



УДК 577.152.344.04

© 1994 А. А. Панова, В. Ю. Левицкий, В. В. Можаяев

**НАТИВНЫЙ, МОДИФИЦИРОВАННЫЙ И ИММОБИЛИЗОВАННЫЙ
ХИМОТРИПСИН В ХАОТРОПНЫХ СРЕДАХ.
ПРЕДЕЛЫ СТАБИЛИЗАЦИИ***Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова*

Ключевые слова: химотрипсин, модификация, иммобилизация, стабилизация.

С целью стабилизации химотрипсина против необратимой инактивации при повышенной температуре были применены методы химической модификации и ковалентной иммобилизации в комбинации с методом изменения хаотропности среды. Найдено, что при совместном использовании методов химической модификации и хаотропности среды наблюдается тот же предельный уровень стабилизации, что и для каждого из этих методов в отдельности. Предельный уровень стабилизации химотрипсина, достигаемый методом иммобилизации, превышает предельный уровень, достигаемый двумя другими методами. Наибольший эффект стабилизации иммобилизованного химотрипсина хаотропными соединениями — увеличение стабильности по отношению к нативному ферменту более чем на четыре порядка — наблюдается для фермента, минимально связанного с матрицей.

Стабилизация химотрипсина указанными методами объяснена подавлением необратимых конформационных процессов инактивации.

Применение ферментов на практике во многих случаях сдерживается их низкой стабильностью. В связи с этим существенное значение приобретает разработка общих принципов стабилизации ферментов. Важным шагом в этом направлении является повышение их термостабильности.

Эффективные методы повышения термостабильности — изменение хаотропных свойств среды за счет добавления низкомолекулярных соединений, химическая модификация и ковалентная иммобилизация [1—5]. В качестве величины, определяющей стабильность фермента, обычно используют константу скорости его необратимой инактивации k_{in} [3—5].

Характер воздействия солей на конформацию белка в растворе в отсутствие специфических взаимодействий, например селективного связывания ионов с белком, определяется всаливающей/высаливающей способностью этих соединений, связанной с их положением в ряду Гофмейстера. Всаливающими, или хаотропными, называют вещества, улучшающие растворимость гидрофобных соединений (в том числе гидрофобных фрагментов поверхности белковой молекулы), высаливающими, или космотропными, — вещества, ухудшающие растворимость гид-

рофобных соединений [6]. В качестве меры всаливающей/высаливающей силы компонентов раствора принимается [3] константа k , уравнения Сеченова, которая характеризует изменение растворимости S вещества в растворе соли концентрации c , по сравнению с его растворимостью S_0 в чистой воде:

$$k, c, = \lg S_0/S. \quad (1)$$

Высаливающие соединения имеют положительную величину k , а всаливающие — отрицательную. Было показано [3], что при добавлении к раствору химотрипсина низкомолекулярных соединений различной природы наибольшая стабилизация фермента достигается в концентрированных всаливающих растворах. Причем начиная с некоторой всаливающей силы раствора дальнейшее добавление хаотропных соединений уже не приводит к дополнительной стабилизации, т. е. наблюдается предел стабилизации фермента хаотропными средами ($\lg k_{in} \sim -1,75$ при 76°C).

Модификация поверхности белка гидрофильными реагентами, как было показано на примере химотрипсина [4], повышает его устойчивость к термоинактивации, в то время как гидрофобная модификация, возможно, даже уменьшает термостабильность химотрипсина [4]. Для оценки изменения гидрофобности поверхности белка в результате ковалентной модификации используют значения инкрементов гидрофобности $\Delta\Delta G_h$ для введенных групп, рассчитанные по Ганшу [4, 7]. Отрицательные значения $\Delta\Delta G_h$ соответствуют гидрофобным группам, а положительные — гидрофильным. Было показано, что при достаточно сильной гидрофилизации химотрипсина достигается предельный для данного метода стабилизации уровень стабильности фермента ($\lg k_{in} \sim -1,8$ при 76°C).

Интересен подход к стабилизации, основанный на многоточечном закреплении фермента на полимерном носителе, например методом сополимеризационной иммобилизации [5, 8, 9]. На примере трипсина была исследована зависимость стабильности ковалентно иммобилизованного фермента от числа связей с носителем [5] и найдено, что увеличение степени «пришивки» фермента к носителю приводит к стабилизации фермента вплоть до достижения предельного уровня ($\lg k_{in} \sim -3,15$ при 60°C).

В данной работе мы исследовали стабильность химотрипсина в условиях совместного воздействия химической модификации или ковалентной иммобилизации фермента и изменения хаотропности среды.

1. Кинетическая схема инактивации. Выбор условий термоинактивации. Было показано [1, 2], что в широком диапазоне температур поведение химотрипсина, в частности его стабильность, описывается кинетической схемой:



где N — нативная конформация фермента, преобладающая при низких температурах, D — обратимо денатурированная «высокотемпературная» конформация, I_1 и I_2 — их необратимо инактивированные формы. Физическими методами было подтверждено существование обратимого перехода $N \rightleftharpoons D$ и показано, что он связан с разворачиванием молекулы фермента [1, 2]. При всех температурах константа скорости необратимой инактивации k_1 значительно больше k_2 , т. е. форма D существенно более стабильна по отношению к необратимой термоинактивации. В рамках этой схемы наблюдаемая константа скорости необратимой инактивации k_{in} равна:

$$k_{in} = \frac{k_1}{(1 + K)} + \frac{Kk_2}{(1 + K)}. \quad (3)$$

При низких температурах (до 50° С) $K \sim 0$ и $k_{in} = k_1$, т. е. происходит термоинактивация формы N . При высоких температурах (выше 65° С) $K \gg 1$ и термоинактивация определяется кинетикой инактивации «высокотемпературной» формы D .

Выбор температуры термоинактивации (76° С) определялся тем, что для большинства изучаемых систем при 76° С химотрипсин находится главным образом в своей более стабильной конформации D [3], вследствие чего при этой температуре скорости необратимой инактивации нативного химотрипсина в солевых системах, а также модифицированного или иммобилизованного химотрипсина не слишком высоки, что позволяет использовать обычные кинетические методы. (Скорость необратимой инактивации нативного химотрипсина в отсутствие солей при 76° С высока, и используемыми нами методами ее измерить невозможно. В этом случае значение логарифма k_{in} лежит выше предела чувствительности метода, обозначенного на наших графиках штриховой линией).

2. Стабилизация модифицированного химотрипсина в хаотропных средах. Для изучения действия хаотропных соединений на термостабильность модифицированного фермента нами были получены препараты химотрипсина, гидрофобизованного метакрилоилхлоридом (степень модификации 2) и гидрофилизированного глицериновым альдегидом (степень модификации 8). В соответствии с обнаруженной ранее зависимостью [4] гидрофобизованный фермент (рис. 1, точка В) характеризуется такой же низкой стабильностью, как и нативный (рис. 1, точка А). Стабильность гидрофилизированного химотрипсина (рис. 1, точка С) выше стабильности нативного фермента, но ниже предельного уровня стабилизации модификацией.

Действие всаливающих агентов на термостабильность модифицированного химотрипсина показано стрелками на рис. 1. Видно, что в присутствии роданида калия стабильность гидрофобизованного фермента значительно повышается (рис. 1, точка 1) и становится сравнимой с предельной стабильностью, достигаемой методом модификации. Добавление мочевины и хлористого гуанидиния к частично стабилизированному гидрофилизацией химотрипсину увеличивает стабильность фермента до достижения того же уровня стабилизации (рис. 1, точки 2 и 3).

Тот факт, что совместное влияние на химотрипсин хаотропной среды и модификации ограничено общим пределом стабилизации, можно рассматривать как подтверждение предположения [3] о сходстве механизмов стабилизации фермента в результате действия всаливающих агентов и химической модификации. Полагают [3, 4], что в обоих случаях при температуре инактивации (76° С) фермент находится в развернутой форме D , защищаемой от необратимых конформационных изменений, происходящих при инактивации по механизму «неправильного сворачивания» [8], либо «всаливанием» гидрофобных групп поверхности в хаотропных системах [3], либо введением гидрофильных «поплавок» на поверхность белка [4].

3. Стабильность иммобилизованного химотрипсина в хаотропных средах. Для изучения стабильности иммобилизованного химотрипсина в хаотропных средах были получены модифицированные метакрилоилхлоридом производные фермента со степенью модификации аминокрупп 15, 40 и 90% (2, 6 и 13 модифицированных групп из 15 возможных), которые иммобилизовали в полиакриламидном геле (ПААГ) по методу радикальной сополимеризации [5, 9, 10]. Можно полагать, что степень метакрилоилирования соответствует числу связей, которыми фермент «грядит» к гелю [11].

Зависимость константы скорости необратимой термоинактивации ковалентно иммобилизованного в ПААГ химотрипсина от числа связей с носителем (рис. 2) аналогична соответствующей закономерности, полученной ранее для трипсина [5]. Предельный уровень стабилизации, достигаемый методом иммобилизации,

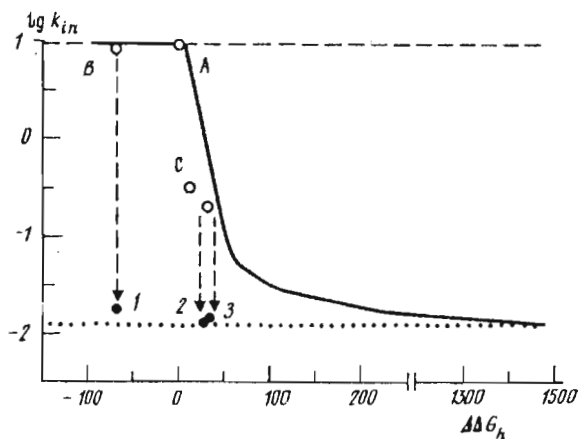


Рис. 1

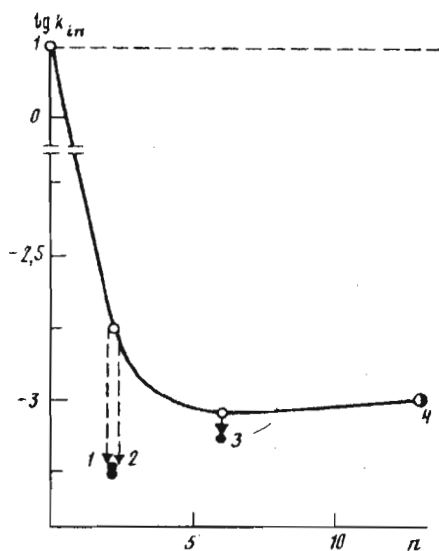


Рис. 2

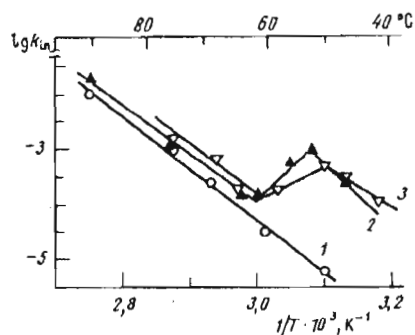


Рис. 3

Рис. 1. Влияние хаотропных соединений 1 М KSCN (1), 4 М $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$ (2), 1 М $(\text{NH}_2)_2\text{NH}\cdot\text{HCl}$ (3) (показано стрелками) на скорость необратимой термоинактивации (lg k_{in}) нативного (А), гидрофобизованного (В) и гидрофилизованного (С) химотрипсина. Для сравнения приведена кривая зависимости lg k_{in} от суммарного изменения гидрофобности поверхности модифицированного химотрипсина (по данным работы [4]). Штриховой линией показан предел чувствительности метода определения k_{in} , пунктирной — предел изменения lg k_{in} . 76° С, рН 8,0

Рис. 2. Зависимость от числа связей с носителем логарифма константы скорости необратимой термоинактивации иммобилизованного химотрипсина (76° С, рН 8,0) в отсутствие и в присутствии хаотропных соединений 1 М KSCN (1, 4), 1 М $(\text{NH}_2)_2\text{NH}\cdot\text{HCl}$ (2), 4 М $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$ (3) (изменение стабильности показано стрелками). Штриховая линия — предел чувствительности метода определения k_{in}

Рис. 3. Зависимость константы скорости необратимой термоинактивации иммобилизованного в полиакриламидном геле химотрипсина от температуры в координатах Аррениуса. рН 8,0. Число связей фермента с носителем — 13 (1), 6 (2) и 2 (3)

превышает предельный уровень стабилизации химотрипсина, достигаемый рассмотренными выше методами (рис. 1).

Стабильность иммобилизованного химотрипсина в хаотропных средах также показана на рис. 2. Видно, что действие хаотропных соединений на иммобилизованный химотрипсин зависит от числа связей фермента с носителем. Так, в случае препарата химотрипсина, иммобилизованного 13 связями с носителем, добавление роданида калия не приводит к дополнительной стабилизации (рис. 2, точка 4). Для химотрипсина, иммобилизованного меньшим числом связей (2 и 6), наблюдается увеличение стабильности фермента в хаотропных средах (точки 1, 2 и 3), причем эффект стабилизации *превышает предельный уровень стабильности*, достигаемый методом иммобилизации. Это согласуется с предположением о том, что в рассматриваемых методах механизмы стабилизации белка против конформационной инактивации, обусловленной его «неправильным» сворачиванием, различны: подавление инактивации происходит либо путем «всаливания» молекулы фермента в хаотропных средах [3], либо путем увеличения ее жесткости при иммобилизации [5, 10].

С целью объяснения закономерностей, наблюдаемых для иммобилизованного химотрипсина в хаотропных средах, мы исследовали температурные зависимости стабильности этих препаратов (рис. 3). Видно, что для «пришитого» к матрице 13 связями фермента (кривая 1) рассматриваемая зависимость прямолинейна; уменьшение же числа связей с носителем (6 и 2 связи) приводит к появлению изломов (кривые 2 и 3 соответственно).

Для иммобилизованного фермента такие «пилообразные» зависимости обнаружены впервые. Ранее они наблюдались только для нативных и модифицированных препаратов химотрипсина и некоторых других ферментов [1, 2] и объяснялись в рамках кинетической схемы инактивации (2). Излом на аррениусовской зависимости k_d для иммобилизованного фермента, по-видимому, означает смену механизма его инактивации при повышении температуры в результате перехода нативной формы N в «высокотемпературную» конформацию D . Таким образом, при температуре 76°C (рис. 2) в препаратах с 2 и 6 связями с носителем фермент находится в конформации D и добавление в систему всаливающих агентов стабилизирует именно эту форму фермента. Тогда точки 1 и 2 на рис. 2 отвечают предельному уровню конформационной стабильности формы D .

Большое число связей с носителем (13 связей) жестко закрепляет молекулу фермента в ее «низкотемпературной» конформации N , делая ее практически неспособной к конформационным перестройкам. Следовательно, точка 4 на рис. 2, по-видимому, характеризует предел конформационной стабилизации нативной формы N химотрипсина.

Из представленных данных следует, что для получения наибольшей конформационной устойчивости химотрипсина к термоинактивации нужна не жесткая фиксация его в полимерной сетке, а более или менее свободное закрепление на носителе и последующая стабилизация всаливающими агентами, в результате чего достигается *предел стабилизации химотрипсина против конформационных процессов инактивации*. Этот предел соответствует увеличению стабильности нативного фермента на четыре порядка.

Инактивация такого стабилизированного против конформационного пути инактивации химотрипсина, по-видимому, обусловлена какими-либо более медленными, например химическими, процессами (такими, как нарушение дисульфидных связей, окисление аминокислотных остатков, чаще всего метионина и триптофана, дезамидирование остатков аспарагина и глутамина и др.) [12—14].

Авторы выражают благодарность А. В. Левашову (МГУ, кафедра химической энзимологии), Т. В. Ротановой и Л. М. Гинопдану (Институт биоорганической химии РАН) за ценные замечания в процессе обсуждения данной работы.

Экспериментальная часть

В работе были использованы химотрипсин фирмы Sigma и Ленинградского мясокомбината им. С. М. Кирова, этиловый эфир *N*-ацетил-*L*-тирозина (АТЭЕ), *D,L*-глицериновый альдегид, *N,N'*-метиленисакриламид, *N,N,N',N'*-тетраметилэтилендиамин, персульфат аммония (Reanal, Венгрия); хлорангидрид метакриловой кислоты (х. ч., «Реахим», перед употреблением перегоняли в вакууме); цианоборгидрид натрия, тринитробензолсульфокислота (TNBS; Sigma, США); акриламид (AA) (Koch-Light Lab, США).

Компоненты буферных растворов, соли, кислоты, щелочи, органические растворители («Реахим») степени чистоты не ниже х. ч.

Ферментативную активность химотрипсина определяли по начальной скорости гидролиза 10 мМ АТЭЕ в 0,1 М КСl (концентрация фермента $(0,1-10) \cdot 10^{-5}$) методом рН-статирования при рН 8,0 на рН-стате RTS 882 (Radiometer, Дания). Величина ошибки измерения не превышала 5%. При вычислении активности учитывали скорость спонтанного гидролиза АТЭЕ. При рН 8,0 скорость спонтанного гидролиза составляла не более 20% общей скорости.

Необратимая термоинактивация химотрипсина. 10 мл буфера, содержащего трис-НСl, фосфат и ацетат калия (5 мМ каждый), рН 8, инкубировали в термостатируемой ячейке при требуемой температуре 10—15 мин, после чего добавляли необходимое количество концентрированного раствора фермента (конечная концентрация фермента в буфере 0,1—10 мкМ). Через определенные промежутки времени из раствора отбирали пробы, быстро охлаждали в бане со льдом до 20° С и определяли остаточную ферментативную активность.

Кинетические данные линеаризовали в координатах: логарифм остаточной активности ($\lg A/A_0$, где *A* — текущая каталитическая активность, *A*₀ — активность до термоинактивации) против времени. Значение *k*_и определяли как тангенс угла наклона конечного линейного участка инактивационной кривой [3].

Восстановительное алкилирование аминокрупп химотрипсина глицериновым альдегидом. К 0,4 мл раствора химотрипсина ($8 \cdot 10^{-5}$ М) в 0,1 М фосфатном буфере, рН 8,4, содержащем 0,05 М *N*-ацетил-*L*-тирозин, добавляли 100-кратные молярные избытки (по отношению к белку) глицеринового альдегида и цианоборгидрида натрия, инкубировали при 20° С 30 мин, после чего диализовали против 1 мМ НСl. Специфическая активность химотрипсина при модификации уменьшалась не более чем в 2—3 раза.

Модификация химотрипсина метакрилоилхлоридом. К раствору фермента ($8 \cdot 10^{-5}$ М) в 0,2 М фосфатном буфере при рН 8,0 и 0° С добавляли порциями при перемешивании 30-кратный молярный избыток (по отношению к белку) метакрилоилхлорида, растворенного в диоксане, поддерживая рН и инкубируя раствор после каждой порции метакрилоилхлорида в течение 5 мин, после чего диализовали против 1 мМ НСl и лиофилизовали. Специфическая активность модифицированного химотрипсина составляла 70—80% от исходной. Степень модификации определяли титрованием оставшихся аминокрупп с помощью TNBS (см. ниже).

Получение химотрипсина, ковалентно иммобилизованного в полиакриламидном геле. В $4 \cdot 10^{-4}$ М растворе метакрилоилхимотрипсина (0,2 М КН₂РO₄, рН 8,0) растворяли 33 мас.% акриламида, 1,7 мас.% *N,N'*-метиленисакриламида и 0,15 мас.% *N,N,N',N'*-тетраметилэтилендиамина. Раствор охлаждали до 0° С и добавляли 0,24 мас.% персульфата аммония. Полимеризационную смесь разливали в тонкостенные стеклянные пробирки и полимеризовали в течение суток при 0° С. Полученный гель измельчали, давали набухнуть и промывали растворами 8 М мочевины и 3 М КСl, 0,001 М НСl, 0,2 М Na₂СО₃.

Спектрофотометрическое титрование аминокрупп химотрипсина. В спектрофотометрическую кювету, содержащую 3 мл 0,1 М боратного буфера (рН 9,5), добавляли 0,05 мл 1 М TNBS, вносили аликвоту белка, перемешивали и

следили за изменением оптического поглощения (420 нм, 20—30 мин) по отношению к раствору сравнения, не содержащему белок. Полученную кривую экстраполировали к начальному моменту времени и определяли количество свободных аминокрупп ($\epsilon = 1,3 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$ [15]) (предполагалось, что молярный коэффициент поглощения при модификации белка не меняется).

Определение активности иммобилизованного химотрипсина. Точную навеску измельченного набухшего геля, содержащего фермент (частички не более 0,1 мм), суспендировали в 5 мл 10 мМ раствора АТФЕ в 0,1 М КСl, помещали в ячейку рН-стата (концентрация химотрипсина в ячейке составляла при этом $\sim 4 \cdot 10^{-6} \text{ M}$) и определяли активность фермента как описано выше. Активность (величины A и A_0) относили к единице массы навесок.

Термоинактивация иммобилизованного химотрипсина. Измельченный набухший гель суспендировали в буферном растворе для термоинактивации и инкубировали при исследуемой температуре при непрерывном перемешивании. Через определенные промежутки времени отбирали пробы равного объема и высушивали на стеклянном фильтре в течение 1 мин. При таком способе отбора проб их масса различалась не более чем на 10%. Ферментативную активность навесок измеряли как описано выше.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Левичкий В. Ю., Мелик-Нубаров Н. С., Слепнев В. И., Шикинис В. А., Можаяев В. В. // Молекулярн. биология. 1990. Т. 24. № 5. С. 1246—1253.
2. Шикинис В. А., Галканайте Н. З., Мелик-Нубаров Н. С., Левичкий В. Ю., Слепнев В. И., Можаяев В. В. // Биохимия. 1990. Т. 55. С. 1347—1355.
3. Левичкий В. Ю., Панова А. А., Можаяев В. В. // Биохимия. 1992. Т. 57. С. 1554—1564.
4. Мелик-Нубаров Н. С., Шикинис В. А., Слепнев В. И., Щеголев А. А., Можаяев В. В. // Молекулярн. биология. 1990. Т. 24. № 2. С. 346—357.
5. Шикинис В. А. Термостабильность ферментов, ковалентно иммобилизованных в полимерных гелях. Дис. ... канд. хим. наук. М., 1977.
6. Гордон Дж. Органическая химия растворов электролитов. М.: Наука, 1979.
7. Hansch C., Leo A. Substituent Constants for Correlational Analysis in Chemistry and Biology. N. Y.—Wiley, 1979. P. 1—67.
8. Martinek K., Mozhaev V. V., Berezin I. V. // Biochim. et biophys. acta. 1980. V. 615. P. 426—431.
9. Martinek K., Klibanov A. M., Goldmacher S., Berezin I. V. // Biochim. et biophys. acta. 1977. V. 485. P. 1—12.
10. Мартинек К., Гольдмахер В. С., Торчилин В. П., Мишин А. А., Смирнов В. Н., Березин И. В. // Докл. АН СССР. 1978. Т. 239. С. 227—230.
11. McWherter C. A., Haas E., Leed A. R., Scheraga H. A. // Biochemistry. 1986. V. 25. P. 1951—1963.
12. Zale S. E., Klibanov A. M. // Biochemistry. 1986. V. 25. P. 5432—5444.
13. Ahern T. J., Klibanov A. M. // Science. 1985. V. 228. P. 1280—1285.
14. Zale S. E., Klibanov A. M. // Enzyme Engineering. 1984. V. 434. P. 7—11.
15. Fields R. // Biochem. J. 1971. V. 124. P. 581—590.

Поступила в редакцию
13. VII. 1993

После доработки
24. II. 1994

A. A. Panova, V. Yu. Levitsky, V. V. Mozhaev

**NATIVE, MODIFIED AND IMMOBILIZED CHYMOTRYPSIN
IN SALTING-IN MEDIA. LIMITS STABILIZATION**

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

To stabilize α -chymotrypsin against irreversible thermal inactivation at high temperatures, methods of covalent modification and multi-point immobilization in combination with the addition of salting-in compounds were used. The upper limit of the protein stability proved to be the same for a combination of the modification and salting-in media and for each of these methods separately. The limit of stabilization reached by means of covalent immobilization is higher than the limit of stabilization reached by two other methods. The greatest stabilization of immobilized α -chymotrypsin by the salting-in media (a 10000 fold increase in the native enzyme's stability level) takes place only in the case of the protein with the minimum number of bonds with the support. Stabilization of the enzyme by these methods is explained in terms of the suppression of the conformational inactivation processes.

Технический редактор *Н. Н. Беляева*

Сдано в набор 18.04.94. Подписано к печати 24.05.94. Формат бумаги 70 × 100¹/₁₆
Офсетная печать Усл. печ. л. 9,1 Усл. кр.-отг. 3,9 тыс. Уч.-изд. л. 10,5 Бум. л. 3,5
Тираж 414 экз. Зак. 1135

Адрес редакции: 117871, ГСП-7, Москва, В-437, ул. Миклухо-Маклая, 16/10, корп. 32, комн. 504
Телефон: 330-60-38

Московская типография № 2 РАН, 121099, Москва, Г-99, Шубинский пер., 6