



УДК 577.152.04

© 1994 Е. В. Кудряшова, А. Б. Белова,
А. А. Виноградов, В. В. Можаяев

ВЛИЯНИЕ ГИДРОФОБНЫХ СВОЙСТВ ПОВЕРХНОСТИ БЕЛКА НА ЕГО
УСТОЙЧИВОСТЬ К ДЕНАТУРАЦИИ ОРГАНИЧЕСКИМИ
РАСТВОРИТЕЛЯМИ (НА ПРИМЕРЕ МОДИФИЦИРОВАННОГО
 α -ХИМОТРИПСИНА)

*Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова,
химический факультет*

Ключевые слова: α -химотрипсин, ковалентная модификация, органический растворитель, денатурация, гидрофобность.

Изучена каталитическая активность гидрофилизованного химотрипсина в смесях, образованных водой и смешивающимся с ней органическим растворителем. Модификация химотрипсина гидрофильными реагентами: глицериновым альдегидом, ангидридами янтарной и пиромеллитовой кислот, а также глюкозамином — увеличивает устойчивость химотрипсина к денатурирующему действию органических растворителей. Найдена корреляция между устойчивостью белка к действию органических растворителей и изменением гидрофобности его поверхности. Стабильность фермента тем выше, чем более гидрофильный фрагмент вводится в его молекулу и чем выше степень модификации. При некоторой степени гидрофиллизации α -химотрипсина достигается предельный уровень его стабильности. Наиболее вероятная причина стабилизации — увеличение прочности связывания гидратной оболочки с функциональными группами гидрофилизованной поверхности белка.

Биокатализу в водно-органических средах в последние годы уделяется все большее внимание благодаря открывающимся широким перспективам его использования в химической, фармацевтической и пищевой промышленности, в медицине и химическом анализе [1].

Поскольку равновесие многих реакций органического синтеза в водных растворах смещено в неблагоприятную сторону, часто необходимо проводить эти реакции в системах с высоким содержанием органического компонента. Применение ферментативного катализа в таких средах ограничено тем, что высокие концентрации органических растворителей вызывают, как правило, денатурацию ферментов [2—4].

В литературе предложена термодинамическая модель денатурации белков под действием органического растворителя [5]. Модель построили, исходя из следующих предположений: 1) молекула фермента в водном растворе окружена гидратной оболочкой; в ней молекулы воды связаны с функциональными группами фермента за счет нековалентных взаимодействий; 2) главная причина денатурации белка — нарушение его гидратной оболочки; 3) денатурация происходит после того, как

некоторое критическое количество молекул воды гидратной оболочки замещается на молекулы органического растворителя [6].

В рамках этих представлений, чем прочнее белок удерживает свою гидратную оболочку, тем выше должна быть его устойчивость к действию органических растворителей [7].

Для того чтобы увеличить прочность связывания молекул воды на поверхности фермента, предложен ряд подходов [6]. Одним из наиболее эффективных является введение в поверхностный слой белка методом ковалентной модификации гидрофильных (заряженных или полярных) групп [7]. Так, ранее было показано, что при гидрофилизации поверхности фермента удается существенно повысить его термостабильность [8].

Гидрофилизация поверхности — один из приемов изменения термостабильности и конформационной стабильности модифицированных белков. Наряду с этим на стабильность может влиять изменение конформации белка в результате химической модификации, модификация «ключевых» групп, образование дополнительных водородных связей или солевых мостиков, усиление гидрофобных взаимодействий и т.д. [9].

По-видимому, перечисленные выше механизмы стабилизации могут иметь место также при денатурации белков в водно-органических смесях. Однако влияние химической модификации ферментов на их устойчивость к денатурирующему действию органических растворителей изучено недостаточно.

Настоящая работа посвящена применению ковалентной модификации для изучения взаимосвязи гидрофобных свойств белков и их устойчивости к действию органических растворителей.

Гидрофобность химотрипсина изменяли двумя способами. Во-первых, проводили модификацию реагентами с различной гидрофобностью. Для гидрофилизации использовали восстановительное алкилирование аминокрупп глицериновым альдегидом, ацилирование ангидридами янтарной и пиромеллитовой кислот и модификацию карбоксильных групп химотрипсина глюкозамином.

Другой путь изменения гидрофобности фермента — изменение степени модификации, т. е. числа прореагировавших групп химотрипсина. Удаётся достичь предельно высокой степени модификации (вплоть до 15 остатков на молекулу) без существенной потери каталитической активности фермента. Все изученные препараты содержали более 50% каталитически активной фракции.

Для оценки изменения гидрофобности поверхности химотрипсина мы применяли предложенный Лео и Ганшем [10] расчет инкрементов гидрофобности функциональных групп и атомов, основанный на принципе аддитивности свободных энергий [11]. Величины $\Delta\Delta G$ соответствуют свободным энергиям переноса вещества из воды в октанол [10]. Отрицательные значения $\Delta\Delta G$ соответствуют гидрофобным остаткам, а положительные — гидрофильным.

В табл. 1 представлены реагенты, использованные для модификации, и рассчитанные значения инкрементов гидрофобности ($\Delta\Delta G$) для остатков, вводимых при модификации. Чтобы оценить изменения гидрофобности поверхности химотрипсина, эти инкременты умножали на экспериментально определенную степень модификации, исходя из того, что все модифицированные группы расположены на поверхности белка. При расчете гидрофобных инкрементов учитывали изменения гидрофобности функциональных групп фермента в результате модификации, вызванные исчезновением заряда при ацилировании аминокрупп. Количество введенных остатков определяли титрованием свободных (немодифицированных) аминокрупп тринитробензолсульфокислотой (TNBS) [12].

Введение полярных и заряженных групп (при модификации пиромеллитовым и янтарным ангидридами, глицериновым альдегидом) существенно увеличивает гидрофильность белка, а неполярных групп (модификация уксусным альдегидом) гидрофобизует химотрипсин. Это следует непосредственно из экспериментальных оценок поверхностной гидрофобности, основанных на связывании белком флуоресцентного красителя (*cis*-паринаровой кислоты) [8].

Таблица 1

Реагенты, использованные для модификации химотрипсина, и рассчитанные значения инкрементов гидрофобности ($\Delta\Delta G$) групп, вводимых при модификации белка

Модифицирующий реагент	$\Delta\Delta G$, кДж/м	N^*	$\Delta\Delta G$, кДж/м
Пиромеллитовый ангидрид	43,9	15	658
Глицериновый альдегид	9,1	3	27
»	9,1	8	73
»	9,1	12	109
Янтарный ангидрид	6,2	6	37
»	6,2	10	62
»	6,2	14	86
Уксусный альдегид	-8,1	6	-49

* N — степень модификации химотрипсина.

Таблица 2

Пороговые концентрации органических растворителей (C_{50} , % по объему) при денатурации препаратов модифицированного химотрипсина

Модификатор	Степень модификации	Растворитель			
		этанол	1,4-диоксан	пропанол-2	1,3-бутандиол
—	—	36	7	33	50
Глицериновый альдегид	3	34	—	32	50
	8	—	—	50	70
	12	—	32	—	76
	13	54	27	50	70
Пиромеллитовый ангидрид	6	—	—	45	49
	10	—	—	—	66
	14	—	—	—	65
Глюкозамин	6—8	—	—	—	62

Частичная модификация функциональных групп белка приводит к образованию большого числа форм, различающихся по составу и свойствам [8]. Эти формы различаются как степенью модификации, так и положением модифицированных групп в молекуле белка. Химотрипсин, модифицированный янтарным ангидридом (6 остатков на молекулу), был разделен ионообменной хроматографией на 7 фракций. В результате получили препараты, различающиеся по гидрофобности в широком диапазоне. Степени модификации белков были определены титрованием аминокрупп TNBS.

Для определения каталитических свойств химотрипсина в водно-органических смесях в качестве субстрата использовали *n*-нитроанилид *N*-бензоил-*L*-тирозина. Для этого субстрата скоростным лимитирующей стадией является ацилирование активного центра фермента [13] и, следовательно, на максимальную скорость гидролиза не влияет присутствие в системе дополнительных нуклеофилов, к которым относятся некоторые органические растворители.

Зависимость каталитической активности, выраженной величиной V_{\max} , от концентрации органического растворителя имеет пороговый характер (рис. 1—3). Как и в предыдущих работах [5], в качестве количественной характеристики стабильности химотрипсина в органических растворителях использовали «поро-

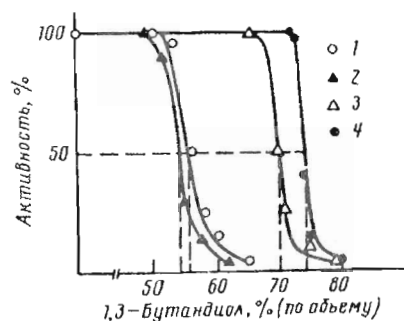


Рис. 1

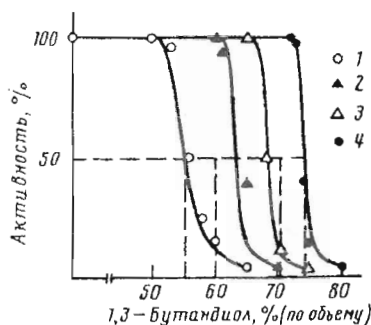


Рис. 2

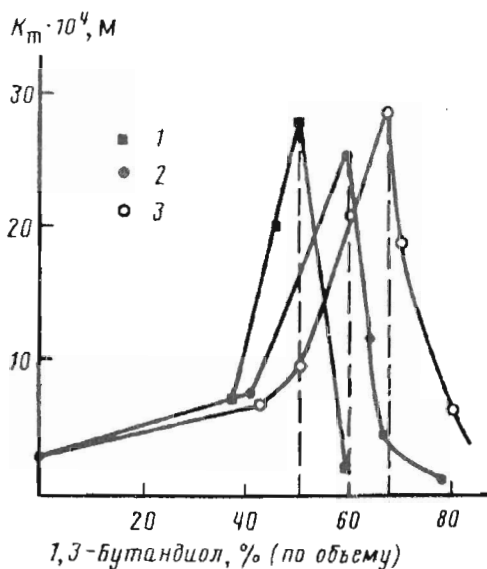


Рис. 3

Рис. 1. Зависимость от концентрации 1,3-бутандиола каталитической активности препаратов химотрипсина, модифицированных глицериновым альдегидом, со степенью модификации 0 (1), 3 (2), 8 (3), 12 (4)

Рис. 2. Зависимость от концентрации 1,3-бутандиола каталитической активности препаратов химотрипсина, модифицированного глюкозаминном (2), янтарным ангидридом (3), глицериновым альдегидом (4) (степени модификации препаратов 6—8). Кривая 1 — нативный химотрипсин

Рис. 3. Зависимость от концентрации 1,3-бутандиола эффективной константы Михаэлиса (K_m) для химотрипсина, модифицированного ангидридом янтарной кислоты, со степенью модификации 6 (1), 10 (2), 14 (3)

говую» концентрацию C_{50} , т. е. концентрацию органического растворителя, при которой фермент теряет половину своей активности.

Зависимость K_m от концентрации органического растворителя имеет максимум (рис. 4). Максимальное значение K_m достигается при концентрации органического растворителя, соответствующей величине C_{50} . При этой концентрации система переходит в состояние с другим значением V_{max} . Таким образом, при увеличении концентрации органического растворителя до C_{50} , когда K_m изменяется при неизменной максимальной скорости, эти изменения можно рассматривать как конкурентное ингибирование средой (формальным признаком конкурентного ингибирования является изменение K_m при постоянной максимальной скорости реакции). Дальнейшее увеличение концентрации органического растворителя приводит к изменению как K_m , так и V_{max} .

Для количественной оценки устойчивости фермента к действию органических растворителей использовали зависимость V_{max} от концентрации органических растворителей [5, 7, 13] (табл. 2).

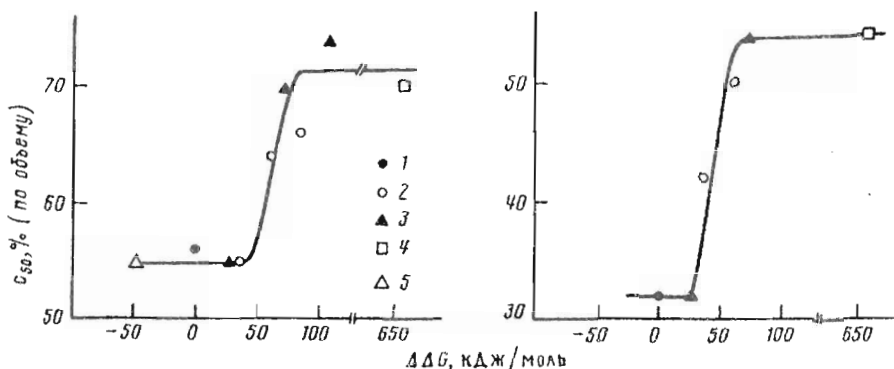


Рис. 4. Корреляция устойчивости к денатурации органическими растворителями (C_{50} , %) препаратов химотрипсина с их поверхностной гидрофобностью ($\Delta\Delta G$). Модифицирующие реагенты — янтарный ангидрид (2), глицириновый альдегид (3), пиромеллитовый ангидрид (4), уксусный альдегид (5). 1 — нативный химотрипсин

На примере химотрипсина, модифицированного глицириновым альдегидом, показано, что устойчивость модифицированного фермента к денатурации 1,3-бутандиолом тем выше, чем больше степень модификации белка, т. е. чем выше его гидрофильность (рис. 1).

Для препаратов с близкими степенями модификации стабилизационный эффект тем выше, чем гидрофильнее модифицирующий остаток (рис. 2).

Полный список изученных систем представлен в табл. 2.

Рис. 4 отражает корреляцию устойчивости химотрипсина к действию органических растворителей с его поверхностной гидрофобностью, рассчитанной согласно теории Ганша и выраженной величиной $\Delta\Delta G$.

Оказалось, что увеличение гидрофильности химотрипсина значительно повышает его устойчивость к денатурации органическими растворителями и что существует некоторое значение $\Delta\Delta G$, равное 90—110 кДж/моль, увеличение которого уже не приводит к изменениям стабильности фермента. Важно также, что стабилизационный эффект различных по структуре введенных модификацией остатков полностью описывается их инкрементами гидрофобности и степенью модификации.

Одной из вероятных причин стабилизации, по-видимому, является то, что в результате модификации аминокрупп сильно повышается гидрофильный характер его поверхности в целом и в связи с этим увеличивается прочность связывания гидратной оболочки с поверхностью фермента.

То, что при некоторой степени гидрофиллизации белка достигается предельный уровень его стабильности, указывает на смену механизма денатурации при достаточно высоких концентрациях органического растворителя.

Гидрофиллизация химотрипсина сходным образом влияет на его термостабильность [8]. Сходство указанных выше корреляций и численных значений $\Delta\Delta G$, при которых наблюдается «запределивание», может указывать на сходство механизмов денатурации и стабилизационного эффекта гидрофиллизации.

Экспериментальная часть

В работе использовали бычий химотрипсин (КФ 3.4.21.1) и *n*-нитроанилид *N*-бензоил-*L*-тирозина (Sigma, США), *D*, *L*-глицириновый альдегид (Reanal, Венгрия), пиромеллитовый ангидрид (Sigma, США), янтарный ангидрид («Союзреактив», СССР), цианборгидрид натрия, тринитробензолсульфокислоту (Sigma, США), а также сефадекс G-25, G-50 (Pharmacia, Швеция), DEAE-Toyopearl 650M (Toyo Soda, Япония).

1,3-Бутандиол (Ferak, Германия) использовали без предварительной очистки,

1,4-диоксан («Союзреактив», СССР) перегоняли в токе аргона, затем сутки выдерживали над алюмогидридом лития, сушили молекулярным ситом 4 Å, а затем повторно перегоняли в токе аргона. Пропанол-2 и этанол («Союзреактив», СССР) очищали перегонкой.

Модификация химотрипсина. Химотрипсин ацилировали янтарным ангидридом по методике [14]. К 10 мл 40 мкМ раствора белка в 0,1 М буфере (KH_2PO_4 , pH 8) медленно добавляли 1 мл 2 мМ раствора ангидрида соответствующей кислоты. Смесь инкубировали при 4° С в течение 4 ч, поддерживая pH добавлением раствора щелочи. Белок далее отделяли от низкомолекулярных компонентов диализом. Химотрипсин, модифицированный янтарным ангидридом, фракционировали на ионообменном носителе DEAE-Toyopearl 650M, элюируя раствором NaCl (градиент концентрации 0—1 М). Колонку предварительно уравнивали стартовым буфером (0,05 М NaH_2PO_4 , pH 8).

Модификацию глицериновым альдегидом проводили по видоизмененной методике Сондерса и Хедлунда [15], которая описана в работе [8]. К $4 \cdot 10^{-4}$ М раствору химотрипсина в буфере (0,1 М KH_2PO_4 , 0,05 М N-ацетил-L-тирозина, pH 8,4) добавляли 10—1000-кратный молярный избыток альдегида и 100-кратный избыток цианборгидрида натрия. Реакционную смесь инкубировали 30 мин при комнатной температуре, после чего белок, отделенный от низкомолекулярных компонентов реакционной смеси путем диализа против 1 мМ HCl, лиофилизировали.

Спектрофотометрическое определение аминокрупп в химотрипсине с помощью тринитробензолсульфокислоты (TNBS) [12]. В спектрофотометрическую кювету, содержащую 3 мл 0,1 М боратного буфера (pH 9,5), добавляли 0,05 мл 1 М раствора TNBS, вносили аликвоту белка (раствор белка не должен содержать цианборгидрид натрия, так как он образует окрашенные продукты с TNBS), перемешивали и следили за изменением поглощения при 420 нм в течение 20—30 мин (кювета сравнения содержит 3 мл буфера и 0,05 мл раствора TNBS). Кривую изменения оптической плотности экстраполировали к начальному моменту и из полученного значения определяли число свободных аминокрупп, принимая молярный коэффициент поглощения аддукта с TNBS равным $13\,000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

Определение каталитической активности химотрипсина в водно-органических смесях. Скорость гидролиза *n*-нитроанилида N-бензоил-L-тирозина определяли спектрофотометрически при 375 нм с учетом молярного коэффициента поглощения *n*-нитроанилида в данной среде [14].

Максимальную скорость ферментативной реакции определяли, экстраполируя зависимость скорости реакции от концентрации субстрата. Реакционные смеси содержали фермент 1,25 мкМ и субстрат — от 50 до 400 мкМ (pH 7, 25° С).

Авторы выражают благодарность А. В. Левашову и В. Ю. Левицкому (химический факультет МГУ им. М. В. Ломоносова) за обсуждение данной работы и Р. В. Рарию (химический факультет МГУ им. М. В. Ломоносова) за препарат химотрипсина, модифицированного глюкозаминном.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Введение в прикладную энзимологию/Ред. И. В. Брезин, К. Мартинек. М.: Изд-во МГУ, 1982. С. 384.
2. *Mozhaev V. V., Martinek K.* // *Enzyme Microb. Technol.* 1982. V. 4. P. 299—309.
3. *Клячко Н. Л., Мартинек К.* // *Докл. Appl. Microbiol.* 1983. V. 29. P. 1—23.
4. *Мартинек К., Семенов А. Н.* // *Успехи химии.* 1981. Т. 50. С. 1376—1406.
5. *Kamelnitsky Yu. L., Mozhaev V. V., Belova A. B., Sergeev M. V., Martinek K.* // *Eur. J. Biochem.* 1991. V. 198. P. 31—41.
6. *Хмельницкий Ю. Л., Левашов А. В., Клячко Н. Л., Мартинек К.* // *Биотехнология.* 1988. Т. 4. С. 669—696.

7. *Mozhaev V. V., Siksнис V. A., Melik-Nubarov N. C., Galantaite N. Z., Denis G. J., Butkus P. E., Martinek K.*//*Eur. J. Biochem.* 1988. V. 173. P. 147—154.
8. *Мелик-Нубаров Н. С., Шикшис В. А., Слепнев В. И., Щеголев А. А., Можаяв В. В.*//*Молекулярн. биология.* 1990. Т. 24. С. 346—357.
9. *Mozhaev V. V., Berezin I. V., Martinek K.*//*CRC Crit. Revs Biochem.* 1988. V. 23. P. 235—281.
10. *Leo A., Hansch C., Elkins D.*//*Chem. Rev.* 1971. V. 71. P. 525—616.
11. *Hansch C., Leo A.* *Substituent Constants for Correlation Analysis in Chemistry and Biology.* N. Y.: Wiley, 1979. P. 1—67.
12. *Fields R.*//*Biochemistry.* 1971. V. 124. P. 581—590.
13. *Родионова М.В., Белова А. Б., Можаяв В. В., Березин И. В.*//*Биотехнология.* 1988. Т. 4. С. 69—72.
14. *Riordan J. F., Valee B. L.*//*Meth. Enzymol.* 1967. V. 11. P. 565—570.
15. *Saunders S., Hedlund B. E.*//*Biochemistry.* 1984. V. 23. P. 1457—1461.

Поступила в редакцию
9.VII.1993

*E. V. Kudryashova, A. B. Belova, A. A. Vinogradov,
V. V. Mozhaev*

**THE INFLUENCE OF PROTEIN SURFACE HYDROPHOBICITY ON ITS
STABILITY IN ORGANIC SOLVENTS
(WITH α -CHYMOTRYPSIN AS EXAMPLE)**

Department of Chemistry, M. V. Lomonosov Moscow State University, Moscow

Catalytic activity of covalently modified α -chymotrypsin in water/cosolvent solutions was investigated. The stability of chymotrypsin increases upon modification with hydrophilic reagents, such as glyceraldehyde, pyrometallitic and succinic anhydrides, and glucosamine. Correlation was observed between the protein's stability in organic solvents and the degree of hydrophilization of the protein's surface. The protein is the more stable, the higher are the modification degree and the hydrophilicity of the modifying residue. At a certain critical hydrophilization degree of chymotrypsin a limit of stability is achieved. The stabilization effect can be accounted for by the fact that the interaction between water molecules on the surface and protein's functional groups become stronger in the hydrophilized protein.