



УДК 577.456.3.031

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ДИНАМИЧЕСКОЙ СТРУКТУРЫ АКТИВНЫХ ЦЕНТРОВ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ УЛЬТРАЗВУКОВЫМ МЕТОДОМ**ВОЗДЕЙСТВИЕ УЛЬТРАЗВУКА НА α -ТРИПСИН, β -ТРИПСИН И ТРИПСИНОГЕН*****Клибанов А. М., Казанская Н. Ф., Ларионова Н. И.,
Мартинек К., Березин И. В.****Химический факультет и Межфакультетская лаборатория
биоорганической химии Московского государственного университета
им. М. В. Ломоносова*

Показано, что при действии кавитационного ультразвука на разбавленные растворы α - и β -трипсинов происходит необратимая инактивация ферментов, скорость которой подчиняется кинетике первого порядка. Это дало возможность применить для количественного исследования индуцируемых рН и температурой конформационных изменений в активных центрах обеих форм трипсина предложенный ранее (Биохимия, 39, 878 (1974)) ультразвуковой метод изучения динамической структуры активных центров ферментов. Кривая зависимости константы скорости ультразвуковой инактивации ($k_{\text{инакт}}$) от рН для α - и β -трипсинов имеет вид перевернутого колокола. Этот результат интерпретируется в рамках существования трех конформационных состояний активных центров трипсинов, переходы между которыми контролируются повогенными группами с рК 1,9—2,0 и 9,1 (в трипсиногене такие переходы ультразвуковым методом не зафиксированы). Исследование температурной зависимости для $k_{\text{инакт}}$ показало, что при 41° в случае α -трипсина и при 35° в случае β -трипсина в активных центрах ферментов происходит обратимый конформационный переход, характеризующийся значениями ΔH и ΔS соответственно 79 ккал/моль, 250 э. е. и 35 ккал/моль, 113 э. е. На основании полученных ультразвуковым методом данных сопоставляются динамические структуры активных центров α - и β -трипсинов, а также трипсина и химотрипсина.

Уникальность ферментов как биокатализаторов во многом обусловлена сложной и весьма тонкой динамической структурой их активных центров, т. е. способностью давать резкий и адекватный функциональный ответ даже на небольшие изменения внешней среды. В связи с этим важное значение для познания механизмов действия ферментов имеет, на наш взгляд, разработка новых нетрадиционных методов изучения конформационных изменений, происходящих в их активных центрах.

Ранее [1, 2] нами был предложен ультразвуковой метод исследования динамической структуры активных центров ферментов. Принцип метода состоит в следующем: под действием кавитационного ультразвука в воде происходит образование свободных радикалов, главным образом радикалов гидроксила [3]; если озвучиванию подвергать водный раствор фермента, то при взаимодействии этих радикалов с его активным центром может происходить инактивация биокатализатора вследствие модификации (де-

струкции) какой-либо функциональной группы, важной для ферментативной активности (в случае α -химотрипсина потеря каталитической активности происходит благодаря модификации остатка триптофана-215 активного центра [1]). Очевидно, что если под влиянием внешнего воздействия (изменение рН или температуры, добавление эффекторов) произойдет изменение конформационного состояния активного центра фермента, то это должно привести к изменению доступности указанной функциональной группы для индуцированных ультразвуком свободных радикалов из среды, т. е. к изменению скорости ультразвуковой инактивации фермента. Следовательно, определяемая на опыте константа скорости первого порядка ультразвуковой инактивации фермента является параметром, чувствительным к конформационному состоянию активного центра фермента. Экспериментально исследуя кинетику ультразвуковой инактивации ферментов при различных условиях, можно количественно изучать вызываемые изменением условий конформационные переходы в активных центрах биокатализаторов. Достоинства ультразвукового метода: 1) метод фиксирует изменения, происходящие именно в активном центре, что представляет наибольший интерес для изучения ферментативного катализа; 2) метод не нуждается во введении в ферментативную систему дополнительной «метки»; 3) не обязательно знать, какая именно группа активного центра фермента реагирует со свободными радикалами. Это дает возможность исследовать динамическое поведение ферментов с неизвестной структурой активного центра [2]; 4) метод требует весьма малых (каталитических) количеств исследуемого фермента.

В настоящей работе мы применили описанный ультразвуковой метод для сравнительного изучения α - и β -форм трипсина (отличающихся друг от друга лишь тем, что молекула β -трипсина представляет собой единую полипептидную цепь, а в α -трипсине эта цепь расщеплена между остатками лизин-131 и серин-132 [4]) и трипсиногена. Полученные результаты по динамической структуре трипсина сопоставляются с аналогичными данными, полученными ультразвуковым методом для родственного протеолитического фермента α -химотрипсина.

При озвучивании разбавленных водных растворов α - и β -трипсинов происходит инактивация (в условиях эксперимента необратимая) ферментов (рис. 1, а). В диапазоне концентраций от $8 \cdot 10^{-8}$ до $3 \cdot 10^{-7}$ М обе формы трипсина инактивируются согласно простой схеме:



где $k_{\text{инакт}}$ — константа скорости первого порядка ультразвуковой инактивации фермента. В указанном диапазоне концентраций ферментов величина $k_{\text{инакт}}$, определяемая из линейных анаморфоз (рис. 1, б) кривых ультразвуковой инактивации, не зависит от начальной концентрации трипсина.

Далее мы исследовали влияние рН и температуры на константы скорости ультразвуковой инактивации α - и β -трипсинов. Нас интересовало лишь специфическое влияние рН и температуры на величину $k_{\text{инакт}}$, т. е. влияние, не обусловленное изменением под действием этих факторов ультразвуковых свойств самой среды. Для выявления неспецифического влияния мы изучали действие изменения рН и температуры на кинетику ультразвукового обесцвечивания модельного соединения — красителя профлавина [1, 5]. В используемом в данной работе диапазоне рН и температур константа скорости первого порядка ультразвукового обесцвечивания профлавина, как мы показали, практически постоянна, т. е. ультразвуковые свойства среды при варьировании этих параметров не изменяются и изменение $k_{\text{инакт}}$ связано с изменением структуры фермента.

Для α - и β -трипсинов зависимости $k_{\text{инакт}}$ от рН (рис. 2, а) имеют вид

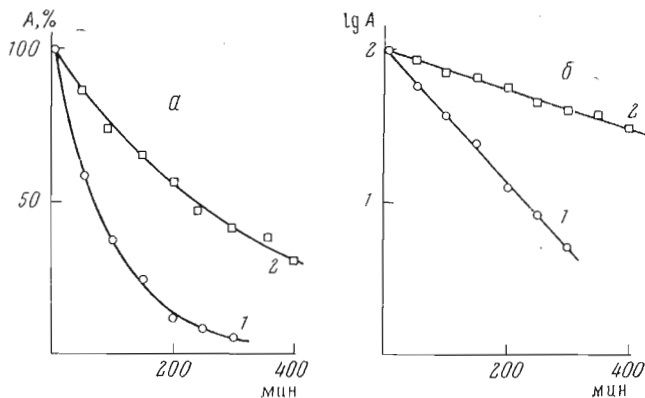
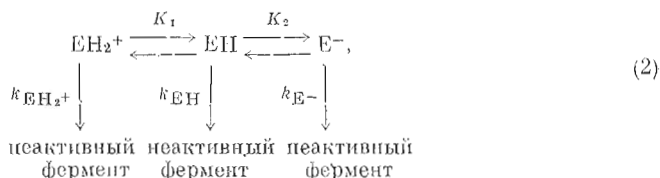


Рис. 1. *a* — зависимость относительной ферментативной активности (*A*) α -трипсина (1) и β -трипсина (2) от времени озвучивания; *b* — линейные анаморфозы кривых 1 и 2

перевёрнутого колокола. Простейшей схемой, описывающей такие зависимости, является



где EH_2^+ , EH и E^- — формы фермента различной степени протонирования; K_1 и K_2 — соответствующие константы равновесия; $k_{\text{EH}_2^+}$, k_{EH} и k_{E^-} — константы скоростей ультразвуковой инактивации форм EH_2^+ , EH и E^- .

На основании данных рис. 2, *a* можно рассчитать (см. «Экспериментальную часть») значения всех параметров, входящих в схему (2), для α - и β -трипсинов (табл. 1). Видно, что для обеих форм фермента «кислый» ($\text{pH} < 2$) и «щелочной» ($\text{pH} > 9$) конформеры инактивируются в поле ультразвука весьма быстро, в то время как для «нейтрального» ($2 < \text{pH} < 9$) конформера ультразвуковая инактивация протекает сравнительно медленно*. Именно в этом диапазоне pH существует каталитически активная конформация трипсина. Эта конформация поддерживается с по-

Таблица 1

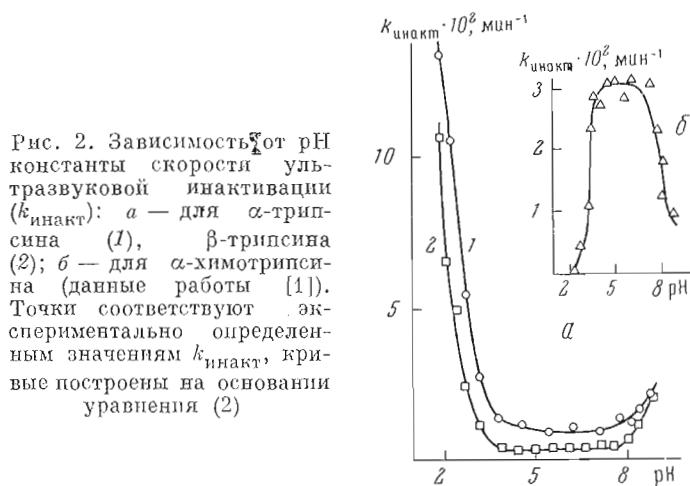
Величины параметров ультразвуковой инактивации (схема (2)) для α - и β -форм трипсина

Форма трипсина	$k_{\text{EH}_2^+} \cdot 10^2$	$k_{\text{EH}} \cdot 10^2$	$k_{\text{E}^-} \cdot 10^2$	$\text{p}K_1$	$\text{p}K_2$
	мин ⁻¹				
α	24,5	1,0	4,9	1,9	9,1
β	18,0	0,3	6,5	2,0	9,1

мощью так называемого солевого мостика, образованного, согласно данным рентгеноструктурного анализа, остатками аспарагиновой кислоты-182 и изолейцина-7 [6]. В работе [7] показано, что оптическое вращение раствора трипсина и каталитическая константа его реакции с незаряженным субстратом — метиловым эфиром *N*-бензоил-*L*-аланина — контролируются ионогенной группой с $\text{p}K$ 9,4—9,5; аналогичные результаты были

* В исследованном диапазоне pH и температур обе формы трипсина практически стабильны, т. е. скорость спонтанной инактивации ферментов намного меньше скорости их инактивации в поле ультразвука.

получены при исследовании рН-зависимостей ферментативной активности трипсина по отношению к различным субстратам рядом других авторов (см. обзор литературы в [7]). Указанной ионогенной группой является предположительно α -аминогруппа изолейцина-7. При модификации этого аминокислотного остатка азотистой кислотой [8] или метилацетимидатом [19] происходит инактивация фермента. Естественно предположить, что



проявляющаяся при ультразвуковой инактивации трипсинов ионогенная группа с рК 9,1 и есть α -аминогруппа изолейцина-7, а ионогенная группа с рК 1,9—2,0 — ее партнер по «солевому мостику», карбоксильная группа аспарагиновой кислоты-182.

Учитывая это заключение, отметим, что когда «солевой мостик» разрушен ($\text{pH} < 2$ и $\text{pH} > 9$), значение $k_{\text{инакт}}$ велико, т. е. функциональная группа X активного центра трипсина, разрушающаяся под действием индуцируемых ультразвуком свободных радикалов, более доступна для этих радикалов, а когда «солевой мостик» функционирует, значение $k_{\text{инакт}}$

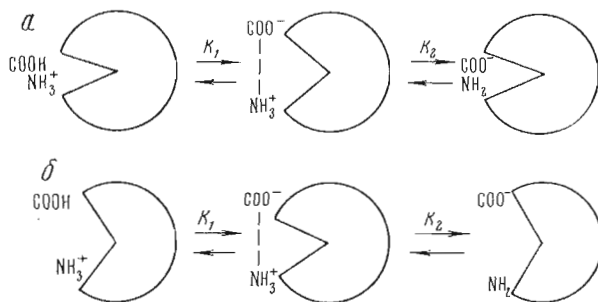


Рис. 3. Схематическое изображение индуцируемых изменением рН конформационных изменений активных центров α -химотрипсина (а) и трипсина (б) (объяснения см. в тексте)

относительно мало, т. е. доступность указанной группы X для свободных радикалов среды уменьшается. Эти факты можно интерпретировать, полагая, что в нативной, каталитически активной конформации трипсина его активный центр больше закрыт от внешнего раствора, чем в неактивных «кислой» и «щелочной» конформациях (рис. 3, б). В случае α -химотрипсина рН-зависимость константы скорости ультразвуковой инактивации имеет «колоколообразную» форму (рис. 2, б) [1], т. е. в рамках принятых представлений его активный центр в каталитически активной («нейтральной») конформации менее закрыт от внешнего раствора, чем в не-

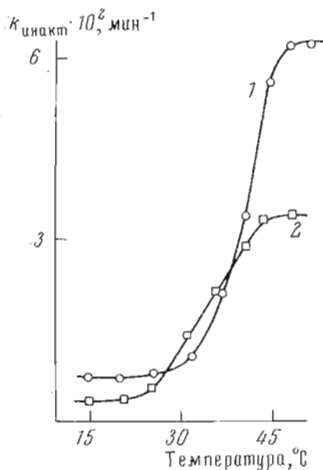


Рис. 4. Зависимость константы скорости ультразвуковой инактивации ($k_{\text{инакт}}$) α -трипсина (1) и β -трипсина (2) от температуры

ной. В работе [7] показано, что оптическое вращение раствора трипсиногена почти не меняется в диапазоне pH 5—10. Таким образом, в отличие от трипсина «солевой мостик», по-видимому, не функционирует в трипсиногене. Этот факт легко понять, так как в зимогене α -аминогруппа изолейцина-7, один из компонентов «солевого мостика», не свободна, а входит в состав полипептидной цепи [9].

К настоящему времени утвердились представления о том, что конформационное изменение белковой глобулы должно складываться из почти независимых друг от друга конформационных изменений отдельных ее фрагментов [10]. Очевидно, что количество таких фрагментов определяется природой белка, т. е. строением белковой глобулы, а термодинамические параметры конформационного перехода позволяют судить об их взаимосвязи и степени кооперативности процесса. С этой точки зрения весьма интересно количественно сопоставить температурные конформационные переходы α - и β -трипсинов, имеющих лишь минимальное различие в своем строении, но различающихся тем не менее по некоторым физико-химическим свойствам [11, 12, 19].

Тот факт, что трипсин при кислых pH претерпевает в растворе обратимый температурный конформационный переход (в диапазоне 40—60°), был продемонстрирован при исследовании спектров поглощения и оптического вращения раствора фермента [13—16] и квантового выхода его фотоинактивации [17]. В работе [18] индуцируемые температурой конформационные переходы в индивидуальных α - и β -трипсинах были изучены путем исследования температурных зависимостей гидролитической и аутолитической активностей этих ферментов. Однако наблюдаемые в аррениусовских координатах изломы (соответствующие конформационным изменениям) были весьма нечеткими, поэтому не представлялось возможным не только определить термодинамические параметры конформационного перехода, но даже точно указать температуру перехода (соответствующую эквивалентному соотношению конформеров). Кроме того, использованный авторами [18] метод обладает принципиальным недостатком: субстрат может оказывать влияние на фермент, меняя его структуру, свойства его белковой глобулы и, следовательно, термодинамические характеристики.

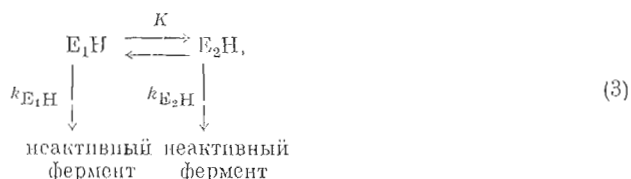
активных («кислой» и «щелочной») конформациях (рис. 3, а). В этом, по-видимому, проявляется одно из различий в конформации активных центров трипсина и химотрипсина, обнаруженное в настоящей работе с помощью ультразвукового метода.

Как следует из рис. 2, а и табл. 1, в α - и β -трипсинах «солевой мостик» поддерживается одними и теми же ионогенными группами с $pK_1 \sim 2$ и $pK_2 9,1$. Различаются лишь абсолютные значения констант скоростей ультразвуковой инактивации обеих форм фермента (т. е. доступность группы X для свободных радикалов среды). Следовательно, принципиальный механизм поддержания каталитически активной конформации активного центра в обеих формах трипсина практически одинаков.

Процесс ультразвуковой инактивации трипсиногена практически не зависит от pH в диапазоне 1,85—8,85, и после 30-минутного озвучивания остаточная потенциальная активность зимогена составила 40% от исход-

Поскольку при обратимом разворачивании фермента, индуцированном повышением температуры, вообще говоря, происходит «раскрывание» или «закрывание» его активного центра (и, следовательно, меняется доступность группы X для свободных радикалов из среды), то априори можно было предположить, что ультразвуковой метод окажется эффективным для изучения температурных конформационных переходов в активных центрах двух форм трипсина.

Характер зависимости величин $k_{\text{инакт}}$ от температуры для α - и β -трипсинов (рис. 4) свидетельствует о том, что для обеих форм фермента константы скоростей ультразвуковой инактивации сначала практически не меняются при повышении температуры, затем резко возрастают и снова практически не меняются при дальнейшем повышении температуры. Этот факт, несомненно, указывает на происходящий в узком температурном интервале конформационный переход. Такой процесс в простейшем случае описывается схемой



где E_1H и E_2H — соответственно низкотемпературная и высокотемпературная формы фермента, k_{E_1H} и k_{E_2H} — соответствующие им константы скоростей ультразвуковой инактивации (не зависящие от температуры), K — константа равновесия между E_1H и E_2H . Можно показать [1], что в точке, соответствующей равенству концентраций E_1H и E_2H (т. е. $K = 1$, обозначим эту температуру T_c), справедливы следующие соотношения:

$$\Delta H = \frac{4RT_c^2}{k_{E_2H} - k_{E_1H}} \cdot \left. \frac{dk_{\text{инакт}}}{dT} \right|_{T=T_c}, \quad (4)$$

$$\Delta S = \frac{\Delta H}{T_c},$$

где T — абсолютная температура, R — газовая постоянная, ΔH и ΔS — энтальпия и энтропия конформационного перехода соответственно. На основании схемы (3), уравнения (4) и рис. 4 мы определили термодинамические параметры предполагаемого конформационного перехода (табл. 2).

Таблица 2

Параметры температурного конформационного перехода для α - и β -трипсинов (рН 4,2)

Форма трипсина	$k_{E_1H} \cdot 10^2$	$k_{E_2H} \cdot 10^2$	$T_c, \text{ К}$	ΔH при $T = T_c$, ккал/моль	ΔS при $T = T_c$, э. е.
	мин ⁻¹				
α	1,0	6,3	314	79	250
β	0,3	3,5	308	35	143

Как видно из рис. 4 и табл. 2, для обеих форм фермента конформационный переход (полностью обратимый в наших условиях) происходит в узком температурном интервале и характеризуется довольно высокими значениями энтальпии и энтропии, что свидетельствует о его кооперативном характере. Однако для α -трипсина по сравнению с β -трипсином конформационное изменение характеризуется, во-первых, более высокой тем-

температурой T_c , а во-вторых, гораздо более высокими значениями ΔH и ΔS . Этот факт, вероятно, указывает на то, что в случае α -трипсина в конформационный переход вовлечена существенно большая часть белковой глобулы, чем в случае β -трипсина. Таким образом, при расщеплении полипептидной цепи β -трипсина лишь в одной точке (превращение β -формы в α -форму [4]), к тому же удаленной от активного центра фермента, происходит резкое изменение характеристик динамической структуры его активного центра.

Сопоставляя исследованные ультразвуковым методом температурные конформационные переходы в α -химотрипсине [1] и трипсине, необходимо отметить, что между конформационными переходами в их активных центрах помимо количественных различий существует и принципиальное качественное различие. В α -химотрипсине указанный переход возможен лишь в каталитически активной форме активного центра фермента (при депротонировании имидазола гистидина-57, т. е. при щелочных значениях pH), в то же время в трипсине конформационный переход зафиксирован при pH 4,2, когда его активный центр находится в неактивной форме (имидазол гистидина-46 протонирован). Следовательно, механизмы температурных конформационных переходов в α -химотрипсине и трипсине существенно различаются.

Интересно отметить, что для α - и β -трипсинов, α -химотрипсина [1], а также гидролитического фермента пептилглинамидазы [2] при повышении температуры происходит значительное увеличение значения $k_{\text{накт}}$, т. е. при конформационном переходе всех четырех ферментов их активные центры раскрываются.

Таким образом, в настоящей работе с помощью разработанного нами ультразвукового метода исследования ферментов получена принципиально новая информация о конформационных переходах в активных центрах α - и β -трипсинов, индуцируемых изменениями pH или температуры. Результаты исследования свидетельствуют о том, что наряду с большим сходством имеются также существенные различия в свойствах активных центров этих форм фермента.

Экспериментальная часть

Трипсиноген (завод химических реактивов, г. Олайне, ЛатвССР) очищали от примесного трипсина по методике [20]. Разделение на фракции коммерческого препарата трипсина (Ленинградский мясокомбинат им. С. М. Кирова) проводили по методикам [4, 21]. При хроматографии фермента на SP-сефадексе С-50 обнаруживается шесть белковых пиков. Первый и последний полностью каталитически неактивны, остальные по мере элюции с колонки названы α -, β -, γ - и δ -трипсинами. δ -Трипсин, каталитическая активность которого в 7—10 раз ниже активности остальных форм, и γ -трипсин, присутствующий в относительно малом количестве, в настоящей работе не исследовались. Рехроматография α - и β -трипсинов, проведенная в более мягких условиях (пониженная концентрация исходного элюирующего раствора с последующей градиентной элюцией), не обнаружила дополнительного разделения белковых пиков.

Субстрат трипсина, этиловый эфир *N*-бензоил-*L*-аргинина, — коммерческий препарат фирмы «Reanal». Краситель профлавиш (3,6-диаминоакридин) — коммерческий препарат фирмы ВДН.

Компоненты буферных смесей и неорганические соли — препараты «Реахим», марок ос. ч. или ч.д.а.

Источником ультразвука служил стационарный ультразвуковой генератор УТС-1М. Частота ультразвука 880 кГц, рабочая интенсивность 2 Вт/см². Кювету, содержащую озвучиваемый раствор, термостатировали; температура при озвучивании повышалась не более чем на 1°. Объем раствора 10 мл (в цилиндрической кювете с дном из тонкого стекла диамет-

ром 20 мм и высотой 100 мм). Озвучивание проводили в буфере 0,01 М $\text{CH}_3\text{COONa} + 0,01 \text{ М NaH}_2\text{PO}_4 + 0,01 \text{ М H}_3\text{BO}_3$, pH 4,2; 15° , $[\text{E}]_0 = 1 \cdot 10^{-7} \text{ М}$.

Относительная активность (А) α - и β -трипсинов — выраженная в условных единицах начальная скорость ферментативного гидролиза этилового эфира N-бензоил-L-аргинаина, измеренная при помощи двухлучевого самопишущего спектрофотометра «Hitachi EPS-3» (Япония) при длине волны 253 нм. Для озвученного фермента А принимали за 100%. Типичный эксперимент проводили следующим образом: в спектрофотометрическую кварцевую кювету вводили 2 мл раствора субстрата ($5 \cdot 10^{-4} \text{ М}$) в буфере ($5 \cdot 10^{-2} \text{ М}$ трис-НСI + $1 \cdot 10^{-2} \text{ М CaCl}_2$) при pH 7,8, термостатировали в течение 3 мин при 25° , а затем добавляли 0,1 мл раствора фермента.

Определение величин pK_1 и pK_2 . Из рис. 2, а видно, что значения pK ионогенных групп, контролирующих процесс ультразвуковой инактивации, сильно (не менее чем на 4 единицы pH) различаются. Следовательно, в диапазоне pH 1—5 можно рассматривать первое равновесие в схеме (2), а в диапазоне pH 6—10 — второе (в первом случае ничтожна доля молекул E^- , а во втором — EH_2^+). Обработка первого равновесия дает уравнение $k_{\text{инакт}} = k_{\text{EH}_2^+} + K_1 (k_{\text{инакт}} - k_{\text{EH}}) / [\text{H}^+]$, из которого в координатах $k_{\text{инакт}} \div (k_{\text{инакт}} - k_{\text{EH}}) / [\text{H}^+]$ можно определить $k_{\text{EH}_2^+}$ и K_1 . Обработка второго равновесия дает уравнение $k_{\text{инакт}} = k_{\text{E}^-} + (k_{\text{инакт}} - k_{\text{EH}}) [\text{H}^+] / K_2$, из которого в координатах $k_{\text{инакт}} \div (k_{\text{инакт}} - k_{\text{EH}}) [\text{H}^+]$ можно определить k_{E^-} и K_2 (k_{EH} в обоих случаях определяли непосредственно из данных рис. 2).

Для определения потенциальной ферментативной активности трипсиногена раствор зимогена ($4 \cdot 10^{-6} \text{ М}$) инкубировали с трипсином ($2 \cdot 10^{-6} \text{ М}$) при pH 8,0 (0,01 М $\text{KH}_2\text{PO}_4 + 1 \cdot 10^{-3} \text{ М CaCl}_2$) и 20° в течение 12 ч. Концентрацию появившегося трипсина измеряли по скорости гидролиза этилового эфира N-бензоил-L-аргинаина (см. выше).

ЛИТЕРАТУРА

1. Клибанов А. М., Мартинек К., Березин И. В. (1974) Биохимия, 39, 878—887.
2. Berezin I. V., Klibanov A. M., Klyosov A. A., Martinek K., Svedas V. K. (1975) FEBS Lett., 49, 325—328.
3. Эльшиер И. Е. (1963) Ультразвук. Физико-химическое и биологическое действие, с. 33—41, Физматгиз, М.
4. Schroeder D. D., Shaw E. (1968) J. Biol. Chem., 243, 2943—2949.
5. Berezin I. V., Varfolomejev S. D., Klibanov A. M., Martinek K. (1974) FEBS Lett., 39, 329—331.
6. Kasserra H. P., Laidler K. J. (1969) Can. J. Chem., 47, 4031—4039.
7. Kasserra H. P., Laidler K. J. (1969) Can. J. Chem., 47, 4021—4029.
8. Scrimger S. T., Hofmann T. (1967) J. Biol. Chem., 242, 2528—2533.
9. Davie E. W., Neurath H. (1955) J. Biol. Chem., 212, 545—521.
10. Poland D. C., Scheraga H. A. (1965) Biopolymers, 3, 401—413.
11. Walsh K. A. (1970) in Methods in Enzymology (Perlmann G. E. and Lorand L., eds.), vol. 19, pp. 41—63, Acad. Press, N. Y.
12. Beardslee R. A., Zahnley J. C. (1973) Arch. Biochem. and Biophys., 158, 806—811.
13. Anson M. L., Mirsky A. E. (1934) J. Gen. Physiol., 17, 393—402.
14. Lazdunski M., Delaage M. (1967) Biochim. et biophys. acta, 140, 417—434.
15. D'Albis A. (1964) C. r. Acad. sci., 249, 1779—1785.
16. Pantaloni D., D'Albis A., Dessen P. (1968) J. Chem. Phys., 65, 196—205.
17. Ghiron C. A., Sellers D. R. (1970) Photochem. and Photobiol., 12, 433—437.
18. Gabel D., Kasche V. (1972) Biochem. and Biophys. Res. Commun., 48, 1011—1018.
19. Nureddin A., Inagami T. (1975) Biochem. J., 147, 71—81.
20. Айсиян Р. Б., Казанская Н. Ф., Березин И. В. (1974) Биохимия, 39, 577—584.
21. Березин И. В., Казанская Н. Ф., Ларникова Н. И. (1970) Биохимия, 35, 983—988.

Поступила в редакцию
13.X.1975

После переработки
24.XII.1975

A COMPARATIVE STUDY OF THE DYNAMIC STRUCTURE OF THE ACTIVE
CENTRES OF PROTEOLYTIC ENZYMES BY ULTRASONIC METHOD.
THE EFFECT OF ULTRASOUND ON α -TRYPSIN, β -TRYPSIN AND TRYPSINOGEN

KLIBANOV A. M., KAZANSKAYA N. F., LARIONOVA N. I.,
MARTINEK K., BEREZIN I. V.

*Laboratory of Bioorganic Chemistry, M. V. Lomonosov
State University, Moscow*

It has been shown that under the action of cavitation ultrasound, in diluted solutions of α - and β -trypsins there occurs irreversible inactivation of the enzymes, which is a first order reaction. This allowed to study pH and temperature-induced conformational changes in the active centres of both forms of the enzyme using the ultrasonic method previously suggested (Biokhimiya, 39, 878 (1974)) for investigation of the dynamic structure of the active centres of the enzymes. The curve of the pH—dependence of the rate constant of ultrasonic inactivation (k_{inact}) for α - and β -trypsins has a bell-shaped pattern. This is interpreted in terms of the existence of three conformational states of the active centres of trypsin, transition between which is controlled by ionogenic groups with pK 1.9—2.0 and pK 9.1 (no such transitions could be registered in trypsinogen by the ultrasonic method). The study of the temperature dependence for k_{inact} has shown that at 41° in the case of α -trypsin and at 35° in the case of β -trypsin in the active centres of the enzymes there occurs a reversible conformational transition with ΔH and ΔS 79 kcal/mole, 250 e. u. and 35 kcal/mole, 113 e. u., respectively. The results obtained by the ultrasonic method have allowed to compare the dynamic structures of the active centres of α - and β -trypsins, as well as trypsin and chymotrypsin.
