

УДК 577.156.2

БИОХИМИЯ

Член-корреспондент АН СССР И. В. БЕРЕЗИН, Н. Ф. КАЗАНСКАЯ, М. С. ХЛУДОВА

СОХРАНЕНИЕ ФЕРМЕНТАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ α -ХИМОТРИПСИНОМ ПОСЛЕ РАСЩЕПЛЕНИЯ ДИСУЛЬФИДНОЙ СВЯЗИ МЕЖДУ ЦЕПЯМИ В И С

Как показано в ряде работ (¹⁻³), многие одноцепочечные белки сохраняют свою нативную структуру после частичного разрушения их S—S-связей. Нами было установлено, что в α -химотрипсине, состоящем из трех цепей, можно электрохимически восстановить по крайней мере одну дисульфидную связь без потери ферментативной активности (⁴). В настоящей работе определено местоположение расщепленных S—S-связей и представлены доказательства того, что одна из них является межцепочечной. Расщепление S—S-связей проводилось при помощи тиофосфата натрия (⁵). Этот метод весьма удобен, так как приводит к образованию продуктов реакции, которые не подвергаются реокислению кислородом воздуха (⁶).

Раствор α -химотрипсина ($3 \cdot 10^{-4}$ M) обрабатывали 100-кратным избытком тиофосфата натрия при pH 7,8 в 0,1 M трис-HCl-буфере в течение 16 час. После гель-фильтрации продуктов реакции через биогель Р-6 при pH 3, наряду с некоторым количеством низкомолекулярных продуктов автолиза, обнаружен высокомолекулярный белковый компонент, обладающий химотрипсиновой активностью. В этом белковом пике микроаналитическим методом (⁷) обнаружено $4,4 \pm 0,2$ моля фосфора на 1 моль белка, что соответствует двум расщепленным дисульфидным мостикам. Фермент с двумя расщепленными S—S-связями катализирует гидролиз этилового эфира N- α -ацетил-L-тирозина с каталитической константой, близкой по величине к константе для немодифицированного белка, K_m — константа Михаэлиса — отличается вдвое (табл. 1).

Молекула α -химотрипсина имеет молекулярный вес $\sim 25\,000$ (⁸), а цепи его — молекулярные веса 1200 (цепь А), 14 000 (цепь В) и 11 000 (цепь С). Эти цепи соединены между собой двумя дисульфидными связями, остальные три S—S-связи находятся внутри цепей (⁹). В случае расщепления S—S-связи между цепями В и С (цис-136 — цис-201) сохранение ферментативной активности должно обеспечиваться сохранением нативной конформации в районе активного центра за счет нековалентных взаимодействий. Для преодоления этих взаимодействий и разделения цепей необходимо применение денатурирующих агентов.

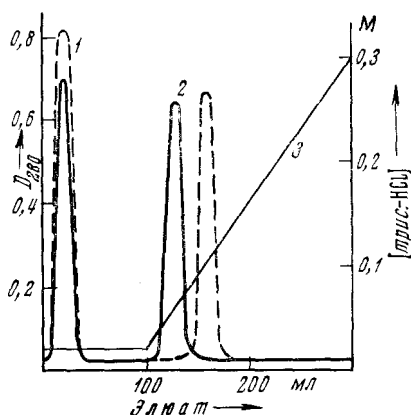


Рис. 1. Хроматографическое разделение цепей α -химотрипсина на ДЕАЕ-целлюлозе (Ватман ДЕ-32). Колонка 28×40 мм, pH 8,0; 8 M мочевины; градиент, 0,02—0,3 M трис-HCl. 1 — полностью восстановленный α -химотрипсин; 2 — α -химотрипсин с двумя расщепленными дисульфидными связями; 3 — градиент

Метод разделения цепей был разработан на препарате фермента, в котором расщеплены все S—S-мостики. С этой целью проводилась обработка α -химотрипсина тиофосфатом натрия в растворе, содержащем 8 мол. мочевины. Обработка велась в условиях максимального снижения автолиза, для чего добавление фермента к 8 М раствору мочевины в 0,1 М трис-HCl-буфере производили при pH 3. Через 20 мин. добавляли тиофосфат и проводили восстановление в обычных условиях. При этом ферментативная активность белка полностью исчезала. Выдерживание α -химотрипсина в аналогичных условиях без добавления тиофосфата приводило к падению ферментативной активности лишь на 8—10%. Низкомолекулярные продукты автолиза удалялись путем фильтрации через гель сефадекса Г-25, уравни-

Таблица 1

Гидролиз этилового эфира N- α -ацетил-L-тирозина нативным и модифицированным α -химотрипсинами*

Фермент	$k_{\text{кат}}, \text{сек}^{-1}$	$K_M, \text{М} \cdot 10^4$
Нативный α -химотрипсин	125 ± 3	$6,5 \pm 0,5$
α -Химотрипсин с двумя расщепленными S — S-связями	123 ± 3	$3,0 \pm 0,5$

*) W_{max} определяли на pH-стате («Radiometer», Дания) pH 7,0; 25°C; 0,1 М KCl; 0,05 М CaCl₂.

вешенный раствором мочевины в 0,01 М трис-HCl-буфере pH 8,0, высокомолекулярные продукты были разделены путем хроматографии на ДЭАЕ-целлюлозе (Ватман ДЕ-32) в присутствии 8 М раствора мочевины. Элюция проводилась 0,02 М трис-HCl-буфером pH 8,0; после выхода первого пика устанавливался линейный градиент ионной силы с помощью 0,3 М трис-HCl-буфера того же pH и также содержащего 8 мол. мочевины. Вторым пик вышел при значении градиента трис-HCl, равном 0,1 М (рис. 1).

Белковые пики идентифицировали на основании данных аминокислотного анализа. Особое внимание было уделено анализу на тирозин и фенилаланин, поскольку цепь С не содержит фенилаланина, а соотношение тирозин : фенилаланин в цепи В равно 1 : 3. Результаты специального анализа на эти аминокислоты представлены в табл. 2. Аминокислотный состав первого пика соответствует цепи С α -химотрипсина, однако наличие некоторого количества фенилаланина дает основание полагать, что в нем есть примесь цепи В (около 10%). Второй пик по аминокислотному составу хорошо соответствует цепи В.

Таблица

Результаты аминокислотного анализа на тирозин (Т) и фенилаланин (Ф) белковых пиков после хроматографии на ДЭАЕ-целлюлозе *

Фермент	I пик			II пик
	найдено	поправка** на примесь цепи В	остаток (цепь С)	найдено
Полностью восстановленный α -химотрипсин	0,8	0,8	0	5,9
	2,2	0,27	1,93	1,9
α -Химотрипсин с двумя расщепленными S — S-связями	0,7	0,7	0	6,0
	2,0	0,23	1,77	1,9

* Над чертой — Ф, под чертой — Т.

** Поправка рассчитана, исходя из отсутствия фенилаланина в цепи С и соотношения Ф : Т = 6 : 2 в цепи В, т. е. $T_{\text{цепь В}} = \Phi_{\text{цепь В}} \times 2/6$; $T_{\text{цепь С}} = T_{\text{найден}} - T_{\text{цепь В}}$.

Таблица 3

Результаты аминокислотного анализа белковых пиков, полученных после хроматографии на ДЭАЕ-целлюлозе α -химотрипсина с двумя расщепленными дисульфидными связями

Аминокислоты	I пик		Найдено остатков, расчет на фрагм. А + В	Фрагмент А + В, теория ⁽¹⁾	найденост., расчет на цепь В	цепь В, теория ⁽¹⁾
	найденостатков	цепь С, теория ⁽¹⁾				
Аспарагиновая кислота	9	9	13,4	13	8,0	13
Треонин	8,5	9	12,5	13	7,5	13
Серин	11	11	17,0	16	16	15
Глутаминовая кислота	4	4	12,5	10	10,5	9
Пролин	10	10	5,0	5	3	3
Глицин	10	10	16,0	14	12,3	12
Аланин	9	10	13,2	12	8,0	11
Валин	6,5	8	13,6	15	7,0	13
Изолейцин	2,5	3	7,0	7	4,3	6
Лейцин	7	8	10,5	11	4,3	9
Тирозин	1,8	2	1,3	2	0,7	2
Фенилаланин	0,1—0,3	0	5,5	6	3,3	6

Хроматографическое разделение цепей в случае модифицированного по двум S—S-связям α -химотрипсина проводилось следующим способом. Раствор фермента, обработанный тиофосфатом натрия в отсутствие мочевины, подкисляли до pH 3 и, поддерживая ту же величину pH, добавляли сухую навеску мочевины до 8 M содержания в растворе. Затем раствор доводили до pH 8,0 и подвергали гель-фильтрации на сефадексе Г-25 для отделения от продуктов автолиза (около 45%). В результате хроматографии на ДЭАЕ-целлюлозе восстановленного и сохранившего ферментативную активность белка было обнаружено два пика, ни один из которых не обладал ферментативной активностью. Судя по аминокислотному составу I пик представляет собой цепь С, II пик соответствует фрагменту α -химотрипсина, состоящему из цепей А — В (см. табл. 2, 3). Следовательно, можно считать, что разрыв межцепочечной связи дис-136 — дис-201 произошел во всех молекулах α -химотрипсина. Подтверждением этому служат результаты электрофореза в 12% полиакриламидном геле в условиях, предложенных в работе⁽¹⁰⁾, из которых видно, что ни полностью восстановленный в мочеине химотрипсин, ни белок, сохранивший активность после восстановления двух дисульфидных связей, не содержали исходного фермента.

Идентификация второй расщепленной дисульфидной связи затруднена. Это не связь между цепями А и В, что видно из результатов аминокислотного анализа второго пика (табл. 3). Вероятно, это не внутрицепочечная связь цепи В, поскольку в противном случае этот фрагмент после восстановления приобрел бы дополнительно два отрицательных заряда, прочнее связывался бы с ДЭАЕ-группами целлюлозы и позднее выходил бы из колонки. Кроме того, полуцистин-58 этого S—S-мостика находится в непосредственной близости к гистидину активного центра, и в случае его разрыва можно было ожидать более существенного изменения активности после восстановления. Связь дис-191 — дис-220 цепи С пространственно сближена с COO⁻-концом цепи В. Появление здесь двух отрицательных зарядов должно было бы вызвать расхождение цепей за счет электростатического отталкивания и исчезновения ферментативной активности, чего не наблюдается. Скорее всего, второй дисульфидной связью, расщепляемой без потери активности, является внутрицепочечная связь цепи С дис-168 — дис-182. Данные рентгеноструктурного анализа⁽¹¹⁾ указывают на то, что

она находится во внешней части молекулы, довольно далеко от активного центра.

Таким образом, из наших данных следует, что в молекуле фермента, состоящего из нескольких цепей, конформация активного центра может сохраняться даже после разрыва межцепочечной дисульфидной связи. Однако эта структура значительно менее стабильна как к протеолизу, так и к тепловой денатурации, что показано специальными экспериментами.

Московский государственный университет
им. М. В. Ломоносова

Поступило
26 VII 1971

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ F. P. Di Bella, I. E. Liener, J. Biol. Chem., **244**, 2824 (1969). ² E. Shapira, R. Arnon, J. Biol. Chem., **244**, 1026 (1969). ³ L. F. Kress, M. Laskowski, J. Biol. Chem., **242**, 4925 (1967). ⁴ И. В. Березин, Н. Ф. Казанская и др., Биохимия, **33**, 645 (1968). ⁵ H. Neumann, R. F. Goldberger, M. Sela, J. Biol. Chem., **239**, 1536 (1964). ⁶ H. Neumann, I. Z. Steinberg et al., Europ. J. Biochem., **3**, 171 (1967). ⁷ H. Taussky, E. Shorr, J. Biol. Chem., **202**, 675 (1953). ⁸ D. M. Brown, E. S. Hartley, Biochem. J., **89**, 59p (1963). ⁹ B. Keil, Z. Prusik, F. Sorm, Biochim. et biophys. acta, **78**, 559 (1963). ¹⁰ U. K. Lamley, Nature, **227**, 680 (1970). ¹¹ B. W. Matthews, P. B. Sigler et al., Nature, **214**, 652 (1967).