



УДК 577.156.3.02

СТАБИЛИЗАЦИЯ ФЕРМЕНТА ПРИ ВВЕДЕНИИ  
В ЕГО МОЛЕКУЛУ ПОТЕНЦИАЛЬНО ОБРАТИМЫХ СШИВОК  
РАЗЛИЧНОЙ ДЛИНЫ

*Горчилин В. П., Максименко А. В.*

*Всесоюзный кардиологический научный центр  
Академии медицинских наук СССР, Москва*

*Мартинек Ю.*

*Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова*

Последовательная обработка предварительно обогащенного аминокетонами (предмодифицированного) химотрипсина *N*-ацетилгомоцистеинтиолактоном, 5,5'-дитио-бис(2-нитробензойной кислотой) и дитиолами типа  $\text{HS}-(\text{CH}_2)_n-\text{SH}$  (где  $n = 4-10$ ) приводит к стабилизации ферментных препаратов по отношению к денатурирующему действию гуанидинхлорида. Экспериментальные данные свидетельствуют в случае 1,5-дитиола о наложении на глобулу белка внутримолекулярной сшивки. Показано, что при использовании для обработки фермента смеси различных дитиолов во времени превосходит предпочтительный отбор ферментом 1,5-дитиола с образованием сшивки.

Создание стабилизированных ферментных систем открывает широкие перспективы их практического использования [1]. Во многих случаях, однако, наличие матрицы носителя, стабилизирующей фермент, препятствует выполнению его функций. Ранее было показано [2], что повышения стабильности фермента можно достигнуть без использования носителя за счет создания на глобуле белка внутримолекулярных сшивок. Укрепляя глобулу биокатализатора, они затрудняют ее разворачивание под действием денатурационных сил, и стабильность фермента повышается. Очевидно, что лучшего результата (вести максимальное число «скобок») можно было бы достичь, накладывая в разных участках белковой молекулы фермента сшивки разной длины, соответствующей расстоянию между возможными центрами пришивки на данном участке. Такой подход требует применения потенциально обратимых сшивок. Весьма удобна для этой цели, на наш взгляд, реакция тиол-дисульфидного обмена [3].

Если глобула фермента содержит активированные сульфгидрильные группы, то можно ожидать образования мостиковых связей при ее обработке дитиолами общего вида  $\text{HS}-(\text{CH}_2)_n-\text{SH}$  различной длины. При этом обратимость процесса за счет нуклеофильной атаки образовавшейся S-S-связи SH-группой свободного дитиола позволяет предполагать, что при использовании смеси дитиолов различной длины первоначально возникающая случайная одноточечная модификация белка будет заменяться со временем более выгодной с термодинамической точки зрения и более прочной двухточечной пришивкой — наложением «скобки». Это

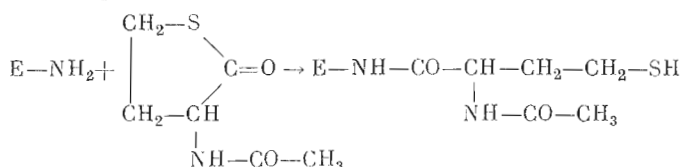
Сокращение: DTNBS — 5,5'-дитио-бис(2-нитробензойная кислота).

означает, что фермент во времени сам будет выбирать из смеси шивки такой длины, которая в каждом участке его глобулы, где это вообще возможно, обеспечит присоединение по двум точкам, т. е. в принципе может реализоваться процесс самостабилизации фермента.

Настоящая работа посвящена изучению процессов денатурации  $\alpha$ -химотрипсина, модифицированного вышеописанным способом, под действием гуанидинхлорида.

Обработка химотрипсина N-ацетилгомоцистеинтиолактоном приводит к введению в глобулу фермента (по данным спектрофотометрического титрования) в среднем 10,3 SH-групп. При этом препарат сохраняет 91% каталитической активности, что согласуется с результатами работы [4].

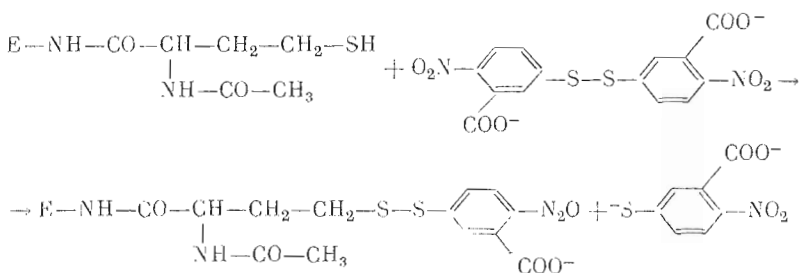
Для увеличения числа возможных мест пришивки фермент был предварительно обогащен аминокруппами. Для этого он был модифицирован действием водорастворимого карбодимида и этилендиамина с целью перевода карбоксильных групп в аминокруппы, после чего аминокруппы — и присущие белку, и введенные модификацией — были тиолированы N-ацетилгомоцистеинтиолактоном согласно рекомендациям работы [4] по схеме реакции [5]:



Предварительная модификация (премодификация) фермента карбодимидом и этилендиамином, увеличивая число имеющихся у химотрипсина аминокрупп [2], позволяет ввести в его глобулу в среднем 16,4 SH-групп против 10,3 для фермента без премодификации. Все дальнейшие эксперименты проводились с химотрипсином, содержащим 16,4 SH-групп.

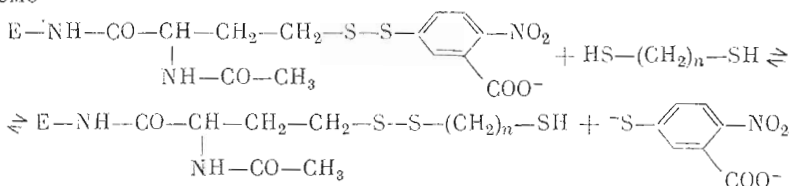
Активацию введенных сульфгидрильных групп проводили действием 5,5-дитио-бис(2-нитробензойной кислоты) (DTNBS), что позволяет не только активировать сульфгидрильные группы для тиол-дисульфидного обмена [6], но и определить общее количество введенных SH-групп.

Схема реакции, согласно работе [7], следующая:



При взаимодействии с DTNBS величина сохраняемой модифицированными препаратами каталитической активности снижается до 7%, а после дальнейшей 3-суточной инкубации с растворами дитиолов составляет 20—50% от начальной величины.

Реакция тиол-дисульфидного обмена, согласно работе [3], протекает по схеме



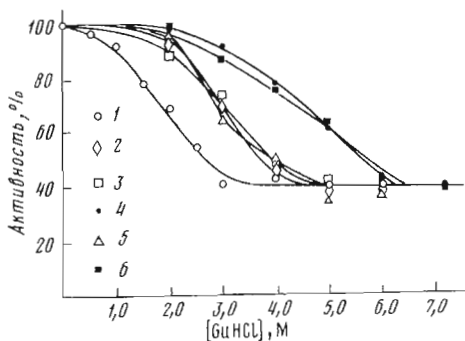


Рис. 1

Рис. 1. Зависимость каталитической активности химотрипсина нативного (1) и обработанного меркаптоэтанолом (2), дитиолами HS — (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub> — SH с n = 4 (3), 5 (4), 8 (5), а также смесью дитиолов (6) при рН 7,0 и 20°, [E] ~ 5 · 10<sup>-8</sup> M от концентрации гуанидинхлорида

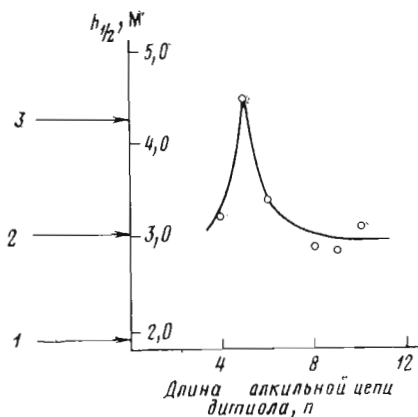


Рис. 2

Рис. 2. Зависимость максимального эффекта стабилизации ( $h_{1/2}$  — измерено после 3 сут инкубации с дитиолами HS — (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub> — SH) от длины алкильной цепи дитиола. Стрелками указаны значения  $h_{1/2}$  для нативного фермента (1), для химотрипсина, обработанного меркаптоэтанолом (2) и смесью дитиолов (3)

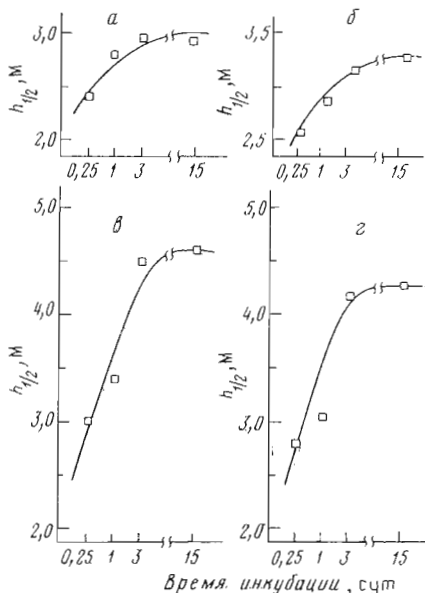


Рис. 3

Рис. 3. Зависимость абсциссы полувисоты денатурационного перехода ( $h_{1/2}$ , [гуанидинхлорид], M) от времени инкубации с меркаптоэтанолом (а), 1,4-тетраметилэтилендитиолом (б), 1,5-пентаметилэтилендитиолом (в), смесью дитиолов (г)

В водных растворах гуанидинхлорида  $\alpha$ -химотрипсин претерпевает инактивацию, причем потеря активности тем больше, чем выше концентрация гуанидинхлорида (рис. 1, 1). После понижения активности фермента до 40% от исходной (3 M гуанидинхлорид) дальнейшего ее падения не происходит даже при значительном увеличении концентрации гуанидинхлорида. Это, по-видимому, свидетельствует о наличии как минимум двух фракций фермента, одна из которых инактивируется гуанидинхлоридом, а другая нет. (Поэтому в дальнейшем речь пойдет о стабилизации именно лабильной фракции.)

Аналогичный вид кривой инактивации под действием гуанидинхлорида наблюдается и для препаратов модифицированного химотрипсина после его инкубации с дитиолами, однако в этом случае область плато достигается при более высоких значениях концентрации денатурирующего агента, что свидетельствует о большей стабильности модифицированного фермента. При этом величины абсцисс полувисот наблюдаемого перехода  $h_{1/2}$  (мольная концентрация гуанидинхлорида, при которой

падение активности фермента составляет 50% от максимально возможного падения активности при добавлении гуанидинхлорида), характеризующие величину эффекта стабилизации, для дитиолов с  $n = 4, 6, 8, 9, 10$  составляют 2,5—3,4 М и весьма близки к величине стабилизации (2,9 М), вызванной простой химической модификацией (обработка химотрипсина, содержащего SH-активирующие группы, меркаптоэтанолом — рис. 1, 2), оставаясь выше значения 1,9 М для нативного фермента (рис. 2).

В данном случае, вероятно, даже при использовании большей части набора бифункциональных реагентов происходит лишь обычная одноточечная модификация фермента. Это подтверждается не только близкими величинами эффектов стабилизации химотрипсина при модификации последнего меркаптоэтанолом и дитиолами (кроме дитиола с  $n = 5$ ), но и результатами спектрофотометрического титрования SH-групп в модифицированном ферменте после удаления избытка дитиолов диализом. Число SH-групп, по данным титрования, составляет 16,0—17,2 и весьма близко к значению этого параметра для фермента, обработанного N-ацетилгомоцистеинилактоном (16,4). Это означает, что внутримолекулярных сшивок не образовалось, так как в противном случае число титруемых SH-групп уменьшилось бы. (Стабилизирующее действие подобной модификации по отношению к мочеvine было обнаружено ранее для рибонуклеазы [8].) В случае же дитиола с  $n = 5$  или смеси дитиолов продукты обладают заметно повышенной устойчивостью к действию гуанидинхлорида —  $h_{1/2} = 4,5$  М (см. рис. 1, 4, 6 и рис. 2). По-видимому, в случае дитиола с  $n = 5$  удается реализовать внутримолекулярную сшивку. И действительно, данные спектрофотометрического титрования свидетельствуют, что у препаратов без выраженного эффекта стабилизации число титруемых SH-групп остается на уровне исходного (т. е. до обработки дитиолом) — 16,4 (0,2 для фермента, обработанного меркаптоэтанолом), что указывает на одноточечную модификацию, тогда как у препарата на основе 1,5-дитиола или смеси дитиолов число этих групп понижается до 14,7.

Таким образом, помимо предложенной нами ранее схемы налажения внутримолекулярных сшивок с помощью диаминов [2] для фермента, предварительно соответствующим образом модифицированного, возможно также использование дитиолов.

Но можно ли в данном случае говорить о реализации самостабилизации фермента?

Изучение развития во времени эффекта стабилизации фермента против денатурации под действием гуанидинхлорида показывает, что процесс модификации S—S-групп довольно медленный — стабильность увеличивается в течение нескольких дней (см. рис. 3). При этом для большинства препаратов увеличение значения  $h_{1/2}$  составляет 0,5—0,7 М (рис. 3 а, б). В то же время для препаратов, где можно ожидать появления внутримолекулярных сшивок, это значение в 2—3 раза выше —  $h_{1/2} = 1,5—1,6$  М (рис. 3 в, г).

Данные, полученные для одного 1,5-дитиола, могут говорить лишь о том, что сначала происходит быстрая модификация фермента с малым значением  $h_{1/2}$ , а затем медленный переход к двухточечному взаимодействию в некоторых местах глобулы белка. Это явление еще нельзя назвать самостабилизацией. Однако развитие того же эффекта (рис. 3 г) в случае использования для обработки фермента смеси дитиолов можно объяснить только однозначно, учитывая, что реакционность всех дитиолов в реакции одноточечной модификации примерно одинакова. Сначала происходит статистическая модификация фермента разными дитиолами. Но постепенно реализуется максимально выгодная ситуация: доминирующую роль начинает играть образование сшивки 1,5-дитиолом, т. е. во времени фермент сам отбирает двухточечную сшивку нужной длины. Это уже позволяет говорить о самостабилизации фермента.

Наличие эффекта стабилизации свидетельствует о принципиальной возможности реализации предложенного нами подхода. По-видимому, использование модификации смесью дитиолов наиболее перспективно для «субъединичных ферментов, содержащих большое количество SH-групп».

### Экспериментальная часть

Использованы кристаллический  $\alpha$ -химотрипсин (с концентрацией активного белка, определенной спектрофотометрическим титрованием по методу [9], равной 64%) и его специфический субстрат — этиловый эфир *N*-ацетил-*L*-тирозина (Koch-Light Laboratories Ltd, Англия), 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодимид, *N*-ацетилгомоцистеинтиолактон и гуанидинхлорид (Sigma, США), дитиолы типа HS—(CH<sub>2</sub>)<sub>*n*</sub>—SH, где *n* = 4, 5, 8, 9, 10 (ICN, Канада), 5,5'-дитио-бис(2-нитробензойная кислота) — коммерческий препарат фирмы Serva (ФРГ). Все остальные реактивы аналитической степени чистоты производства «Союзреактив» (СССР).

Каталитическую активность нативного и модифицированного химотрипсина измеряли на рН-стате ТТТ-Id (Radiometer, Дания) по начальным скоростям реакций ферментативного гидролиза 10<sup>-2</sup> М этилового эфира *N*-ацетил-*L*-тирозина в 0,1 М КСl при рН 7,0 и комнатной температуре (объем ячейки 5 мл).

Количество введенных в молекулу химотрипсина сульфгидрильных групп определяли спектрофотометрическим методом [10] при  $\lambda$  412 нм, 20°, рН 8,0 (0,01 М трис-НСl-буфер в 0,3 М КСl и 5 мМ EDTA) на спектрофотометре Perkin-Elmer Coleman-55. Концентрация ферментного препарата и DTNBS в кювете составляла соответственно 1 и 30 мкМ.

Взаимодействие фермента с карбодимидом проводили согласно [2], концентрация фермента в инкубационной смеси 0,5 мМ. Сохраняемая препаратом каталитическая активность 43%. Дальнейшую обработку химотрипсина этилендиамином осуществляли по методике [2] при концентрации ферментного препарата в инкубационной смеси 0,25 мМ. Сохраняемая препаратом каталитическая активность равнялась 17% от исходной.

Полученный препарат (0,1 мМ) обрабатывали *N*-ацетилгомоцистеинтиолактоном (0,19 М) [5, 11]. Тиолирование проводили по методике [4].

Реакцию введенных в молекулу SH-групп с DTNBS проводили по методике [6]. Концентрация фермента и DTNBS в системе соответственно 5,0 мкМ и 0,15 мМ.

Инкубацию препаратов модифицированного химотрипсина, содержащего SH-группы, активированные DTNBS, с дитиолами осуществляли с учетом рекомендаций [6], варьируя время инкубации от 5 ч до 15 сут. К 1 мкМ ферментному препарату в 0,01 М трис-НСl-буфере в 0,3 М КСl и 5 мМ EDTA (рН 8,0) добавляли 1% растворы дитиолов (или их эквивалентной смеси в диметилсульфоксиде, содержащей дитиолы с *n* = 4, 5, 6, 8, 9 и 10) до конечной концентрации 3·10<sup>-3</sup>% (об.) Перед спектрофотометрическим титрованием SH-групп модифицированного фермента его препараты диализовали в течение суток против 0,01 М трис-НСl-буфера в 0,3 М КСl и 5 мМ EDTA (рН 8,0) в диализных трубках (Union Carbide Corporation, США).

Влияние гуанидинхлорида на каталитическую активность нативного и модифицированного химотрипсина изучали на рН-стате (рН 7,0; 20°), создавая в его ячейке соответствующую концентрацию гуанидинхлорида (0,5—0,7 М) и определяя каталитическую активность ферментных препаратов, как это описано выше. Концентрация нативного и модифицированного химотрипсина в ячейке рН-стата составила 0,01 и 0,05 мкМ.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Имобилизованные ферменты (1976) (под ред. Березина И. В., Антонова В. К. и Мартинек К.), с. 7, МГУ, М.
2. Torchilin V. P., Maksimenko A. V., Smirnov V. N., Berezin I. V., Klivanov A. M., Martinek K. (1978) *Biochim. et biophys. acta*, 522, 277—283.
3. Торчинский Ю. М. (1977) Сера в белках, с. 58, «Наука», М.
4. Reiner R., Siebeneick H.-U., Christensen I., Döring H. (1977) *J. Mol. Catal.*, 2, 335—349.
5. White F. H., Jr., Sandoval A. (1962) *Biochemistry*, 1, 938—946.
6. Love C. R. (1977) *Eur. J. Biochem.*, 76, 411—417.
7. Love C. R. (1977) *Eur. J. Biochem.*, 76, 391—399.
8. Reiner R., Siebeneick H.-U., Christensen I., Döring H. (1977) *J. Mol. Catal.*, 2, 119—128.
9. Schonbaum G. R., Zerner B., Bender M. L. (1961) *J. Biol. Chem.*, 236, 2930—2935.
10. Ellman G. L. (1959) *Arch. Biochem. and Biophys.*, 82, 70—77.
11. Reiner R., Siebeneick H.-U., Christensen I., Lukas R. (1975) *J. Mol. Catal.*, 1, 3—12.

Поступила в редакцию  
3.V.1978  
После переработки  
6.IX.1978

## ENZYME STABILIZATION BY INCORPORATING POTENTIALLY REVERSIBLE CROSS-LINKAGES OF VARYING LENGTH

TORCHILIN V. P., MAKSIMENKO A. V., MARTINEK K.

*All-Union Cardiology Research Center, Academy of Medical Sciences  
of the USSR, Moscow; M. V. Lomonosov State University, Moscow*

Consecutive treatment of chymotrypsin, after its prior enrichment in amino groups, with N-acetylhomocysteine thiolactone, 5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid), and with dithiols HS-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-SH (*n* = 4-10) conferred on the enzyme preparations the stability against guanidine hydrochloride denaturation. Experimental data evidenced in favor of imposing onto protein globule of intramolecular cross-links when 1,5-dithiol was used. It was also shown that in the case of application of a dithiol mixture, preferential selection by the enzyme of 1,5-dithiol for forming the cross-links occurred.

---