

В. В. МОСОЛОВ, Е. В. СОКОЛОВА

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ГЛИКОЛЕЙ И ГЛИЦЕРИНА С АКТИВНЫМ ЦЕНТРОМ ТРИПСИНА И ХИМОТРИПСИНА

(Представлено академиком А. С. Спириным 4 II 1972)

В предыдущей работе ⁽¹⁾ было показано, что этиленгликоль и глицерин способны тормозить процесс самопереваривания трипсина и химотрипсина. Оба растворителя в концентрациях ниже 20—30 об. % (т. е. в той концентрации, при которой наблюдается заметное снижение скорости автолиза) не вызывают заметных конформационных изменений у глобулярных белков, в том числе у трипсина, трипсиногена ⁽²⁾ и химотрипсиногена ⁽³⁾. В то же время известно, что активный центр химотрипсина и, вероятно, трипсина представляет собой гидрофобную полость, на поверхности которой располагаются функциональные группы ⁽⁴⁾. Так как глицерин и гликоли являются менее полярными веществами, чем вода ⁽⁵⁾, можно предположить, что молекулы растворителей способны избирательно связываться с активным центром фермента, в результате возможно нарушение нормального процесса связывания субстрата и как следствие этого снижение скорости реакций гидролиза субстрата или скорости самопереваривания фермента (в отсутствие субстрата).

Кристаллические трипсин и химотрипсин получали по методу Нортропа и др. ⁽⁶⁾. Содержание активного материала в препаратах (по реакции с *n*-нитрофенилацетатом ⁽⁷⁾) составляло 80% для химотрипсина и 50% для трипсина. Скорость реакции гидролиза БАЭЭ* («Reanal») и АТЭЭ («Koch-Light») определяли на автотитраторе («Radiometer ТТТ-1с»). Препараты глицерина («чистый» Харьковского завода) и этиленгликоля («чистый для анализа» «VEB Laborchemie», ГДР) использовали без дальнейшей очистки. Использовали также полиэтиленгликоль (Carbowax 300, «T. Schuchardt», ФРГ).

В ячейку автотитратора вносили 0,5 мл водного раствора субстрата **, 1,0 мл 0,05 *M* трис-HCl-буфера pH 8,0, содержащего CaCl₂ и NaCl (соответственно 0,2 и 0,4 *M*) и воду до конечного объема 9,0 мл. После термостатирования при 25° вносили 1,0 мл водного раствора трипсина (100 мкг/мл) или химотрипсина (20 мкг/мл). Дифференциальные спектры снимали на спектрофотометре СФ-4.

Оба растворителя уже в концентрации 5 об. % вызывают значительное снижение скорости гидролиза АТЭЭ химотрипсином (рис. 1). Как видно из рисунка, торможение имеет конкурентный характер и связано с увеличением эффективной константы Михаэлиса (K_m) при неизменной величине максимальной скорости реакции. Значения ингибиторной константы (K_i) для этиленгликоля и глицерина равны 0,45 и 0,67 *M*.

Несмотря на то, что АТЭЭ не содержит основной группы в боковой цепи, соединение гидролизует трипсином со значительной скоростью ⁽⁸⁾. Как показали проведенные исследования, реакция гидролиза АТЭЭ трипсином конкурентно угнетается этиленгликолем (табл. 1).

* Принятые сокращения: БАЭЭ — этиловый эфир α -бензоил-*L*-аргинина, АТЭЭ — этиловый эфир *N*-ацетил-*L*-тирозина.

** АТЭЭ ввиду плохой растворимости в воде предварительно растворяли в диоксане. Конечная концентрация диоксана в ячейке 5%.

В отличие от этого, кинетика гидролиза БАЭЭ трипсином не изменялась в присутствии глицерина вплоть до его концентрации 50 об.%. Вероятная причина различного влияния растворителей на реакцию триптического гидролиза АТЭЭ и БАЭЭ заключается в различном характере связывания субстратов с активным центром фермента. Если связывание АТЭЭ с трипсином идет главным образом за счет гидрофобных взаимодействий, то в связывании БАЭЭ дополнительно участвуют электростатические взаимодействия между остатком аспарагиновой кислоты (Асп 177)⁽⁹⁾, расположенным в районе активного центра фермента, и положительно заряженной гуанидиновой группой субстрата. Высокая прочность связывания БАЭЭ с областью активного центра трипсина (K_M на 2—3 порядка ниже, чем для трипсина с АТЭЭ), очевидно, и является причиной того, что в этом случае не удается наблюдать конкуренции субстрата с глицерином. Действительно, в случае химотрипсина, в молекуле которого вместо остатка аспарагиновой кислоты в соответствующем положении находится остаток серина⁽⁴⁾, и, следовательно, связывание БАЭЭ, так же как и АТЭЭ, осуществляется главным образом в результате гидрофобных взаимодействий, гидролиз обоих субстратов тормозится этиленгликолем в одинаковой степени (табл. 1).

С целью получения дальнейших подтверждений способности глицерина и этиленгликоля взаимодействовать с активным центром ферментов проводились опыты по изучению влияния растворителей на реакцию трипсина и химотрипсина с ингибиторами, специфически связывающимися с областью активного центра.

На рис. 2 показано влияние глицерина и этиленгликоля на реакцию инактивации трипсина и химотрипсина в присутствии диизопропилфторфосфата (ДФФ). В то время как в водном растворе активность трипсина снижалась за 2 часа на 65%, в присутствии 20% глицерина активность снижалась за то же время всего на 24%.

К числу наиболее эффективных конкурентных ингибиторов трипсина и химотрипсина относятся профлавин (3,6-диаминоакридин)⁽¹⁰⁾ и тионин (3,6-диаминофенотиазин)⁽¹¹⁾. В отношении обоих соединений имеются веские доказательства, подтверждающие их способность избирательно связываться с активными центрами ферментов⁽¹¹⁻¹³⁾. Взаимодействие ингибиторов с активным центром сопровождается характерными изменениями их спектров (сдвиг в длинноволновую область). Вытеснение профлавина и тионина из соединения с ферментом, например, при помощи специфических субстратов или других конкурентных ингибиторов сопровождается нормализацией их спектральных характеристик. Таким образом, по характеру и величине спектральных изменений, наблюдающихся при добавлении исследуемого соединения к смеси, содержащей химотрипсин и профлавин или трипсин и тионин, можно судить о способности данного соединения взаимодействовать с активным центром фермента. Способность профлавина вытесняться из области активного центра химотрипсина в присутствии различных конкурентных ингибиторов была использована Березиным с сотрудниками⁽¹⁴⁾ для разработки чувствительного метода определения величины K_i .

Из данных, приведенных на рис. 3, видно, что, этиленгликоль и глицерин вызывают такие же изменения спектров соединения трипсин — тионин, как и субстрат амид *N*-бензоил-*L*-аргинина. На рис. 4 приведены данные, подтверждающие факт вытеснения профлавина из области активного центра химотрипсина в присутствии глицерина, этиленгликоля и высокоэффективного конкурентного ингибитора фермента — α -нафтиламина⁽¹⁰⁾.

Существенный интерес представляет то обстоятельство, что полиэтиленгликоль с молекулярным весом 300 в одинаковой молярной концентрации оказался намного эффективнее этиленгликоля в реакции вытеснения тионина из области активного центра трипсина (рис. 3).

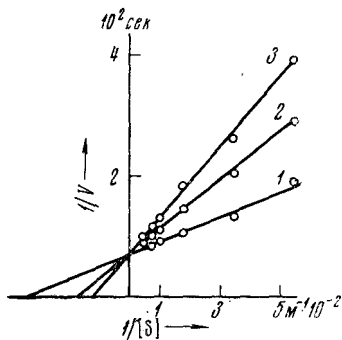


Рис. 1

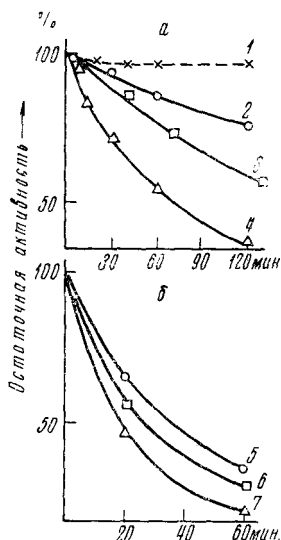


Рис. 2

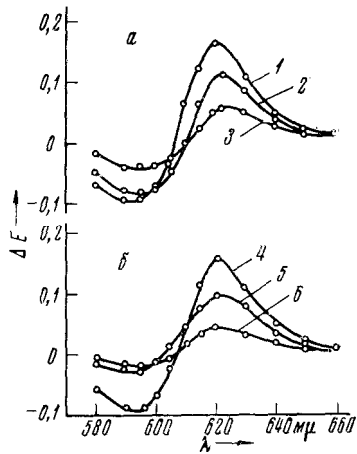


Рис. 3

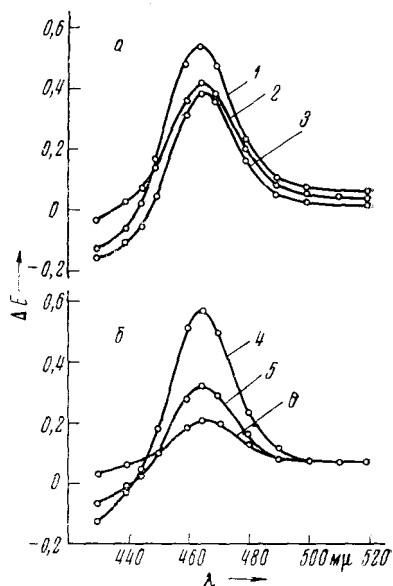


Рис. 4

Рис. 1. Влияние глицерина на эстеразную активность химотрипсина (субстрат АТЭЭ). 1 — без глицерина, 2 и 3 — концентрация глицерина соответственно 5 и 10 об. %

Рис. 2. Угнетение активности трипсина (а) и химотрипсина (б) ДФФ. Фермент инкубировали с ДФФ (1 : 100) в 0,05 М трис-НСl-буфере рН 7,8 при 25°, в отобранных пробах определяли эстеразную активность. 1 — трипсин без ДФФ; 4, 7 — ферменты с ДФФ в водном растворе; 2, 5 — те же в 20% глицерине; 3, 6 — в 10% этиленгликоле

Рис. 3. Спектры тионина в присутствии трипсина. 1 и 4 — спектр, измеренный против свободного тионина; опытная кювета содержит трипсин ($3,2 \cdot 10^{-5}$ М) и тионин ($1 \cdot 10^{-5}$ М) в 0,1 М трис-НСl-буфере рН 7,8 (содержит 0,05 М CaCl_2), контрольная — тионин в том же буфере; 2 — то же, но контроль и опыт содержат дополнительно 20% этиленгликоля; 3 — то же с 20% глицерина; 5 — опытная и контрольная кюветы, наряду с трипсином и тионином, содержат амид бензил-L-аргинина (0,01 М); 6 — то же с концентрацией субстрата 0,03 М

Рис. 4. Спектры профлавина в присутствии химотрипсина. 1, 4 — спектр, измеренный против свободного профлавина; опытная кювета содержит химотрипсин ($1 \cdot 10^{-4}$ М) и профлавин ($4 \cdot 10^{-5}$ М) в 0,1 М трис-НСl-буфере рН 7,8, контрольная — профлавин ($4 \cdot 10^{-5}$ М) в том же буфере; 2 — то же, но контроль и опыт содержат 20% глицерина; 3 — то же с 20% этиленгликоля; 5 — опытная и контрольная кюветы, наряду с ферментом и профлавином содержат конкурентный ингибитор α-нафтиламин ($1 \cdot 10^{-3}$ М); 6 — то же с концентрацией ингибитора $4 \cdot 10^{-3}$ М

Вся сумма полученных экспериментальных данных: конкурентное угнетение эстеразной активности, защита от инактивации ДФФ и, наконец, способность вытеснять конкурентные ингибиторы профлавина и тионин из их соединения с химотрипсином и трипсином — согласуется с представлением о том, что глицерин и гликоли способны взаимодействовать непосредственно с областью активного центра ферментов.

Таблица 1

Влияние растворителей на гидролиз БАЭЭ и АТЭЭ трипсином и химотрипсином

Фермент	Субстрат	Состав раствора	K'_M , мол/л	K_i , мол/л
Химотрипсин	АТЭЭ	Вода	0,0027	—
	»	Этиленгликоль, 5%	0,0076	0,45
	»	Этиленгликоль, 10%	0,0131	0,45
	»	Глицерин, 5%	0,0055	0,67
	»	Глицерин, 10%	0,0078	0,67
	БАЭЭ	Вода	0,0083	—
Трипсин	»	Этиленгликоль, 5%	0,0209	0,58
	АТЭЭ	Вода	0,0138	—
	»	Этиленгликоль, 5%	0,0285	0,9

На этом основании можно высказать предположение, что причиной отмеченного ранее ⁽¹⁾ торможения автолиза трипсина и химотрипсина в присутствии гликолей и глицерина является конкуренция между молекулами растворителей и белковыми молекулами за активный центр фермента.

Институт биохимии им. А. Н. Баха
Академии наук СССР
Москва

Поступило
3 II 1972

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Е. В. Соколова, В. В. Мосолов, Прикл. биохим. и микробиол., 6, 683, 1970. ² T. T. Herskovits, G. B. Villanueva, Arch. Biochem. and Biophys., 131, 321 (1969). ³ T. T. Herskovits, B. Gadegebeku, H. Jaillet, J. Biol. Chem., 245, 2588 (1970). ⁴ T. A. Steitz, R. Henderson, D. M. Blow, J. Mol. Biol., 46, 337 (1969). ⁵ S. J. Singer, Advances Protein Chem., 17, 1 (1962). ⁶ Д. Нор-троп, М. Кунитц, Р. Херриотт, Кристаллические ферменты, ИЛ, 1950. ⁷ M. L. Bender et al., J. Am. Chem. Soc., 88, 5890 (1966). ⁸ T. Inagami, J. M. Sturtevant, J. Biol. Chem., 235, 1019 (1960). ⁹ A. Eyl, T. Inagami, Biochem. Biophys. Res. Commun., 38, 149 (1970). ¹⁰ R. A. Wallace, A. N. Kurtz, C. Niemann, Biochemistry, 2, 824 (1961). ¹¹ A. N. Glazer, J. Biol. Chem., 242, 3326 (1967). ¹² S. A. Bernhard, B. F. Lee, Z. H. Tashjian, J. Mol. Biol., 18, 405 (1966). ¹³ A. N. Glazer, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 54, 171 (1965). ¹⁴ И. В. Березин, А. В. Левашов, К. Мартинек, ДАН, 177, 224, 1967.