

УДК 541.12.031+541.128+541.182.644+577.15.03 ФИЗИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

Член-корреспондент АН СССР И. В. БЕРЕЗИН,  
А. М. КЛИБАНОВ, В. С. ГОЛЬДМАХЕР, К. МАРТИНЕК

**МЕХАНОХИМИЯ КАТАЛИТИЧЕСКИХ СИСТЕМ.  
РЕГУЛИРОВАНИЕ МЕХАНИЧЕСКИМ ВОЗДЕЙСТВИЕМ  
ФЕРМЕНТАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ ТРИПСИНА,  
ИММОБИЛИЗОВАННОГО В ПОЛИАКРИЛАМИДНОМ ГЕЛЕ**

Механохимия — это наука об инициировании или ускорении химических реакций под воздействием упругой энергии (<sup>1</sup>). В последнее время исследования в этой области интенсивно развиваются (<sup>2</sup>). На наш взгляд, особый практический и теоретический интерес представляет изучение механохимии каталитических и, в частности, ферментативных систем. Это объясняется тем, что, во-первых, такие системы, обладающие ярко выраженным функциональным ответом на механическое воздействие (изменение каталитической активности), могут быть использованы в качестве чувствительных химических усилителей механических сигналов. Во-вторых, следует учесть, что многие важные процессы в живой природе являются механохимическими ферментативными процессами (например, мышечное сокращение или движение простейших микроорганизмов и клеточных структур). Именно поэтому создание и исследование модельных систем подобного рода могло бы пролить свет на механизмы, действующие *in vivo*.

В живых системах большинство ферментативных процессов (включая механохимические) протекает в мембранных, гелеподобных средах (<sup>3</sup>). Учитывая это обстоятельство, мы поставили задачу выяснить, можно ли регулировать механическим воздействием каталитическую активность ферментов, включенных (иммобилизованных) в гелевую матрицу.

Нами было изучено влияние полиакриламидного геля (<sup>4</sup>) на кинетику хорошо известной ферментативной реакции, какой является автолиз протеолитического фермента трипсина (т. е. бимолекулярное саморасщепление фермента) (<sup>5</sup>).

Зависимость константы скорости автолиза трипсина от концентрации полиакриламидного геля. На рис. 1 видно, что скорость исследуемого ферментативного процесса, протекающего в геле, будучи несколько меньше, чем в воде (где константа скорости второго порядка равна  $290 \text{ M}^{-1} \cdot \text{сек}^{-1}$ ), увеличивается с повышением концентрации геля от 10 до 39%. Это явление можно объяснить тем, что с увеличением концентрации геля уменьшается концентрация незаполимеризованного мономера (ингибитора ферментативной реакции) и так же ослабляется ингибирующее действие полимерных цепей, вследствие их ужесточения.

Значительно больший интерес представляет другой факт, а именно, что дальнейшее повышение концентрации геля (выше 39%) приводит к резкому падению скорости реакции практически до нуля. Эффект торможения имеет при этом почти пороговый характер: при увеличении концентрации геля всего лишь на 0,5% константа скорости автолиза уменьшается в ~50 раз. Столь резкое влияние концентрации геля на исследуемый процесс не может быть объяснено причинами денатурационного характера. На это указывает тот факт, что скорость реакции трипси-

на с низкомолекулярным субстратом *n*-нитрофенилацетатом слабо зависит от концентрации геля в диапазоне 20–55% (рис. 2). Объяснение открытому нами явлению следует искать, по-видимому, в рамках общей теории влияния диффузии на кинетику химических реакций<sup>(6)</sup>. Можно полагать, что при концентрациях полиакриламидного геля выше 39% процесс белок-белкового взаимодействия переходит из кинетической области в диффузионную. Это согласуется с тем экспериментальным фактом, что набухание

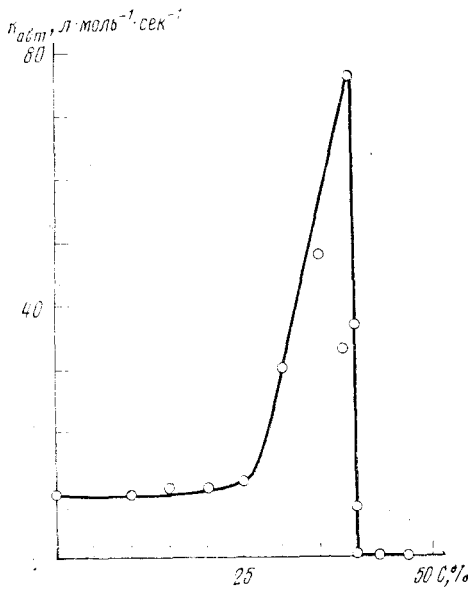


Рис. 1

Рис. 1. Зависимость константы скорости протекающего в полиакриламидном геле автолиза трипсина  $k_{кат}$  от концентрации геля. Условия опыта: 45° С, начальная концентрация трипсина  $2 \cdot 10^{-5}$  М, рН 7,8 (0,01 М трис-НСl)

Рис. 2. Зависимость начальной скорости протекающей в полиакриламидном геле реакции трипсина с *n*-нитрофенилацетатом  $v$  от концентрации геля. Условия опыта: начальная концентрация *n*-нитрофенилацетата  $3 \cdot 10^{-5}$  М, начальная концентрация трипсина  $2 \cdot 10^{-5}$  М, рН 7,0 (0,01 М трис-НСl), 23° С

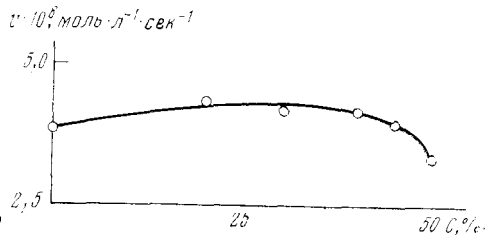


Рис. 2

в воде концентрированного геля (где реакция автолиза практически не идет) приводит к повышению константы скорости автолиза до уровня, характеризующего этот ферментативный процесс в водном растворе. Очевидно, при набухании геля снимаются диффузионные затруднения для белок-белкового взаимодействия и поэтому реакция автолиза возвращается из диффузионной области в кинетическую.

Влияние механической деформации гелевой матрицы на константу скорости автолиза трипсина в геле. Нами обнаружено, что константу скорости автолиза трипсина можно значительно увеличить при механической деформации достаточно плотной матрицы, полученной при концентрации геля выше 39% (деформация менее концентрированного геля не приводит к изменению скорости ферментативной реакции). Так, в 39,8% геле константа скорости автолиза трипсина равна  $2 \text{ М}^{-1} \cdot \text{сек}^{-1}$ , как это следует из данных на рис. 3. Механическое сжатие такого геля (относительная степень деформации 20%) приводит к возрастанию константы скорости автолиза до  $32 \text{ М}^{-1} \cdot \text{сек}^{-1}$ , т. е. в 16 раз. При снятии деформации величина константы скорости автолиза принимает исходное низкое значение (рис. 3). Процедуру сжали — сняли нагрузку можно повторять многократно, не нарушив обратимости эффекта увеличение — уменьшение константы скорости ферментативной реакции. Следовательно, посредством механического воздействия можно обратимо менять каталитическую активность трипсина (в реакции автолиза), включенного в полиакриламидный гель.

Этот результат можно объяснить в рамках следующей модели диффузии белков в полиакриламидном геле. Будем полагать согласно<sup>(7)</sup>, что при достаточно больших концентрациях геля (когда размер пор становится

близким к размеру диффундирующего белка) коэффициент диффузии зависит не от среднего размера пор (как в геле малой концентрации), а он определяется количеством пор, размер которых больше критического (в первом приближении — больше эффективного диаметра белковой глобулы).

Представим себе, что в исходном состоянии (до сжатия) молекула белка включена в некоторую элементарную ячейку пространственной решетки полимерного геля (схематически изображенную кубиком на рис. 4а), которая из-за слишком малого размера граней практически не допускает диффузии, т. е. выхода из нее, белковой молекулы. Если теперь перпендикулярно верхней грани кубика приложить давление, то получится параллелепипед, изображенный на рис. 4б. Объемы этих двух фигур неизбежно равны, поскольку гель, так же как и вода, практически несжимаем. Это означает, что уменьшение боковых граней элементарной ячейки, вызванное сжатием, должно сопровождаться увеличением верхней и нижней граней. Последнее обстоятельство имеет, по-видимому, важное значение для скорости диффузии, так как в результате такого механического сжатия геля может увеличиться число пор, размер которых больше критической величины. В итоге приходим к выводу, что в рамках представленной модели, механическое сжатие геля в принципе может облегчить диффузию и тем самым привести к увеличению скорости белок-белкового взаимодействия, наблюдаемому на опыте (рис. 3).

Нами было показано, что регулирование каталитической активности включенного в полиакриламидный гель трипсина можно осуществлять не-

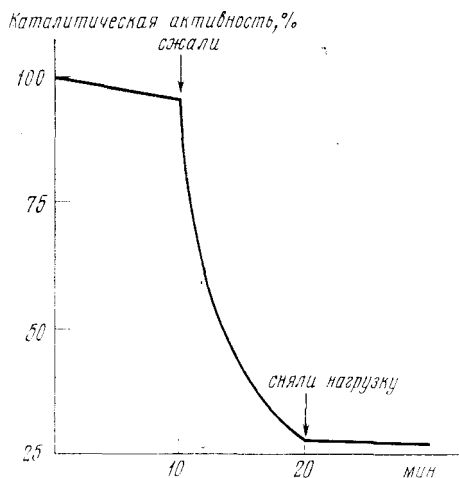


Рис. 3. Кинетическая кривая каталитической активности — время для включенного в полиакриламидный гель трипсина. Через 10 мин. после начала реакции автолиза блок геля, содержащего трипсин, сжали между двумя параллельными стеклами на 20%, а еще через 10 мин. нагрузку сняли. Условия опыта те же, что на рис. 1.

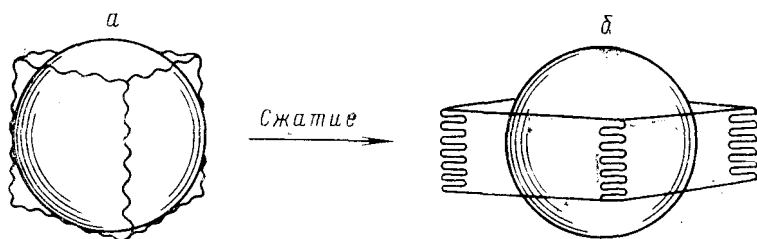


Рис. 4. Схематическое изображение элементарной ячейки полиакриламидного геля с включенной в нее молекулой фермента до сжатия (а) и после сжатия (б)

только сжатием, но и посредством других видов механической деформации полимерной матрицы. Так, если цилиндр геля, содержащего трипсин, изогнуть, то автолиз фермента, находящегося в области осевой линии цилиндра (где, очевидно, деформации элементарных ячеек сетки геля не происходит), протекает с той же скоростью, что в недеформированном геле, в то время как автолиз трипсина на внешней стороне полученной из цилиндра геля дуги ускоряется в 3 раза.

В заключение отметим, что предложенный в данной работе диффузионный механизм регуляции скорости белок-белкового взаимодействия, возможно, функционирует и в живых системах, а именно в некоторых ферментативных процессах, протекающих в мембранах с упорядоченной гелеподобной структурой (механизм слуха?). Так, следует ожидать, что при различного рода механических деформациях мембраны, ее структура может изменяться от конформации со свободной диффузией для ферментов до конформации с диффузионными затруднениями (или наоборот). Как было показано в настоящем сообщении, это может оказать существенное влияние на каталитические свойства иммобилизованных в мембране ферментов.

Кроме того, открытое нами явление открывает широкие возможности для исследования структуры полимерных гелей. Например, уже сам факт чрезвычайно резкого падения константы скорости автолиза трипсина при концентрациях геля выше 39% указывает на то, что элементарные ячейки полиакриламидного геля, контролирующей диффузию, удивительно однородны по размерам. С другой стороны, исследования механохимических систем, подобных описанной выше, также могут дать информацию о том, какие изменения в микрогеометрии элементарных ячеек полимерных гелей вызывает механическая деформация макрогеометрии блоков гелей.

Московский государственный университет  
им. М. В. Ломоносова

Поступило  
5 V 1974

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> П. Ю. Буягин, Усп. хим., т. 40, 1935 (1971). <sup>2</sup> Н. К. Барамбойм, Механохимия высокомолекулярных соединений, М., 1971. <sup>3</sup> Biological Structure and Function, T. W. Goodwin, O. Lindberg, Ed., N. Y., 1961. <sup>4</sup> Г. Маурер, Диск-электрофорез, т. 1, М., 1971. <sup>5</sup> Д. Портер, М. Кунитц, Р. Херриотт, Кристаллические ферменты, т. 6, М., 1950. <sup>6</sup> R. M. Noyes, In: Progress in Reaction Kinetics, v. 1. London, 1961, p. 129. <sup>7</sup> M. P. Tombs, Anal. Biochem., v. 13, 121 (1965).