

А. М. КЛИБАНОВ, Г. П. САМОХИН, К. МАРТИНЕК,  
член-корреспондент АН СССР И. В. БЕРЕЗИН

## МЕХАНОХИМИЯ КАТАЛИТИЧЕСКИХ СИСТЕМ

### РЕГУЛИРОВАНИЕ МЕХАНИЧЕСКИМ ВОЗДЕЙСТВИЕМ ФЕРМЕНТАТИВНЫХ СВОЙСТВ $\alpha$ -ХИМОТРИПСИНА, ХИМИЧЕСКИ ПРИСОЕДИНЕННОГО К КАПРОНОВОЙ НИТИ

Механохимические процессы играют в живой природе важнейшую роль. Это следует уже из простого перечисления таких процессов: мышечное сокращение, функционирование элементарных двигательных структур (жгутиков бактерий и сперматозоидов, ресничек одноклеточных организмов, веретена митотического аппарата, хвостового отростка бактериофага), движение протоплазмы. Механохимическими являются также процессы восприятия, протекающие в механорецепторах животных: слуховое восприятие, осязание, гравитационное восприятие и т. д.

Действие большинства механохимических систем *in vivo* неразрывно связано с присутствием в них белков, обладающих ферментативной (чаще всего АТФазной) активностью (1). Согласно некоторым теориям природных механохимических процессов, в частности мышечного сокращения (2) или слухового восприятия (3), необходимое звено таких процессов — изменение каталитической активности соответствующих ферментативных белков под действием механической силы. При этом полагают, например, что механическое воздействие на молекулу фермента индуцирует ее конформационное изменение. В связи с этим встает закономерный вопрос: является ли чувствительность к механическому воздействию уникальным специфическим свойством лишь некоторых ферментов или же такая способность системы зависит вовсе не от природы фермента, а определяется свойствами неферментативной матрицы (структурные белки, мембраны и т. д.), в (или на) которой катализатор функционирует. Этому вопросу и посвящена данная работа.

В качестве модельной механохимической системы мы исследовали протеолитический фермент  $\alpha$ -химотрипсин, химически присоединенный к капроновой нити.  $\alpha$ -Химотрипсин был выбран нами, во-первых, как заведомо не имеющий никакого отношения к природным механохимическим процессам и, во-вторых, как один из наиболее простых и изученных ферментов. Выбор носителя (капроновая нить) обусловлен его эластичностью, т. е. способностью нити обратно удлиняться при растяжении. Ковалентное присоединение («пришивку»)  $\alpha$ -химотрипсина к капроновой нити проводили согласно несколько модифицированной методике, использованной ранее

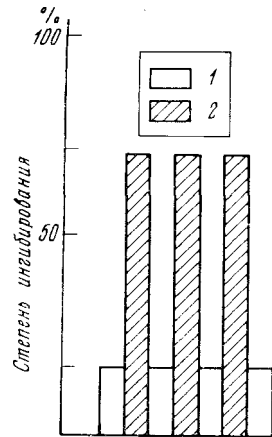


Рис. 1. Степень ингибирования панкреатической ингибитором реакции присоединенного к капроновой нити  $\alpha$ -химотрипсина с этиловым эфиром N-ацетил-L-тирозином. 1 — нерастянутая нить, 2 — нить, обратно растянутая на 30%. 20°, pH 8, 0,1 M KCl, начальная концентрация субстрата  $5 \cdot 10^{-3}$  M, белкового ингибитора  $2 \cdot 10^{-8}$  M, активного иммобилизованного фермента  $\sim 10^{-9}$  M

для связывания уреазы с нейлоновой трубкой (4). Сначала капроновую нить подвергали частичному гидролизу в концентрированной соляной кислоте. В то время как исходная нить обладала лишь двумя видами деформации — обратимое удлинение и затем разрыв, у частично гидролизованной нити этим видам деформации предшествовало необратимое удлинение нити (~на 25%), которое представляет собой, вероятно, движение составляющих нить полимерных цепей друг относительно друга. Далее  $\alpha$ -хим-

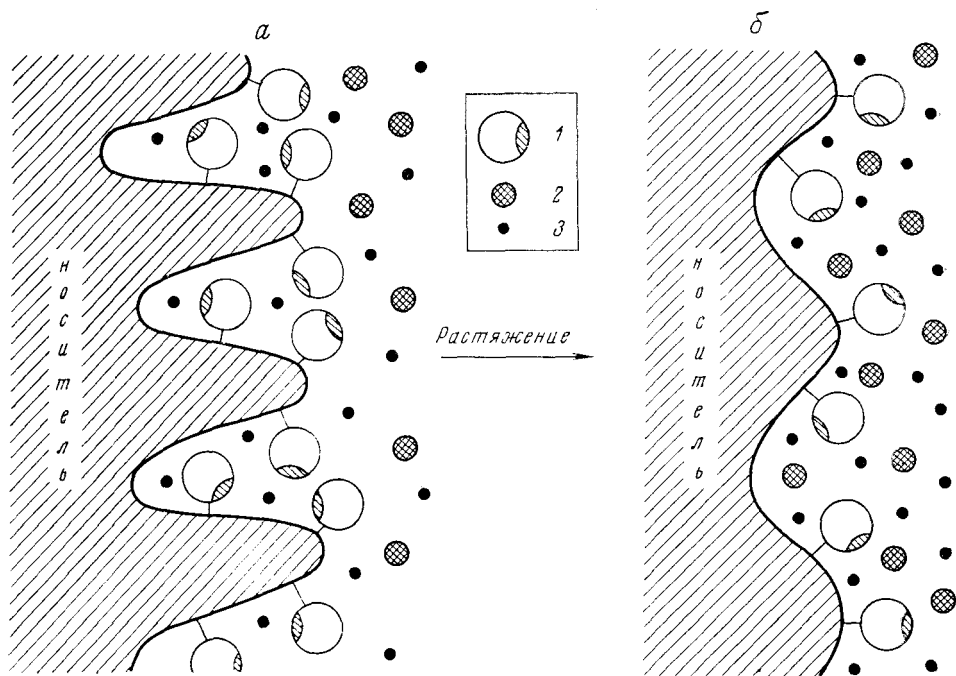


Рис. 2. Схематическое изображение взаимодействия присоединенного к капроновой нити  $\alpha$ -химотрипсина с высокомолекулярным ингибитором и низкомолекулярным субстратом. 1 — молекулы иммобилизованного фермента (закрашенные области соответствуют активным центрам); 2 — молекулы высокомолекулярного ингибитора; 3 — молекулы низкомолекулярного субстрата. а — нерастянутая нить, б — растянутая нить

отрипсин химически (при помощи глутарового альдегида) присоединяли к нити, предварительно растянутой необратимо. Мы убедились, что обратимая деформация нити (равная в пределе 30%) не приводит к какому бы то ни было изменению каталитической активности присоединенного к ней  $\alpha$ -химотрипсина. Каталитическую активность связанного с носителем (иммобилизованного) фермента определяли на рН-стате («Radiometer» ТТТ-1с, Дания) по начальной скорости гидролиза специфического субстрата этилового эфира *N*-ацетил-*L*-тирозина. Для растяжения капроновой нити использовали специальное растягивающее устройство, позволяющее фиксировать степень деформации нити. Такое устройство вместе с нитью целиком помещали в кювету рН-стата.

Ингибирование присоединенного к капроновой нити  $\alpha$ -химотрипсина белковым ингибитором. Свободный  $\alpha$ -химотрипсин практически полностью ингибируется белковым ингибитором — панкреатическим ингибитором трипсина, — взятым в эквимольных количествах (5). В то же время нами было показано, что в случае фермента, иммобилизованного на капроновой нити, его каталитическая активность уменьшается всего лишь на 17% даже при 20-кратном мольном из-

бытке панкреатического ингибитора. Этот факт не следует связывать с возможным ухудшением константы ассоциации фермента с ингибитором в результате иммобилизации, поскольку даже повышение концентрации ингибитора в системе в 20 раз не приводит к заметному увеличению степени ингибирования.

Подобное явление неполного ингибирования каталитической активности протеолитических ферментов, иммобилизованных на водонерастворимых носителях, описано в литературе (6-9). Объяснение заключается в том, что носитель может создавать затруднения для подхода высокомолекулярного ингибитора к активному центру фермента, не препятствуя, в то же время, взаимодействию фермента с низкомолекулярными субстратами.

Мы показали, что неполное ингибирование эстеразной активности присоединенного к капроновой нити  $\alpha$ -химотрипсина белковым ингибитором не связано: 1) с электростатическими факторами, так как степень ингибирования не зависит от ионной силы (в диапазоне от 0,1 до 3 М КСl); 2) с диффузионными факторами, так как степень ингибирования не зависит от скорости перемешивания и времени инкубации (5-30 мин.); 3) с белок-белковыми взаимодействиями молекул иммобилизованного фермента, так как степень ингибирования практически не зависит от степени заполнения поверхности носителя ферментом (при изменении его поверхностной концентрации в 200 раз). Таким образом, и в случае иммобилизованного на капроновой нити  $\alpha$ -химотрипсина, по-видимому, следует считать, что неполное ингибирование панкреатическим ингибитором обусловлено стерическими препятствиями, создаваемыми носителем.

Зависимость степени ингибирования присоединенного к капроновой нити  $\alpha$ -химотрипсина с белковым ингибитором от растяжения нити. Нами было показано, что при обратимом растяжении нити на 30% степень ингибирования присоединенного к ней  $\alpha$ -химотрипсина панкреатическим ингибитором увеличивается с 17 до 70%. Этот эффект полностью обратим, а именно, если снять с нити растягивающую нагрузку, степень ингибирования возвращается к исходному низкому уровню (17%). Такую процедуру «растяжения — релаксации» с одновременным «увеличением — уменьшением» степени ингибирования можно повторять неоднократно (рис. 1).

Наблюдаемое нами явление легко объяснить в рамках модели, представленной на рис. 2. В исходном состоянии нити *a* (до растяжения) большинство активных центров иммобилизованного  $\alpha$ -химотрипсина недоступно для панкреатического ингибитора. При растяжении происходит переход системы из состояния *a* в состояние *b*, представляющее собой, по-видимому, лишь конформационное изменение составляющих капроновую нить полимерных молекул. При этом могут частично сниматься стерические препятствия, создаваемые носителем, и, следовательно, количество доступных для белкового ингибитора активных центров фермента должно возрастать.

Таким образом, в настоящей работе показано, что механическое воздействие на капроновую нить позволяет регулировать каталитическую

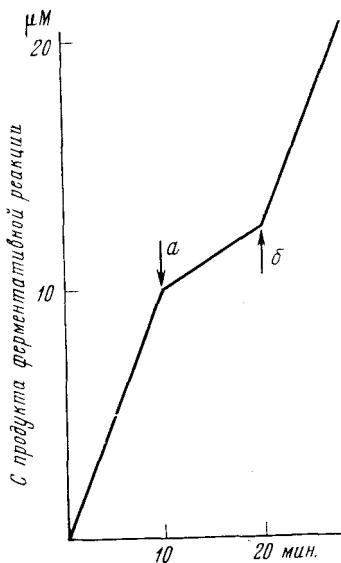


Рис. 3. Зависимость концентрации продукта ферментативной реакции от времени, полученная в системе, включающей в себя присоединенный к капроновой нити  $\alpha$ -химотрипсин, панкреатический ингибитор и этиловый эфир *N*-ацетил-*L*-тирозина. Степень растяжения нити 30%. *a* — растяжение нити, *b* — снятие нагрузки

активность присоединенного к ней  $\alpha$ -химотрипсина (в присутствии белкового ингибитора) (рис. 3). Растяжение нити приводит к падению скорости ферментативной реакции (поскольку возрастает степень ингибирования панкреатическим ингибитором); при последующем снятии нагрузки и релаксации нити к нерастянутому состоянию скорость ферментативного процесса возрастает до исходного уровня.

В итоге можно заключить, что чувствительность каталитической активности к внешнему механическому воздействию можно искусственно индуцировать даже у простых ферментов, присоединяя их к подходящему носителю. Отметим, что полученные нами величины эффектов изменения ферментативной активности при растяжении нити аналогичны или даже превосходят диапазон обратимого изменения под воздействием внешнего механического поля АТФазной активности природных механохимических ферментативных систем — целого мышечного волокна (<sup>10-12</sup>) или специфических мышечных ферментов миозина и актомиозина (<sup>13, 14</sup>).

Московский государственный университет  
им. М. В. Ломоносова

Поступило  
19 VI 1974

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> Б. Ф. Поглазов, Структура и функции сократительных белков, М., 1965.  
<sup>2</sup> М. В. Волькенштейн, ДАН, т. 146, 1426 (1962). <sup>3</sup> Я. А. Винников, Цитологические и молекулярные основы рецепции, Л., 1971, гл. 8. <sup>4</sup> P. V. Sundaram, W. E. Hornby, FEBS Letters, v. 10, 325 (1970). <sup>5</sup> M. Kunitz, J. H. Northrop, J. Gen. Physiol., v. 49, 991 (1936). <sup>6</sup> A. Bar-Eli, E. Katchalski, J. Biol. Chem., v. 238, 1690 (1963). <sup>7</sup> Y. Levin, M. Pecht et al., Biochemistry, v. 3, 1905 (1964). <sup>8</sup> R. Haynes, K. A. Walsh, Biochem. Biophys. Res. Commun., v. 36, 235 (1969). <sup>9</sup> C. K. Glassmeyer, J. D. Ogle, Biochemistry, v. 10, 786 (1971). <sup>10</sup> T. Ohnishi, T. Ohnishi, Nature, v. 197, 184 (1963). <sup>11</sup> В. И. Воробьев, Л. Ш. Гангелина, Цитология, т. 5, 672 (1963). <sup>12</sup> R. A. Chaplain, Pflüg. Arch., В. 307, 120 (1969). <sup>13</sup> С. Э. Шульц, В сборн. Первичные процессы в рецепторных элементах органов чувств, М.—Л., 1966, стр. 185. <sup>14</sup> В. И. Воробьев, Л. В. Кухарева, ДАН, т. 165, 435 (1965).