

Член-корреспондент АН СССР И. В. БЕРЕЗИН, Н. Ф. КАЗАНСКАЯ,  
Р. Б. АЙСИНА

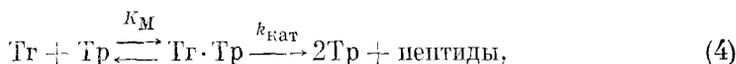
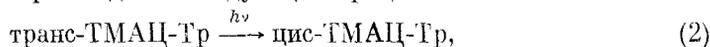
### СВЕТОЧУВСТВИТЕЛЬНАЯ ФЕРМЕНТАТИВНАЯ СИСТЕМА С СОПРЯЖЕННОЙ АВТОАКТИВАЦИЕЙ

Фотохимические процессы с высокими квантовыми выходами можно рассматривать как своеобразные системы усиления первичного светового сигнала. Особый интерес представляют системы со светозарождаемыми катализаторами, так как в таких системах общий квантовый выход является функцией квантового выхода первичного процесса и скорости последующей каталитической реакции (<sup>1</sup>, <sup>2</sup>):

$$\Phi_{эфф} = \Phi_{перв} k_{кат} t. \quad (1)$$

В ряде последних работ нашей лаборатории было показано, что фермент  $\alpha$ -химотрипсин (высокоэффективный природный катализатор гидролиза сложных эфиров и амидов) может быть превращен в фоточувствительный каталитически неактивный предшественник, который под действием света с хорошим квантовым выходом может регенерировать исходный  $\alpha$ -химотрипсин (<sup>1-5</sup>).

«Коэффициент химического усиления» первичного светового сигнала в подобных системах может быть существенно увеличен за счет сопряженной реакции «размножения» первично зарождаемого катализатора. В ферментативных системах в качестве сопряженного процесса может быть использована реакция активации подходящего природного или искусственного зимогена, в результате чего за первичной световой активацией возникает темновой процесс автоактивации, приводящий к образованию высоких концентраций фермента. Трипсиноген (Тр) с добавленным к нему транс-(N,N,N-триметиламино)-циннамоил-трипсином (транс-ТМАЦ-Тр) является примером системы такого рода. При облучении этой системы у.-ф. светом наблюдается прохождение следующих процессов:



где  $k_3$  — константа скорости реакции деацилирования цис-ТМАЦ-Тр,  $K_M$  — константа Михаэлиса автоактивации трипсиногена,  $k_{кат}$  — константа скорости образования трипсина в реакции автоактивации.

Результатом этой серии реакций является накопление в системе каталитически активного трипсина.

Транс-(N,N,N-триметиламино)-циннамоил-трипсин был получен реакцией трипсина с избытком *n*-нитрофенилового эфира *n'*-транс-(N,N,N-триметиламино)-коричной кислоты при pH 8,0 (0,05 M CaCl<sub>2</sub>, 20°) в ячейке pH-стата. Примесь трипсина (3–4%) в заводском препарате трипсиногена была последовательно инактивирована избытком диизопропилфторфосфата и *n*-нитрофенилового эфира *n'*-гуанидинбензойной кислоты в тех же условиях. Содержание свободного трипсина в ацилтрипсине и трипсиногене после гельфильтрации низкомолекулярных реагентов на сефадексе Г-25 (HCl pH 3,0 и 0°) и лиофилизации составляло 2–3 и 0,02% соответственно.

Источником у.-ф. света служила лампа ДРШ-500 с применением свето-фильтра УФС-2 (290–360 мμ). При облучении у.-ф. светом раствора транс-ацилтрипсина в 0,05 M CaCl<sub>2</sub> (рН 5,0, 20°) происходит его транс-цис изомеризация. Константы скорости деацилирования для соответствующих стереоизомеров равны  $k_{3 \text{ цис}} = (6,7 \pm 0,7) \cdot 10^{-4} \text{ сек}^{-1}$  и  $k_{3 \text{ транс}} = (6,3 \pm 0,9) \cdot 10^{-5} \text{ сек}^{-1}$  (рН 8,0, 0,1 M трис-НСl буфер, содержащий 0,05 M CaCl<sub>2</sub>, 20°).

За реакцией накопления трипсина в системе следили путем отбора проб, разбавленным аликвотной части раствора в 1 ммолье HCl, при 0° и

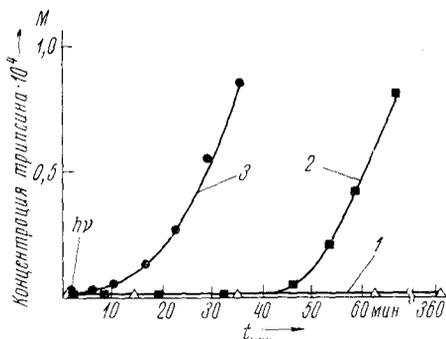


Рис. 1

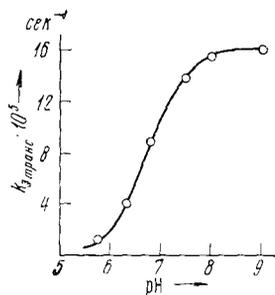


Рис. 2

Рис. 1. Автоактивация трипсиногена в присутствии транс-ТМАЦ-Тр. 2 — автоактивация Тг в темноте, 3 — активация после 5 мин. облучения у.-ф. светом, 1 — инкубирование Тг в отсутствие транс-ТМАЦ-Тр после 5 мин. облучения. Условия: [Тг] =  $2 \cdot 10^{-4}$  мол/л; [транс-ТМАЦ-Тр] =  $4 \cdot 10^{-5}$  мол/л; рН 8,0, 0,1 M трис-НСl буфер, 0,05 M CaCl<sub>2</sub>, 20°

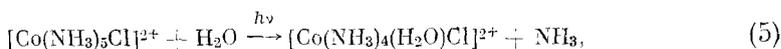
Рис. 2. Зависимость константы скорости деацилирования транс-ТМАЦ-Тр от рН. Условия: [транс-ТМАЦ-Тр] =  $8 \cdot 10^{-5}$  мол/л; [бензамидин] =  $6 \cdot 10^{-3}$  мол/л; 0,1 M трис-НСl буфер, 0,05 M CaCl<sub>2</sub>, 20°

измерением триптической активности по скорости гидролиза этилового эфира *N*-α-бензил-*L*-аргинина (6) на рН-стате.

На рис. 1 приведены кривые, представляющие накопление трипсина в растворах трипсиноген — транс-ТМАЦ-Тр за счет автокаталитической реакции в отсутствие света (кривая 2) и после освещения (кривая 3). Облучение раствора трипсиноген-ацилтрипсина проводили в HCl рН 3,0, 20° и затем добавившем концентрированного буфера переводили раствор в условия максимума скорости автоактивации зимогена (0,1 M трис-НСl буфер, рН 8,0, 0,05 M CaCl<sub>2</sub>, 20°). Таким образом, начало автокаталитического процесса (4) можно существенно ускорить с помощью света, введя в систему светочувствительный неактивный катализатор. Однако из-за наличия в ацилтрипсине свободного трипсина (~3%) и заметной константы деацилирования транс-ТМАЦ-Тр в условиях опыта (рН 8,0, 20°) эта система непригодна для практического применения вследствие наступающей со временем самопроизвольной темповой активации зимогена (рис. 1, кривая 2).

Свести к минимуму темповой процесс активации удалось путем создания более стабильной светочувствительной системы, которая помимо транс-цис изомеризации ацилтрипсина под действием света включает одновременно фотоиндуцированный рН-скачок. Как указывалось в работе (2), фотоиндуцированное увеличение или уменьшение рН среды может служить средством фоторегулирования ферментативных процессов. Для фотоиндуцированного увеличения рН среды можно применять комплексные соли переходных металлов, содержащих в качестве лигандов аммиак. Мы воспользовались хлороцентаминокобальто-(III)-хлоридом

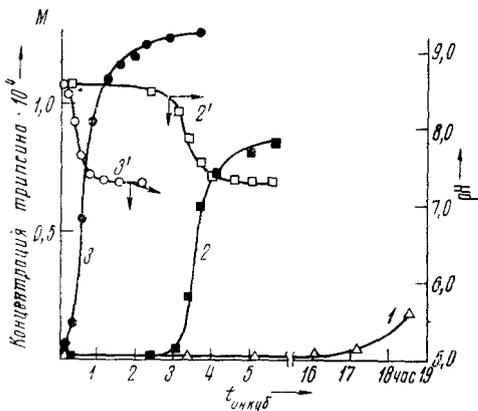
$[\text{Co}(\text{NH}_3)_5\text{Cl}]\text{Cl}_2$ , который под действием света подвергается фотоаквации с выделением аммиака:



В результате протекания процессов (5) и (6) возрастает pH среды. Квантовый выход этого процесса  $\varphi_{\text{ак}} = 0,05$  (кислая среда,  $25^\circ$ ,  $\lambda = 370$  мμ) (7). Как было обнаружено нами,  $\varphi_{\text{ак}}$  увеличивается с ростом pH среды, что, по-видимому, связано с изменением устойчивости промежуточного комплекса.

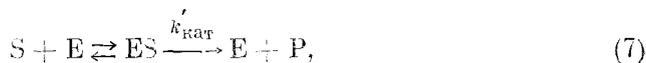
Квантовый выход транс-цис изомеризации, определенный нами по начальному линейному участку изменения дифференциального спектра облученных растворов ацилтрипсина против необлученного, равен  $\sim 0,1$  (рН

Рис. 3. Фотоиницирование автоактивации трипсиногена в присутствии транс-ТМАЦ-Тр и  $[\text{Co}(\text{NH}_3)_5\text{Cl}]^{2+}$ . 1 — инкубация Тг в присутствии транс-ТМАЦ-Тр и  $[\text{Co}(\text{NH}_3)_5\text{Cl}]^{2+}$  при рН 5,0 в темноте; 2 — активация Тг в присутствии  $[\text{Co}(\text{NH}_3)_5\text{Cl}]^{2+}$  после у.-ф. облучения (5 мин.) в отсутствие транс-ТМАЦ-Тр; 3 — активация Тг в присутствии транс-ТМАЦ-Тр и  $[\text{Co}(\text{NH}_3)_5\text{Cl}]^{2+}$  после у.-ф. облучения (5 мин.); 2' и 3' — изменение рН среды для активационных кривых 2 и 3 соответственно. Условия:  $[\text{Tg}] = 4 \cdot 10^{-4}$  мол/л;  $[\text{транс-ТМАЦ-Тр}] = 4 \cdot 10^{-5}$  мол/л;  $[\text{Co}(\text{NH}_3)_5\text{Cl}]^{2+} = 5 \cdot 10^{-3}$  мол/л; 0,05 M CaCl<sub>2</sub>, рН всех растворов до у.-ф. облучения равен 5,0



3,0, 0,05 M CaCl<sub>2</sub>,  $20^\circ$ ,  $\lambda = 313$  мμ). Зависимость константы скорости деацилирования транс-ТМАЦ-Тр от рН среды (0,01 M трис-НСl буфер, 0,05 M CaCl<sub>2</sub>,  $20^\circ$ , 0,06 M бензамидин) в присутствии бензамидина (для исключения автолиза) свидетельствует о том, что ацилтрипсин практически стабилен в течение длительного времени в области рН 5,0 и ниже (рис. 2). Из данных (8) известно, что рН-зависимость  $k_{\text{кат}}$  автоактивации трипсиногена имеет аналогичный профиль.

Исходя из анализа всех данных, были выбраны условия, обеспечивающие темновую стабильность светочувствительной ферментной системы: рН 5,0, 0,05 M CaCl<sub>2</sub>,  $4 \cdot 10^{-4}$  M трипсиноген,  $4 \cdot 10^{-5}$  M транс-ТМАЦ-Тр и  $5 \cdot 10^{-3}$  M  $[\text{Co}(\text{NH}_3)_5\text{Cl}]^{2+}$ . При начальном значении рН 5,0 система стабильна около суток (рис. 3, кривая 1). При освещении у.-ф. светом раствора происходят одновременно рН-скачок (от 5,0 до 8,6) и транс-цис изомеризация, в результате чего начинается немедленный процесс автокаталитической активации трипсиногена, а следовательно, и накопление активного фермента (рис. 3, 2), который может далее вест к каталитическое превращение субстрата:



где  $k'_{\text{кат}}$  — константа скорости каталитического процесса.

Кривая 2 на рис. 3 отражает процесс автоактивации трипсиногена, инициированный только рН-скачком в отсутствие ацилфермента. Значение рН раствора медленно падает во время активации вследствие расхода ионов гидроксила (рис. 3, кривые 2' и 3' для активационных кривых 2 и 3 соответственно).

Наблюдаемое различие темнового и светового процессов делает возможным применение подобных светочувствительных ферментных систем для

прикладных целей. Важно отметить, что система может быть значительно усовершенствована путем применения других ацилирующих светочувствительных инактиваторов трипсина, а также комплексных солей переходных металлов с большими  $F_{aq}$ .

Московский государственный университет  
им. М. В. Ломоносова

Поступило  
10 IV 1972

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> S. D. Varfolomeyev, A. M. Klivanov et al., FEBS Letters, 15, 118 (1974). <sup>2</sup> С. Д. Варфоломеев, К. Мартинек, И. В. Березин, Сборн. тр. научн. конфер. Межфакультетской лаборатории биоорганической химии МГУ, 1970, стр. 289. <sup>3</sup> И. В. Березин, С. Д. Варфоломеев, К. Мартинек, ДАН, 193, 932 (1970). <sup>4</sup> K. Martinek, S. D. Varfolomeyev, I. V. Berezin, Europ. J. Biochem., 49, 242 (1971). <sup>5</sup> I. V. Berezin, S. D. Varfolomeyev, K. Martinek, FEBS Letters, 8, 173 (1970). <sup>6</sup> G. W. Shwert, Y. Takenaka, Biochim. et biophys. acta, 16, 570 (1955). <sup>7</sup> A. W. Adamson, A. H. Sporer, J. Am. Chem. Soc., 80, 3865 (1958). <sup>8</sup> J. P. Abita, M. Delaage, M. Lazdunski, Europ. J. Biochem., 8, 314 (1969).