



УДК 577.156.02

ИЗУЧЕНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКОГО ФЕРМЕНТА
ТЕРРИЛИТИНА С ГЕПАРИНОМ

Миргородская О. А., Иванова Г. П., Тенникова Т. Б.,
Москвичев Б. В.

Всесоюзный научно-исследовательский технологический институт
антибиотиков и ферментов медицинского назначения,
Ленинград

Изучено взаимодействие протеазы террилитина, продуцируемой культурой актиномицета *Aspergillus terricola*, с гепарином. Показано, что взаимодействие террилитина с гепарином сопровождается инактивацией фермента. Взаимодействие террилитина с гепарином, слабо проявляющееся в нейтральной области, резко усиливается по мере уменьшения рН до величины рI фермента (4,7). Изучение кинетики инактивации террилитина с гепарином позволило предположить, что в зависимости от соотношений между компонентами смеси идет образование нескольких форм молекулярных комплексов. Одна из этих форм реализуется в области невысокой доли гепарина и характеризуется высокой скоростью денатурации. Другие формы с большим содержанием гепарина более устойчивы, но константы скорости их денатурации выше, чем соответствующие величины для нативного фермента в тех же условиях.

Взаимодействия макромолекул в организме, часто сопровождающиеся каталитическими превращениями, определяют специфику проявления биологической активности веществ. Так, например, восстановление равновесия в системе фибринолиза проходит через целый ряд последовательных сложных превращений макромолекул. Не все из этих превращений протекают в результате непосредственного ферментативного воздействия макромолекул друг на друга. Часть из них представляет собой образование ассоциатов из биополимеров, одним из компонентов которых может быть гепарин [1]. Поэтому изучение взаимодействия гепарина с ферментами, предназначенными для использования в качестве лекарственных препаратов, представляет серьезный интерес в связи с определением роли и путей метаболизма биологически активных веществ в организме [2], а также в связи с развитием общей теории межмолекулярных взаимодействий в растворах полиэлектролитов [3].

Нами с помощью кинетического метода изучено взаимодействие протеиназы актиномицета *Aspergillus terricola* (террилитина) [4] с гепарином в достаточно широком диапазоне изменения рН, температуры и соотношения компонентов в растворе. На рис. 1 приведена кинетика инактивации нативного фермента в растворе и террилитина в присутствии гепарина. Введение гепарина в раствор при рН 7,9 приводит к трехкратному увеличению константы скорости инактивации фермента, причем инактивация протекает по реакции первого порядка. Несмотря на то что величина рI фермента

Сокращения: Е — террилитин, G — гепарин.

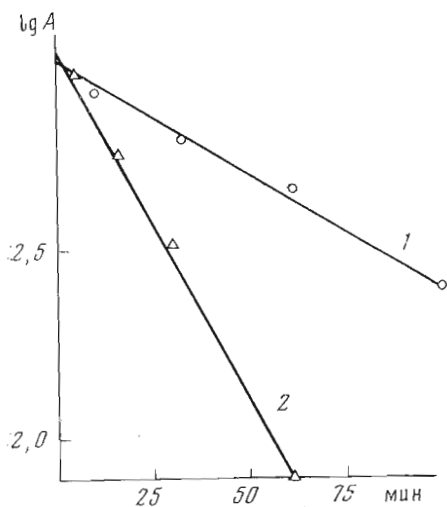


Рис. 1

Рис. 1. Полулогарифмические анаморфозы кинетических кривых инактивации нативного террилитина (1) и фермента в присутствии 30 мкМ гепарина (G) (2) в 0,05 М трис-HCl-буфере (рН 7,9), 0,15 М NaCl, 47°, [E] 50 мкМ

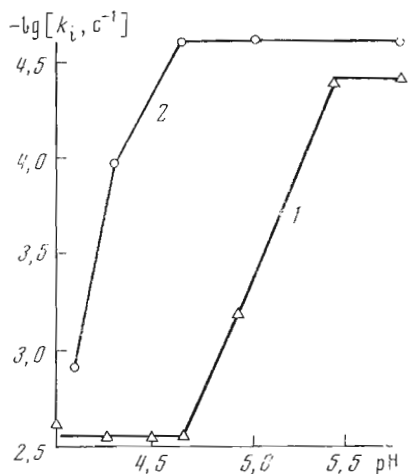


Рис. 2

Рис. 2. Зависимость констант скоростей инактивации террилитина от рН раствора при различных молярных соотношениях фермента и гепарина в растворе при 20°. 1 — [E] : [G] = 1 : 0,6; 2 — [E] : [G] = 1 : 30

составляет 4,7 [4] и макромолекула в целом несет отрицательный заряд, при физиологических значениях рН возможность ее взаимодействия с отрицательно заряженными макромолекулами гепарина нельзя исключить. Молекула террилитина представляет собой дwitterион, в котором наряду с отрицательными зарядами существуют участки, богатые основными аминокислотами, заряженными положительно. Именно они могут обусловить возникновение диссоциирующего комплекса, состоящего из макромолекул фермента и полисахарида.

Взаимодействия между ферментами и различными полиэлектролитами в растворе в настоящее время исследуются весьма широко [5—9]. В ряде случаев удалось показать существование достаточно стабильных ассоциатов [8]. Иногда такое взаимодействие приводит к стабилизации фермента [7], в других случаях ускоряет его инактивацию [9]. В большинстве случаев образование молекулярных комплексов макромолекул фермента и полиэлектролита обусловлено электростатическими взаимодействиями [9]. Можно ожидать, что вклад электростатического фактора в изменение свободной энергии при взаимодействии террилитина с гепарином будет возрастать при уменьшении рН раствора до величины рI белка (~ 4,7). Увеличение относительной доли положительно заряженных групп в макромолекуле фермента вблизи рI приводит к значительному усилению взаимодействия его с гепарином, которое выражается в сильном возрастании скорости денатурации фермента. Денатурация террилитина может быть хорошо описана кинетическим уравнением реакции первого порядка. Зависимость констант скоростей денатурации фермента в присутствии гепарина приведена на рис. 2. Следует отметить, что при низкой концентрации гепарина резкое ускорение инактивации фермента наблюдается в области рН < 5,5, в то время как при более высоких концентрациях полисахарида такой перелом имеет место только при рН < 4,7. Необходимо учесть, что в отсутствие полиэлектролита в условиях, сопоставимых с обсуждаемыми, скорость инактивации террилитина ничтожна. Различие во взаимодействии белка с гепарином, наблюдаемое при изменении их соотношения в растворе, по-видимому, объясняется перераспределением

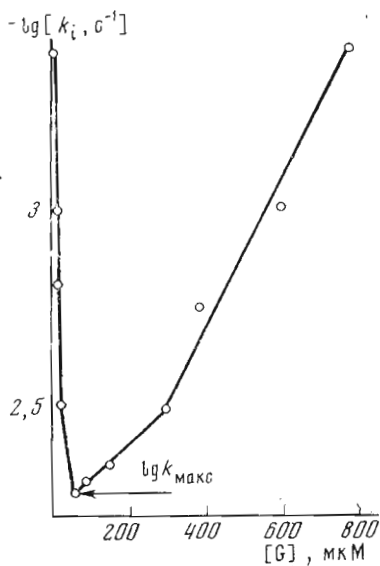


Рис. 3

Рис. 3. Зависимость констант скоростей инактивации трипсина от концентрации гепарина в растворе при рН 4,5 и 20°, [E] 50 мкМ

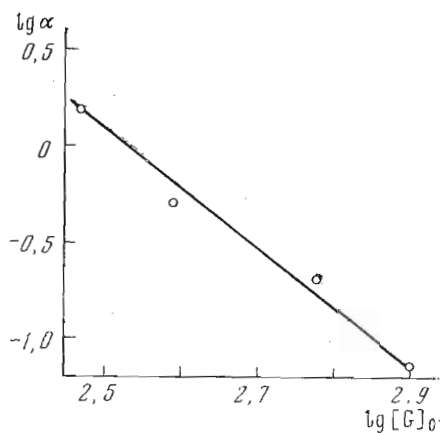


Рис. 4

Рис. 4. Перераспределение трипсина между эквимолекулярным комплексом трипсин — гепарин и ассоциатом с большим содержанием гепарина $E - G_{n+1}$. $\alpha = (E - G)/(E - G_{n+1})$ в зависимости от исходной концентрации гепарина в растворе

взаимодействующих компонентов в молекулярном комплексе трипсин — (гепарин)_n (n — число молекул гепарина, связанных с молекулой трипсина).

Изучение кинетики инактивации фермента при фиксированном значении рН 4,5 на фоне переменной концентрации гепарина в растворе показало экстремальный характер зависимости константы скорости инактивации от концентрации полисахарида (см. рис. 3).

При низких концентрациях гепарина (левая ветвь кривой на рис. 3) скорость инактивации возрастает пропорционально увеличению исходной концентрации полисахарида [G]₀, достигая своего максимального значения при молярном соотношении [E] : [G] = 1 : 1. Это позволяет предположить, что в диапазоне изменения концентрации гепарина от 3 до 59 мкМ идет образование ассоциата с эквимолекулярным соотношением компонентов. В такой форме фермент инактивируется с константой скорости k_i, равной k_{макс} = 5,5 · 10⁻³ с⁻¹. Поскольку в заданных условиях инактивацией свободного трипсина можно пренебречь, то долю фермента в связанной с гепарином форме можно оценить из соотношения k_i/k_{макс}. Как следует из таблицы, доля фермента, связанного с гепарином, пропорциональна концентрации последнего вплоть до 59 мкМ. Это означает также, что константа равновесия образования этой формы лежит в области концентраций, меньших самой низкой из используемых в наших экспериментах концентраций гепарина, т. е. K₁ < 3 · 10⁻⁶ М.

Дальнейшее увеличение концентрации полисахарида приводит к снижению константы скорости инактивации трипсина (правая ветвь кривой рис. 3), по-видимому, из-за образования ассоциатов, обогащенных гепарином, более устойчивых, чем эквимолекулярный комплекс трипсин — гепарин:



Соотношение между исходными и равновесными концентрациями гепарина и террилитина в условиях образования эквимолекулярного комплекса и ассоциата, обогащенного гепарином, при различном молярном соотношении компонентов в растворе

[G] ₀ , мкМ	[G] ₀ /[E] ₀	k _i */k _{макс}	Концентрация несвязанного террилитина, мкМ	Концентрации ассоциатов, мкМ		α**
				[E-G]	[F - G _{n+1}]	
3	0,06	0,07	46,5	3,5	—	—
8	0,13	0,20	40,0	10,0	—	—
16	0,26	0,26	37,0	13,0	—	—
31	0,58	0,52	21,0	29,0	—	—
59	1,18	1,00	0,0	50,0	—	—
75	1,5	0,94	—	47,0	3,0	13
103	2,1	0,88	—	44,0	6,0	7,3
150	3,0	0,85	—	42,5	7,5	5,7
300	6,0	0,61	—	30,5	19,5	1,6
390	7,8	0,33	—	16,5	33,5	0,5
600	10,0	0,18	—	9,0	41,0	0,2
690	15,8	0,07	—	3,5	46,5	0,07

* Относительная константа скорости инактивации террилитина при фиксированном значении [G]. Величина k_{макс} соответствует [G]=59 мкМ.

$$** \alpha = \frac{[E - G]}{[E - G_{n+1}]}$$

Константа диссоциации (K_{дис}) молекулярного комплекса E = G_{n+1} может быть описана уравнением

$$K_{\text{дис}} = \frac{[E - G] \cdot [G]^n}{[E - G_{n+1}]} \quad (2)$$

Преобразуем уравнение (2) следующим образом:

$$\alpha = \frac{[E - G]}{[E - G_{n+1}]} = K_{\text{дис}} [G]^{-n} \quad (3)$$

При избытке гепарина в растворе, когда изменением его концентрации при связывании с террилитином можно пренебречь, т. е. когда выполняется условие [G] ≈ [G]₀, в уравнение (3) можно ввести вместо равновесной концентрации величину исходной концентрации [G]₀

$$\lg \alpha = \lg K_{\text{дис}} - n \lg [G]_0 \quad (4)$$

Из этого уравнения (4) графически (см. рис. 4) в координатах {lg α} и {-lg [G]₀} находим, что n ≈ 3. Таким образом, в диапазоне изменения концентрации [G]₀ в растворе от 300 до 800 мкМ образуется молекулярный комплекс общей формулы E - G₄. В области концентрации гепарина от 60 до 300 мкМ, по-видимому, ассоциация протекает с образованием молекулярных комплексов E - G_{n+1}, где n претерпевает изменение от 0 до 3.

Предположение об образовании молекулярных комплексов, сделанное на основании кинетического анализа, может быть подтверждено с помощью гелевой хроматографии. Известно, что хроматографические свойства диссоциирующих комплексов определяются соотношением времени жизни такого ассоциата и длительностью хроматографического опыта [10]. Поэтому молекулярные комплексы, диссоциирующие на исходные компоненты с большой скоростью, нельзя обнаружить в обычном варианте хроматографического опыта. Дополнительная трудность изучения системы террилитин — гепарин обусловлена высокой скоростью инактивации фермента при образовании комплекса. Действительно, если величина константы скорости инактивации фермента в эквимолелярном ассоциате составляет ~ 5 · 10⁻³ с⁻¹, то средняя продолжительность жизни активного

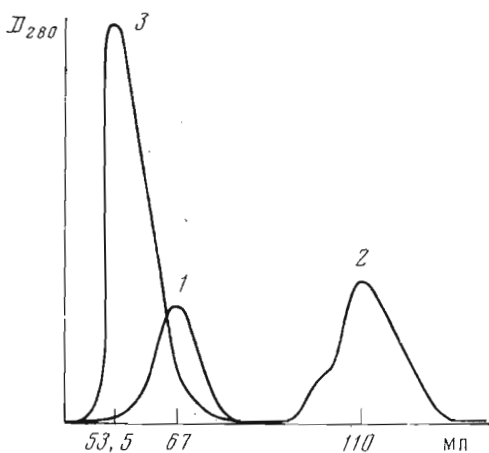


Рис. 5

Рис. 5. Гель-хроматограмма террилитина в присутствии гепарина (зона 1), нативного террилитина (зона 2) и голубого декстрана (зона 3) на колонке с сефадексом G-150

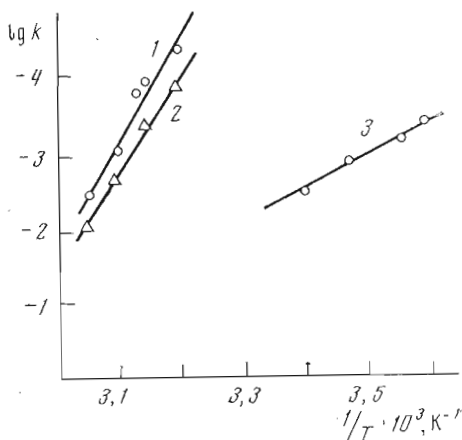


Рис. 6

Рис. 6. График Аррениуса для инактивации нативного террилитина (1) и молекулярных комплексов E — G₄ (2) и E — G (3)

фермента в этих условиях исчисляется несколькими минутами. И наконец, относительная хроматографическая подвижность или коэффициент распределения как отдельных компонентов комплекса, так и комплекса в целом не могут быть описаны одной функцией, зависящей от молекулярной массы, так как формы этих макромолекул в растворе резко отличаются друг от друга.

Следовательно, нельзя ожидать от хроматографического опыта результатов, пригодных для количественного анализа молекулярно-весаго распределения продуктов ассоциации террилитина с гепарином. В лучшем случае можно лишь качественно подтвердить образование такого молекулярного комплекса.

Для смещения равновесия в растворе террилитина и гепарина в сторону образования молекулярного комплекса между ними хроматографию в слое сефадекса G-150 проводили в колонке, приведенной в равновесие с буферным раствором, содержащим гепарин. На рис. 5 представлена хроматограмма смеси террилитина и гепарина, инкубированной при pH 4,5. Изменение величины коэффициента распределения белкового компонента от 0,59 для нативного фермента до 0,14 для террилитина в присутствии гепарина свидетельствует об образовании высокомолекулярного комплекса фермента и полиэлектrolита.

Температурная зависимость констант скоростей денатурации нативного террилитина в ассоциатах с гепарином представлена на рис. 6. Активационные параметры денатурации различных форм фермента при pH 4,5 определены на основании результатов, представленных на рис. 6. Энергия активации денатурационных процессов с участием нативного террилитина составляет 74 ккал/моль, для фермента в форме E — G — 19 ккал/моль и для комплекса E — G₄ — 56 ккал/моль.

Таким образом, установлено, что террилитин (протеиназа, продуцируемая культурой актиномицета *Asp. terricola*) взаимодействует с биополимером — гепарином и это взаимодействие сопровождается инактивацией фермента. Взаимодействие террилитина с гепарином, слабо проявляющееся в нейтральной области, резко усиливается по мере уменьшения pH до величины, соответствующей pI террилитина. Можно предположить, что взаимодействие террилитина с гепарином приводит к возникновению нескольких форм молекулярных комплексов между макромолекулами

фермента и полиэлектролита. Одна из этих форм, $E - G$, реализуется в области невысоких концентраций полисахарида в растворе и характеризуется высокой скоростью денатурации фермента с активационным барьером в 4 раза ниже соответствующей величины для нативного фермента. Другие формы ассоциатов, $E - G_{n+1}$, образующиеся при избытке гепарина, более устойчивы, чем первая, хотя константа скорости инактивации $E - G_4$ все же выше, а активационный барьер $E - G_4$ ниже соответствующей величины для нативного фермента.

Экспериментальная часть

В работе использовали гепарин фирмы Srofa (ЧССР) и протеолитический фермент террилитин производства предприятия Мосмедпрепарат. Фермент дополнительно очищали от избытка солей диализом против дистиллированной воды при 4° в течение 48 ч. Протеолитическую активность (A) определяли по модифицированной методике Кунитца [11]. Во всех экспериментах по изучению кинетики инактивации исходная концентрация активного фермента составляла 50 мкМ. Молярная концентрация террилитина рассчитана с учетом его молекулярной массы 26 000, приведенной в работе [4], а при расчете молярной концентрации гепарина использовали величину молекулярной массы, равную 16 000 [12].

Гель-хроматографию проводили на сефадексе G-150 (для гель-фильтрации, Pharmacia, Швеция). Использовали колонку размером 18×800 мм, в качестве элюента брали 0,05 М ацетатный буфер (pH 4,5) с добавлением гепарина в концентрации 2 мг/мл. Исследуемую пробу, содержащую 5 мг/мл террилитина и 2 мг/мл гепарина в 0,05 М ацетатном буфере (pH 4,5), наносили на колонку в объеме 5 мл. Скорость элюции составляла 7 мл/ч. Детектирование зон исследуемых образцов производили с помощью проточного спектрофотометра при 280 нм. Значения коэффициента распределения рассчитывали по методу, описанному в работе [13]. В качестве маркера использовали голубой декстран (Ferrak, ГДР).

1

ЛИТЕРАТУРА

1. Rosenberg R. D. (1975) *Advances in Experimental medicine enzymology*, pp. 217—238, N. Y.— London.
2. Li Eddu H. H., Orton C., Feinman R. D. (1974) *Biochemistry*, 13, 5012—5017.
3. Тенфорд Ч. (1965) Физическая химия полимеров, «Химия», М.
4. Орлиевская О. В., Шатаева Л. К., Самсонов Г. В. (1974) *Прикл. биохим. и микробиол.*, 7, 355.
5. Стрельцова З. А., Швядас В. К., Максименко А. В., Клесов А. А., Браудо Е. Е., Толстогузов В. Б., Березин И. В. (1975) *Биоорг. химия*, 1, 1464—1468.
6. Lasch J., Bessmertnaya L., Koslov L. V., Antonov V. K. (1976) *Eur. J. Biochem.*, 63, 591—598.
7. Кольцова С. В., Гликина М. В., Илларионова Н. Г., Самсонов Г. В. (1971) *Молекулярн. биол.*, 5, 225—230.
8. Кольцова С. В., Илларионова Н. Г., Панарин Е. Ф., Рудковская Г. Д., Самсонов Г. В. (1975) *Изв. АН СССР. Сер. хим.*, № 3, 643—649.
9. Миргородская О. А., Иванова Г. П., Панарин Е. Ф., Москвичев Б. В. (1977) *Биоорг. химия*, 2, 1695—1699.
10. Самсонов Г. В., Пономарева Р. Б. (1967) *Биофизика*, 13, 213.
11. Kunitz M. (1947) *J. Gen. Physiol.*, 30, 291—310.
12. Хилькин А. М., Шехтер А. Б., Истранов Л. П., Леманев В. Л. (1976) Коллаген и его применение в медицине, с. 65, «Медицина», М.
13. Laurent T. S., Killander J. (1964) *J. Chromatogr.*, 14, 317—330.

Поступила в редакцию
17.X.1977
После доработки
5.I.1978

A STUDY OF PROTEOLYTIC ENZYME TERRILYTIN INTERACTION
WITH HEPARIN

MIRGORODSKAYA O. A., IVANOVA G. P., TENNIKOVA T. B., MOSKVICHEV B. V.

*All-Union Technological Institute of Antibiotics and Enzymes
of Medical Application, Leningrad*

* Terrilytin, a protease from *Asp. terricola* actinomycete, interaction with heparin has been studied and shown to cause the inactivation of the former. The interaction is weakly manifested in neutral media, and sharply enhanced upon pH decrease to 4.7, the pI value of the enzyme. The kinetics of heparin-mediated inactivation of terrilytin suggest the formation of several forms of molecular complexes, the process being dependent upon the component ratio. One of the forms is present at low heparin fraction and has a high denaturation rate. The others, being richer in heparin, are more stable, but their denaturation rate constants are still higher than those for intact enzyme under the same conditions.
