



УДК 547.962.04:577.156.3:578.088

ГИДРАТАЦИЯ КОМПЛЕКСА ТРИПСИНА С ПАНКРЕАТИЧЕСКИМ
ИНГИБИТОРОМ ТРИПСИНА*Хургии Ю. И., Филатова Т. Н., Шерман Ф. Б.**Институт органической химии им. Н. Д. Зелинского
Академии наук СССР, Москва*

Взаимодействие между биологическими макромолекулами имеет важное функциональное значение. Известными примерами белок-белковых взаимодействий являются образование четвертичной структуры, связывание белковых антигенов специфическими антителами, торможение протеолитической активности белковыми ингибиторами протеиназ и т. п. Стабильность образующихся комплексов зависит от величины контактных площадок, комплементарности центров взаимодействия, характера межмолекулярных сил, возникающих при образовании комплексов, а также от процесса вытеснения части воды, связываемой свободными компонентами комплексов.

Нами проведена оценка количества воды, вытесняемой при образовании комплекса между трипсином и основным панкреатическим ингибитором трипсина. Для этого методом акватрического титрования [1, 2] была изучена зависимость степени гидратации лиофилизированных препаратов трипсина, ингибитора и их комплекса от относительного давления паров воды (p/p_s).

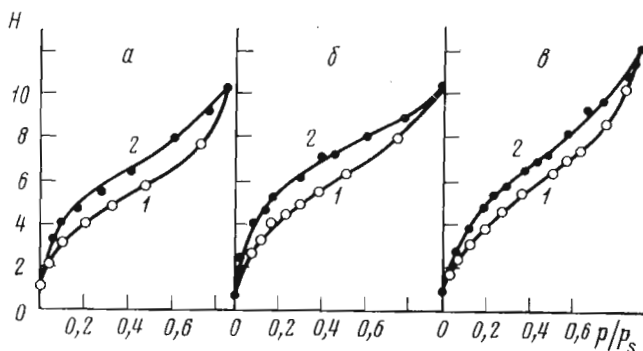
В работе использован препарат основного панкреатического ингибитора трипсина «Gordox» (ВНР), который был лиофилизирован после обезсоливания на сефадексе G-10 в 0,1 М уксусной кислоте. Трипсин марки «Srofa» (ЧССР) очищен методом аффинной хроматографии на сефарозе 4В с иммобилизованным ингибитором трипсина. Комплекс трипсин-ингибитор выделяли гель-фильтрацией (колонка размером 1500×10 мм с сефадексом G-75) смеси трипсина с ингибитором (1 : 1,25) в 0,1 М NH_4HCO_3 (рН 8) и лиофилизовали в эксикаторе над КОН и H_2SO_4 .

Изотермы сорбции и десорбции паров воды трипсином, ингибитором и их комплексом представлены на рисунке. Начальный участок изотерм, как и в случае других белков [1, 2], хорошо описывается уравнением полимолекулярной адсорбции БЭТ* [3]. По принятой нами схеме интерпретации изотерм гидратации глобулярных белков [1, 2], величины эффективной емкости монослоя по БЭТ (h) соответствуют числу первичных центров гидратации, т. е. числу поверхностных боковых групп полярных аминокислот, доступных для взаимодействия с парами воды.

Гистерезис, наблюдаемый в процессе гидратации (рисунок), указывает на неоднородность первичных центров гидратации. Наличие двух значений эффективного монослоя, полученных из изотерм сорбции (\bar{h}) и десорбции (\bar{h}) паров воды, позволяет определить количество относительно более слабых центров гидратации, в число которых входят ω -амидные группы аспарагина и глутамина и группы, образующие поверхностные ионные пары или прочные водородные связи [1, 2].

Полученные нами данные (таблица) позволяют определить общее число центров гидратации в трипсине, ингибиторе и их комплексе и, следовательно, обнаружить изменение числа центров при комплексообразовании. Полученные значения \bar{h} 93,6 и \bar{h} 122,4 моль H_2O на 1 моль комп-

* Уравнение Брунауэра – Эмметта – Теллера.



Изотермы сорбции (1) и десорбции (2) паров воды препаратами трипсина (а), панкреатического ингибитора трипсина (б) и комплекса трипсин — ингибитор (в); H — степень гидратации препаратов (ммоль H_2O на 1 г препарата); p/p_s — относительное давление паров воды над препаратом

лекса, как видно из таблицы, существенно меньше суммы соответствующих величин для трипсина и ингибитора — $\Sigma \bar{h}$ 105,1 и $\Sigma \bar{h}$ 133,4 моль/моль. Различие составляет 11,5 и 11 соответственно. Близость этих двух значений указывает на то, что относительно более слабые центры гидратации не участвуют в комплексообразовании. Можно сделать вывод, что при комплексообразовании 11 боковых групп полярных аминокислот становятся недоступными для взаимодействия с молекулами воды, т. е. как бы спрятались в области контакта.

Эффективная емкость моно слоя воды на поверхности трипсина, ингибитора трипсина и их комплекса, рассчитанная из изотерм сорбции (\bar{h}) и десорбции (\bar{h}) паров воды по уравнению БЭТ [3]
 \bar{h} и \bar{h} выражена в ммоль H_2O на 1 г безводного препарата (в скобках — в моль H_2O на 1 моль белка)

| Исследуемые препараты | \bar{h} | \bar{h} |
|------------------------------------|-------------|--------------|
| Панкреатический ингибитор трипсина | 3,45 (22,1) | 4,23 (27,1) |
| Трипсин | 3,54 (82,5) | 4,58 (106,8) |
| Комплекс трипсин — ингибитор | 3,25 (93,6) | 4,25 (122,4) |

Данные акватрического титрования хорошо согласуются с результатами рентгеноструктурного анализа трипсина, ингибитора и их комплекса [4–6], который был проведен с весьма большой степенью разрешения. Анализ рентгеноструктурных данных [7] показал, что в области контакта экранировано 8–11 боковых групп полярных аминокислот, находящихся в исходных компонентах комплекса на поверхности глобул.

Таким образом, двумя независимыми методами — химическим (акватрическое титрование) и рентгеноструктурным — получены практически одинаковые значения числа полярных групп, экранируемых при образовании комплекса трипсина с его ингибитором белковой природы. Следовательно, метод акватрического титрования может использоваться не только для исследования структуры поверхности глобулярных белков [1, 2], но и для изучения изменений доступной поверхности белков, возникающих при образовании белок-белковых комплексов.

ЛИТЕРАТУРА

- Хургии Ю. И., Росляков В. Я., Клячко-Гурвич А. Л., Бруева Т. Р. Биохимия, 1972, т. 37, № 2, с. 485–492.
- Хургии Ю. И., Шерман Ф. В., Тусупкалиев У. Биохимия, 1977, т. 42, № 2, с. 490–497.
- Brunauer S., Emmett P. H., Teller E. J. Amer. Chem. Soc., 1938, v. 60, № 1, p. 309–319.

4. Bode W., Schwager P. J. Mol. Biol., 1976, v. 98, № 3, p. 693-717.
5. Deisenhofer J., Steigemann W. Acta cryst., 1975, v. B131, № 2, p. 238-250.
6. Huber R., Kukla D., Bode W., Schwager P., Bartels K., Deisenhofer G., Steigemann W. J. Mol. Biol., 1974, v. 89, № 1, p. 73-101.
7. Chotia C., Janin J. Nature (London), 1975, v. 256, № 3, p. 705-708.

Поступило в редакцию
19.V.1982

HYDRATION OF TRYPSIN-PANCREATIC TRYPSIN INHIBITOR COMPLEX

KHURGIN Yu. I., FILATOVA T. N., SHERMAN F. B.

*N. D. Zelinsky Institute of Organic Chemistry, Academy of Sciences
of the USSR, Moscow*

Hydration of the lyophilized preparations of bovine trypsin, basic pancreatic trypsin inhibitor and trypsin-inhibitor complex was measured as a function of relative humidity (p/p_s) by aquametric titration method. On the complex formation, 11 side chains of polar amino acid residues were shown to lose their capability to interact with water molecules. These groups are probably buried in the contact area. The results obtained are in good accord with the X-ray data for respective systems.