

К. МАРТИНЕК, А. М. КЛИБАНОВ, А. В. ЧЕРНЫШЕВА,
член-корреспондент АН СССР И. В. БЕРЕЗИН

ОСНОВНЫЕ ПРИНЦИПЫ СТАБИЛИЗАЦИИ ФЕРМЕНТОВ

ПОВЫШЕНИЕ ТЕРМОСТАБИЛЬНОСТИ α -ХИМОТРИПСИНА ПРИ ИММОБИЛИЗАЦИИ В ГЕЛЕ ПОЛИМЕТАКРИЛОВОЙ КИСЛОТЫ

Одна из важнейших задач энзимологии — это исследование стабильности ферментов по отношению к различным инактивирующим воздействиям (повышение температуры, действие денатурирующих агентов, резкое изменение рН среды и т. д.). С теоретической точки зрения выявление путей стабилизации ферментов может привести к пониманию общих механизмов денатурации белков, которые до настоящего времени не познаны (¹, ²). Кроме того, изучение факторов, определяющих стабильность ферментов, позволит ответить на существенный для биохимии в целом вопрос о том, почему стабильность большинства ферментов, выделенных в очищенном состоянии, как правило, меньше, чем в их естественном природном окружении (²). С практической точки зрения познание принципов стабилизации ферментов откроет новые пути для получения ферментных препаратов, пригодных для продолжительного технологического использования.

В последнее время, в связи с интенсивным изучением иммобилизованных ферментов (³), наметились новые подходы к решению проблемы стабилизации белков. В частности, многие исследователи полагают, что устойчивость глобулы биокатализатора по отношению к инактивирующим (разворачивающим белковую молекулу) воздействиям можно существенно увеличить, если сделать структуру молекулы фермента более жесткой, например за счет многоточечного связывания ее с носителем (³). В качестве экспериментального подтверждения этой концепции можно указать на исследование денатурирующего влияния мочевины (⁴). В то время как свободный трипсин и трипсин, ковалентно присоединенный к сефадексу одной связью, полностью неактивен в 8 М растворе мочевины, фермент, химически присоединенный к носителю двумя или тремя связями, сохраняет в этих условиях часть каталитической активности. Более того, трипсин, связанный с сефадексом четырьмя и большим количеством связей, полностью активен в указанном растворе денатуранта.

В связи с этим возникает закономерный вопрос, нужно ли для стабилизирующего закрепления молекулы фермента присоединять ее к носителю именно ковалентно (прочными химическими связями) или же фермент можно стабилизировать также несколькими даже относительно слабыми связями (типа водородных или же возникающих, например, при электростатическом или гидрофобном взаимодействии белковой глобулы с матрицей). Ответу на этот вопрос и посвящена настоящая работа.

В качестве объекта исследования выбран α -химотрипсин, один из наиболее изученных биокатализаторов, который служит в настоящее время моделью для исследования взаимосвязи между структурой и функцией ферментов. Нами исследована термостабильность этого протеолитического фермента в спитых гелях полиметакриловой кислоты различной концентрации. Фермент добавляли к водному раствору (рН 8) мономера (метакрилат натрия) и сшивающего агента (N, N'-метиленисакриламид), соотношение которых составляло 36 : 1. Затем в систему добавляли инициаторы полимеризации (персульфат аммония и N, N, N', N'-тетраметилэтилендиа-

мин). Полимеризацию вели в тонкостенных стеклянных пробирках диаметром 6 мм при 0°. После окончания процесса гелеобразования пробирки инкубировали определенное время при 60° в термостате, затем охлаждали, гель извлекали, растирали до размера частиц не более 0,1 мм и определяли относительную ферментативную активность суспензии геля на рН-стате по начальной скорости реакции со специфическим субстратом — этиловым эфиром N-ацетил-L-тирозина⁽⁵⁾.

На рис. 1 приведены кинетические кривые термoinактивации α -химотрипсина в водном растворе (кривая а) и в 44% геле полиметакриловой кислоты (кривая б). Видно, что термостабильность фермента в геле значительно превышает его стабильность в водном растворе. Нами специально было показано, что исследуемый процесс термoinактивации фермента не осложнен автолизом или другими полимолекулярными процессами типа агрегации, поскольку начальная скорость инактивации α -химотрипсина как в растворе, так и в геле пропорциональна первой степени его концентрации.

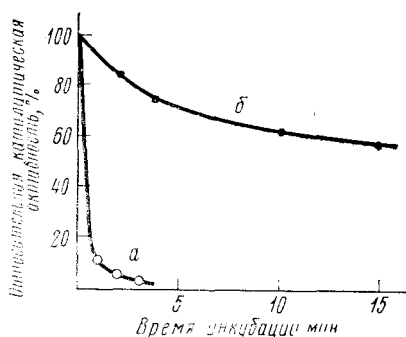


Рис. 1

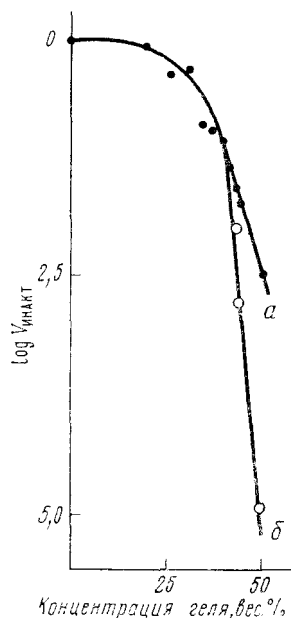


Рис. 2

Рис. 1. Кинетические кривые мономолекулярной термической инактивации (60°, pH 8) α -химотрипсина: а — в водном растворе в отсутствие мономера (0,1 М КСl; $5 \cdot 10^{-3}$ М трис-HCl, $[E]_0 = 2 \cdot 10^{-7}$ М); б — в геле полиметакриловой кислоты (44%) при $[E]_0 \approx 10^{-4}$ М

Рис. 2. Зависимость логарифма относительной скорости ($V_{\text{инакт}}$) мономолекулярной термoinактивации (60°, pH 8) α -химотрипсина ($[E]_0 \approx 10^{-4}$) от концентрации геля полиметакриловой кислоты при различных степенях инактивации фермента: а — 0, б — 75. Концентрация геля дана весовым содержанием (в %) мономера в растворе до полимеризации. При концентрации геля меньше 42% кривые а и б идентичны. Точки при 0 и 20 вес. % соответствуют термoinактивации в растворе, наблюдаемой в отсутствие мономера и, соответственно, в присутствии нешитого полимера при концентрациях фермента 10^{-6} — 10^{-7} М, когда автолиз отсутствует. Точка при концентрации геля 50% получена экстраполяцией температурной зависимости величины $V_{\text{инакт}}$, наблюдаемой при более высоких температурах

На рис. 2 представлена зависимость логарифма скорости мономолекулярной термoinактивации α -химотрипсина (на разных глубинах протекания реакции) от концентрации геля полиметакриловой кислоты в диапазоне от 0 до 50% (предел растворимости мономера). В разбавленных гелях скорость мономолекулярной термoinактивации не определяли, так как в условиях эксперимента исследуемый процесс осложнен автолизом.

Видно, что при изменении концентрации геля от 0 до 30% скорость термoinактивации фермента почти постоянна, но резко падает при дальнейшем повышении концентрации геля, причем в геле величина эффекта достигает почти 10^5 раз.

Это явление не может быть объяснено тем, что при образовании геля в присутствии α -химотрипсина произошла ковалентная «пришивка» фермента к полимерной матрице. Нами показано, что практически весь фермент, включенный в гель, можно из него вымыть в водный раствор ⁽⁵⁾. Причиной стабилизации α -химотрипсина не может быть и оставшийся незаполимеризованным мономер ⁽⁶⁾, поскольку его остаточная концентрация в геле (~2% от взятого для полимеризации) может лишь слабо повлиять на скорость инактивации фермента ⁽⁵⁾. Стабилизацию фермента нельзя также объяснить и возможным повышением ионной силы раствора при увеличении концентрации геля, так как известно, что этот фактор лишь в относительно небольшой степени влияет на термостабильность α -химотрипсина ⁽⁵⁾.

Обнаруженное нами явление (рис. 2) следует интерпретировать как повышение стабильности ферментной молекулы за счет ее взаимодействия с полимерной матрицей. Наиболее вероятным представляется следующий механизм. В принципе, белковая молекула α -химотрипсина может образовывать с карбоксильными группами полиметакриловой кислоты водородные и электростатические связи. Однако эти связи следует рассматривать как относительно слабые, и они, вероятно, практически не реализуются в разбавленных гелях, поскольку образование подобного комплекса предполагает большие потери энтропии при «погашении» поступательного (а возможно, и вращательного) движения молекулы фермента и включает также, по-видимому, энтропийные потери, связанные с необходимым «замораживанием» фрагментов полимерных цепей. По-другому обстоит дело в концентрированных гелях, где поступательное движение белковых молекул существенно заторможено, как это было показано на примере полиакриламидного геля ^(7, 8). Очевидно, при заторможенном поступательном движении белковых молекул их сорбция на полимерной матрице должна быть термодинамически более выгодной. Возможно также, что в концентрированном геле несколько ограничена и подвижность самих полимерных цепей, и, следовательно, по сравнению с разбавленными гелями (или раствором полимера) энтропийные затраты свободной энергии, необходимые

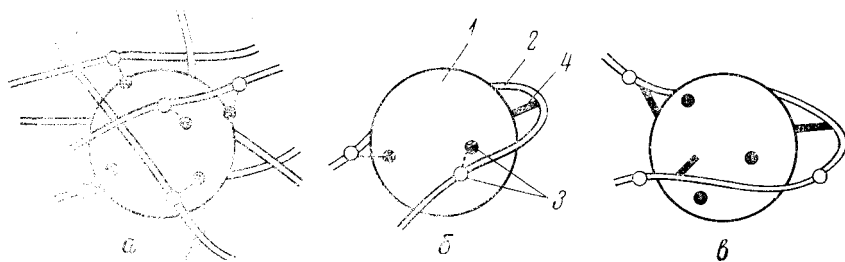


Рис. 3. а — стабилизирующее многоточечное взаимодействие белковой глобулы фермента с пространственной сеткой геля; б, в — ковалентная пришивка ферментативной молекулы к полимерной цепи с дополнительным сорбционным взаимодействием. 1 — ферментная глобула, 2 — полимерные цепи геля, 3 — сорбционные центры, 4 — ковалентная пришивка

для локального «замораживания» матрицы при образовании ее комплекса с ферментом, могут и не быть столь большими. И, наконец, в условиях концентрированного геля следует ожидать, что взаимодействие фермента с матрицей по чисто стерическим причинам должно быть многоточечным, поскольку полимерные цепи геля со всех сторон и вплотную подходят к ферментной глобуле, как это схематически показано на рис. 3а. Именно такое многоточечное взаимодействие матрица — белок может быть причиной столь резкого повышения термостабильности α -химотрипсина, наблюдаемого на опыте (рис. 2). Не исключено, что некоторые тонкие черты предложенного механизма стабилизации удастся вскрыть или под-

твердить при изучении диффузионных характеристик ферментов, иммобилизованных в спитых полиэлектролитных гелях. Такие исследования нами сейчас проводятся.

В свете настоящей работы становится понятным, почему до сих пор не были получены, несмотря на значительные усилия в этом направлении, препараты растворимых ферментов, существенно стабилизированные взаимодействием их с водорастворимыми полимерами (⁹, ¹⁰). В случае протеолитических ферментов наблюдаемые эффекты обусловлены, как правило, элиминированием автолиза (¹¹⁻¹³). Для других ферментов при их модификации водорастворимыми полимерами достигнуто не слишком большое повышение термостабильности за счет, по-видимому, изменения среды вокруг белковой глобулы (¹⁴). Отсутствие положительных результатов следует объяснить, по нашему мнению, тем, что даже при ковалентной пришивке фермента к молекуле полимера (рис. 3б) образование комплекса предполагает, очевидно, термодинамически невыгодное (с точки зрения энтропийных потерь) закрепление полимерной цепи в ориентированном положении по отношению к центрам сорбции на белке. Более того, в результате ковалентной пришивки могут возникнуть и стерические препятствия для дополнительного сорбционного взаимодействия белка с полимером (рис. 3в). Отсутствие эффектов стабилизации в работах, упомянутых выше, возможно, обусловлено также и тем, что используемые полимерные матрицы были слишком гибкими, что не позволило достичь жесткой фиксации ферментной структуры.

В заключение отметим, что предложенный нами механизм стабилизации ферментов в концентрированных полимерных гелях (принудительная остановка поступательного движения ферментной молекулы с последующим многоточечным взаимодействием белка с относительно мало подвижной матрицей), возможно, функционирует *in vivo* в мембранных ферментативных системах, где, во-первых, наблюдается весьма низкая подвижность белковых молекул в мембране (¹⁵) и, во-вторых, белковые молекулы интенсивно взаимодействуют с составляющими мембранную фазу фосфолипидными молекулами, образуя множество относительно слабых нековалентных связей — гидрофобных, электростатических, водородных и т. д. (¹⁶).

Московский государственный университет
им. М. В. Ломоносова

Поступило
24 III 1975

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ М. Жоли, Физическая химия денатурации белков, М., 1968. ² В. И. Максимова, Усп. совр. биол., 76, 21 (1973). ³ Иммобилизованные ферменты, под ред. И. В. Березина, М., Изд-во МГУ, 1975, гл. 5. ⁴ D. Gabel, Europ. J. Biochem., v. 33, 348 (1973). ⁵ А. В. Чернышева, К. Мартинек и др., Изв. АН СССР, сер. хим., № 8 (1975). ⁶ K. Martinek, V. S. Goldmacher et al., FEBS Letters, v. 51, 152 (1975). ⁷ I. V. Berezin, A. M. Klivanov, K. Martinek, Biochim. et biophys. acta, v. 364, 193 (1974). ⁸ И. В. Березин, А. М. Клибанов и др., ДАН, т. 218, 367 (1974). ⁹ H. F. Hixson, Biotechnol. Bioeng., v. 15, 1011 (1973). ¹⁰ R. L. Foster, A. R. Thomas, Biochim. et biophys. acta, v. 321, 409 (1973). ¹¹ L. Goldstein, Biochemistry, v. 11, 4072 (1972). ¹² B.-U. von Specht, H. Seinfeld, W. Brendel, Hoppe-Seyler's Zs. physiol. Chem., B. 354, 1659 (1973). ¹³ С. В. Кольцова, М. В. Гликина и др., Молек. биол., т. 5, 225 (1971). ¹⁴ J. R. Wykes, P. Dunnill, M. D. Lilly, Biochim. et biophys. acta, v. 250, 522 (1971). ¹⁵ M. Eddin, Ann. Rev. Biophys. Bioeng., v. 3, 179 (1974). ¹⁶ Н. С. Гельман, М. А. Лукоянова, Д. Н. Островский, Мембраны бактерий и дыхательная цепь, М., 1972.