число данных табл. 3 относятся к заряженным матрицам. Кроме того, не наблюдалось существенных изменений энтальпии и энтропии активации денатурации химотрипсина, ковалентно связанного с растворимым декстраном [8] (эти величины были даже несколько выше, чем для нативного фермента, см. табл. 3). Поэтому возникал вопрос: не присуще ли такое снижение активационных и равновесных термодинамических параметров денатурации только препаратам с заряженной матрицей, в которых реализуются множественные электростатические связи? Однако изучение денатурации химотрипсина и трипсина, ковалентно связанных с такими нейтральными матрицами, как сферон, сепарон, покрытый глюкозой, и микрогранулированная целлюлоза [3] (табл. 2 и 3), показало, что во всех рассмотренных случаях происходит снижение обоих параметров, особенно выраженное для наиболее стабильных форм иммобилизованного фермента.

При сопоставлении данных по активационным параметрам реактивации в обратимой денатурации иммобилизованных и нативных ферментов (табл. 1 и 2) видно, что они очень близки между собой. Это позволяет

Активационные параметры термоденатурации препаратов β -галактозидазы при pH 4,2 [16]

Препарат	ΔH^{\pm} , ккал/моль	ΔS^{\pm} , э. е.
β -Галактозидаза	121	282
» модифицированная красителем	115	262
» связанная на DEAE-сефадексе	73	142

Таблица 5

Константы ингибирования (K_i) ацетиламинокислотами реакций термоденатурации СМС-химотрипсина и гидролиза этилового эфира N-ацетил-L-тирозина [5]

Ингибитор	Гидролиз	Денатурация	
	K_i , М	K_i , М	β
N-Ацетил-D,L-триптофан	0,004	0,0025	0,03
N-Ацетил-L-фенилаланин	0,050	0,060	0,09
N-Ацетил-L-тирозин	0,113	0,136	0,17
N-Ацетилглицин	∞ *	∞ *	1

* Ингибирования не наблюдалось.

высказать предположение о близости как денатурированных форм нативного и иммобилизованного фермента, так и их промежуточных активированных состояний. Это наглядно демонстрируется рис. 7 и 8. Из этих диаграмм следует, что в исходном состоянии иммобилизованные или модифицированные ферменты приближены к денатурированному состоянию как по координате изменений энтальпии, так и по энтропийной координате. Вероятно, можно говорить о приближении модифицированного или иммобилизованного белка к денатурированному состоянию по конформационной координате по сравнению с нативным.

Накопленные данные позволяют высказать также и некоторые предположения относительно характера устойчивости отдельных частей молекулы фермента, т. е. локализовать «наиболее лабильное звено», если таковое имеется. Разобьем молекулу фермента условно на две части: «активный центр» и «вся остальная глобула». Априори трудно сказать, должны ли эти две части быть одинаковыми по устойчивости или разными и какая должна быть устойчивее.

В работах по исследованию деполяризации флуоресценции пепсина в зависимости от pH, температуры, связывания субстратов и ингибиторов [31—33] была выдвинута гипотеза о проявлении сегментальной гибкости фермента, обусловленной наличием двух ядер с близкими молекулярными массами. Структурное подтверждение этой гипотезы было получено рентгеноструктурным анализом [34]. В работах [31—33] было показано, что связывание субстратов и ингибиторов в активном центре фермента или ситуация в пепсиногене, когда, по-видимому, часть молекулы зимогена прикрывает зону активного центра, делают молекулу более жесткой, не обладающей сегментальной гибкостью. Эти данные предполагают некоторую лабильность зоны активного центра по сравнению с остальной глобулой белка. Такая лабильность может быть функционально необходимой. По-видимому, не случайно при физиологических температурах наблюдаются тонкие конформационные изменения в пепсине [35] и химотрипсине [36]. Для проверки предположения о повышенной лабильности зоны активного центра молекулы фермента было исследовано ингибирование

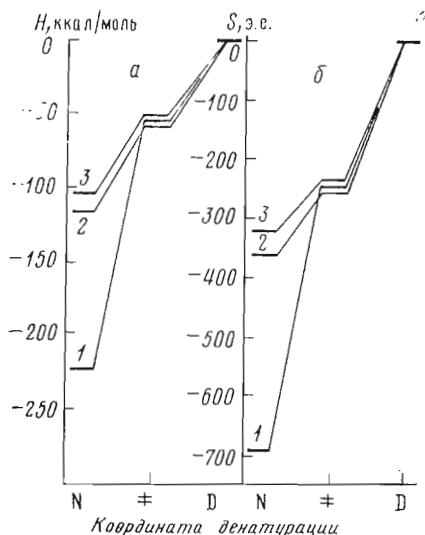


Рис. 7

Рис. 7. Изменение энтальпии (а) и энтропии (б) вдоль координаты реакции денатурации α -химотрипсина (1) и его растворимых комплексов с полиакриловой кислотой ($M \sim 2,8 \cdot 10^4$) (2) и сополимером малеиновой и акриловой кислот ($M \sim 10^6$) (3) при pH 5,5 [2]

Рис. 8. Изменение энтальпии (а) и энтропии (б) вдоль координаты тепловой денатурации трипсина (1) и сепарон-Н1000-Glc-трипсина (2) [3]

Рис. 9. Зависимость β (эффективности «прикрытия») от $1/K_i$ для ингибирования реакции денатурации СМС-¹ химотрипсина N-ацетиламинокислотами: ацетилглицином (1), ацетил-L-тирозином (2), ацетил-L-фенилаланином (3), ацетил-D,L-триптофаном (3) [5]

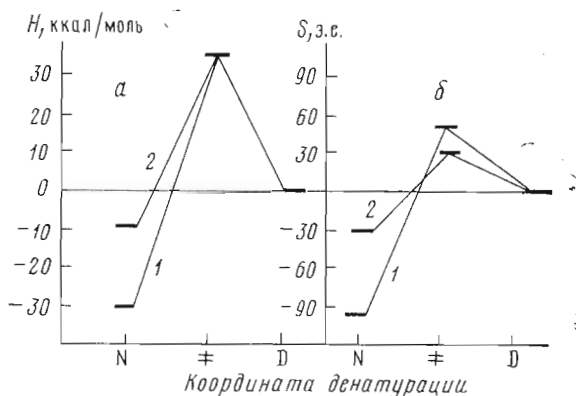


Рис. 8

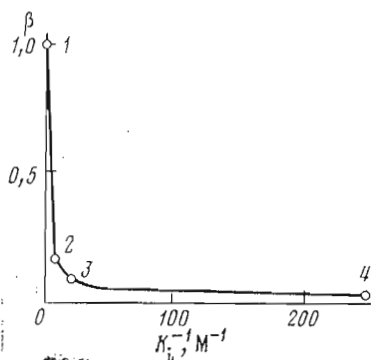
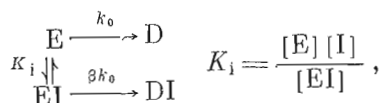


Рис. 9

реакции термоденатурации (защита от денатурации) СМС-химотрипсина аналогами субстратов — ацетиламинокислотами [5].

При изучении защитного действия этих ингибиторов исходили из следующей схемы. В присутствии ингибитора фермент находится в двух формах: свободный фермент и фермент-ингибиторный комплекс. Обе формы денатурируют с соответствующими константами скорости k_0 и βk_0 :



где E — фермент, I — ингибитор, EI — фермент-ингибиторный комплекс, D и DI — соответствующие формы денатурированного фермента, K_i — константа диссоциации фермент-ингибиторного комплекта, k_0 — константа скорости денатурации свободного фермента, βk_0 — константа скорости денатурации фермент-ингибиторного комплекса. Эффективность «прикрытия» ингибитором активного центра и защиты от денатурации определяется величиной β ; чем ближе к нулю значение β , тем «прикрытие» эффективнее. Для определения величин K_i и β удобно воспользоваться

выражением, выведенным в работе [5]:

$$\frac{k_0}{k_0 - k_i} = \frac{1}{1 - \beta} \left(1 - \frac{K_i}{[I]} \right),$$

где k_i — измеряемая константа скорости денатурации в присутствии ингибитора. В табл. 5 приведены константы ингибирования ацетиламино-кислотами реакций денатурации СМС-химотрипсина и гидролиза им этилового эфира ацетилтирозина. Чем больше сродство фермента к ингибитору (меньше K_i), тем эффективнее «защитное» действие ингибитора (меньше β). Это наглядно показано на рис. 9, на котором представлена зависимость $1/K_i$ от β . Из этого рисунка следует, что при увеличении $1/K_i$ (рост сродства) β стремится к определенному пределу, соответствующему, очевидно, состоянию, когда активный центр не способен к денатурационным изменениям. Предельная величина β характеризует скорость разворачивания «остальной белковой глобулы», связанной с матрицей. В стабильной фракции СМС-химотрипсина (на которой и были проведены эти исследования) из-за наличия нескольких ковалентных связей между белком и матрицей ($\sim 2-3$ [22]) белковая глобула денатурирует медленнее. Таким образом, «запуск» процесса тепловой инактивации стабильной фракции СМС-химотрипсина почти целиком обусловлен конформационными изменениями, происходящими в области активного центра. Отсюда следует вывод относительно того предела, который достижим при стабилизации ферментов с помощью иммобилизации. Очевидно, что, закрепляя и стабилизируя «всю остальную глобулу», не следует существенно ограничивать функционально необходимую подвижность активного центра фермента. Вероятно, одной из причин потери активности фермента при его иммобилизации и восстановления активности при освобождении с матрицы (наряду со стерическими препятствиями) является ограничение функционально важной подвижности активного центра.

Изучение вопросов стабилизации ферментов при их иммобилизации важно не только с практической точки зрения. Процессы искусственной иммобилизации ферментов в известной мере могут моделировать и естественную иммобилизацию физиологически важных белков и ферментов на биологических мембранах. Так, например, факторы системы комплемента С2, С3, С4 и С5, будучи активированными, становятся весьма лабильными в свободном виде в растворе, и только связывание на мембране приводит к стабилизации [37]. Для фактора С2, представляющего собой протеолитический фермент, появление функциональной активности, сопряженное с лабильностью, напоминает ситуацию с превращением жесткой глобулы пепсиногена в сегментально гибкий пепсин [31]. Как предполагается, при активации многих факторов комплемента обнажаются гидрофобные участки, которые могут участвовать в связывании (иммобилизации) с поверхностью мембранной оболочки клетки или с другой белковой молекулой. При такой иммобилизации резко возрастает устойчивость активированной молекулы данного фактора комплемента. По аналогии с изученными явлениями стабилизации иммобилизованных ферментов можно предполагать, что и в этом случае вклад в стабилизацию структуры могут вносить главным образом энтропийные факторы, обусловленные конформационным закреплением белковых цепей вследствие образования множественных связей с матрицей. Термодинамический подход для решения вопросов стабилизации белков при их естественной иммобилизации может пролить свет на механизмы регуляции устойчивости белков при их функционировании в живых организмах.

ЛИТЕРАТУРА

1. Суровцев В. И., Козлов Л. В., Антонов В. К. (1971) Биохимия, 36, 199-204.
2. Бессмертная Л. Я., Козлов Л. В., Антонов В. К. (1977) Биохимия, 42, 1825-1834.
3. Туркова Я., Козлов Л. В., Бессмертная Л. Я., Кудрявцева Л. В., Красильникова В. М., Антонов В. К. (1980) Биоорганическая химия, 6, 108-115.
4. Baldwin R. L. (1975) Ann. Rev. Biochem., 44, 453-475.

5. Суrowцев В. И., Козлов Л. В., Антонов В. К. (1972) Биохимия, 37, 1139-1143.
6. Суrowцев В. И., Козлов Л. В., Антонов В. К. (1970) Докл. АН СССР, 195, 1463-1465.
7. Кинстлер О. Б., Козлов Л. В. (1977) Биохимия, 42, 1674-1681.
8. Молчанова Н. Н., Козлов Л. В. (1978) Биохимия, 43, 1006-1011.
9. Lasch J., Bessmertnaya L., Kozlov L. V., Antonov V. K. (1976) Eur. J. Biochem., 63, 591-598.
10. Бессмертная Л. Я., Козлов Л. В., Антонов В. К. (1974) Биохимия, 39, 793-799.
11. Яровая Г. А., Гулянская Т. Н., Доценко В. Л., Бессмертная Л. Я., Козлов Л. В., Антонов В. К. (1975) Биоорган. химия, 1, 646-651.
12. Янушаускайте В. Б., Козлов Л. В., Антонов В. К. (1974) Биохимия, 39, 446-453.
13. Янушаускайте В. Б., Козлов Л. В., Антонов В. К. (1975) Биоорган. химия, 1, 42-49.
14. Виноградова Н. Н., Козлов Л. В., Антонов В. К., Жагат Р. А. (1975) Химия природн. соед., 1, 113-114.
15. Золотова В. С., Тихомирова А. С., Козлов Л. В., Антонов В. К. (1976) Биохимия, 41, 1671-1676.
16. Баева В. С., Козлов Л. В., Антонов В. К. (1977) Биохимия, 42, 706-711.
17. Крылова Ю. И., Козлов Л. В., Антонов В. К., Гаина Б. С., Датунашвили Е. Н., Павленко Н. М. (1976) Биоорган. химия, 2, 273-278.
18. Долгих Т. В., Суrowцев В. И., Козлов Л. В., Антонов В. К., Гинодман Л. М., Звягинцев В. И. (1971) Прикл. биохимия и микробиол., 7, 686-689.
19. Янушаускайте В. Б., Козлов Л. В., Антонов В. К. (1974) Прикл. биохимия и микробиол., 10, 411-414.
20. Гаина Б. С., Павленко Н. М., Датунашвили Е. Н., Крылова Ю. И., Козлов Л. В., Антонов В. К. (1976) Прикл. биохимия и микробиол., 12, 210-216.
21. Козлов Л. В., Крылова Ю. И., Антонов В. К. (1979) Биоорган. химия, 5, 1083-1090.
22. Козлов Л. В., Суrowцев В. И., Антонов В. К. (1975) Биоорган. химия, 1, 127-130.
23. Мартинек К., Можаяев В. В., Березин И. В. (1978) Докл. АН СССР, 239, 483-485.
24. Klibanov A. M., Mozhaev V. V. (1978) Biochem. and Biophys. Res. Commun., 83, 1012-1017.
25. Можаяев В. В., Мартинек К., Березин И. В. (1979) Молекулярн. биология, 13, 73-80.
26. Можаяев В. В., Мартинек К., Березин И. В. (1975) Молекулярн. биология, 13, 673-680.
27. Можаяев В. В., Смирнов М. Д., Мартинек К., Березин И. В. (1979) Биоорган. химия, 5, 1091-1101.
28. Pohl F. M. (1968) Eur. J. Biochem., 7, 146-152.
29. Millaneу P. F. (1966) Nature, 200, 953.
30. Антонов В. К., Воротынцева Т. И., Коган Г. А. (1970) Молекулярн. биология, 4, 240-245.
31. Глотов Б. О., Козлов Л. В., Завада Л. Л. (1976) Молекулярн. биология, 10, 161-174.
32. Глотов Б. О., Козлов Л. В., Завада Л. Л. (1976) Молекулярн. биология, 10, 288-293.
33. Глотов Б. О., Козлов Л. В., Завада Л. Л. (1976) Молекулярн. биология, 10, 530-537.
34. Hsu I.-N., Delbaer L. T. J., James M. N. G., Hofmann T. (1977) Nature, 266, 140-145.
35. Козлов Л. В., Мещерякова Е. А., Завада Л. Л., Ефремов Е. С., Рашковецкий Л. Г. (1970) Биохимия, 44, 338-349.
36. Ламри Р., Билтонен Р. (1973) в кн.: Структура и стабильность биологических макромолекул, с. 7-173, «Мир», М.
37. Müller-Eberhard H. (1975) Ann. Rev. Biochem., 44, 697-724.

Поступила в редакцию

21.IX.1979

После доработки

20.XI.1979

THERMODYNAMIC PRINCIPLES OF STABILIZATION OF IMMOBILIZED ENZYMES

KOZLOV L. V.

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

An hypothesis was advanced rationalizing the apparent «irreversible» denaturation of immobilized enzymes in the framework of thermodynamic equilibrium processes. In experiments with reversible and irreversible thermal denaturation of immobilized and soluble modified enzymes it was found that immobilization and modification by polymers diminish both entropy of denaturation and entropy of activation of the denaturation process. A concomitant decrease in enthalpy contributes to the destabilization effect. The changes in kinetic and thermodynamic stability of enzymes upon immobilization depend on the ratio of entropy and enthalpy contributions. The analysis of thermodynamic and activation parameters of denaturation suggests that, in general, upon modification a protein approaches the denatured and activated state along the coordinate of conformational changes of the denaturation process.