



УДК 577.156.3.02.3 + 547.963

МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ И ПОЛИМОРФИЗМ  
КИСЛОТОСТАБИЛЬНОГО ИНГИБИТОРА ТРИПСИНА  
И ХИМОТРИПСИНА ИЗ СЫВОРОТКИ КРОВИ КРОЛИКА

Оглоблина О. Г., Якубовская Р. И., Платонова Л. В.,  
Стронгин А. Я., Пасхина Т. С.

*Институт биологической и медицинской химии  
Академии медицинских наук СССР, Москва;*

*Всесоюзный научно-исследовательский институт генетики  
и селекции промышленных микроорганизмов, Москва*

Изучена природа полиморфизма высокоочищенного препарата кислотостабильного ингибитора трипсина и химотрипсина из сыворотки крови кролика. Препаративным изоэлектрофокусированием этот препарат разделен на пять изоформ, значения  $pI$  которых равны 3,60; 3,73; 3,88; 4,05; 4,14. Установлены аминокислотные и углеводные составы изоформ. При помощи частичного дезамидирования ингибитора показано, что гетерогенность высокоочищенного препарата, по-видимому, обусловлена различной степенью амидирования боковых карбоксильных групп его молекул. Определена константа диссоциации комплекса ингибитора с химотрипсином ( $K_1$   $9 \cdot 10^{-6}$  М) и константа скорости диссоциации комплекса ингибитора с трипсином ( $k_{-1}$   $1,8 \cdot 10^{-4}$  с $^{-1}$ ). На основании данных кинетики и химической модификации функциональных групп ингибитора высказано предположение о наличии в молекуле ингибитора двух близкорасположенных реактивных центров для связывания трипсина и химотрипсина.

Термо- и кислотостабильный ингибитор трипсина (КФ 3.4.4.4) и химотрипсина (КФ 3.4.4.5) из сыворотки крови кролика (ТКСТИ) принадлежит к классу стабильных в кислой среде природных ингибиторов протеиназ, по-видимому выполняющих особые регуляторные функции в организме человека и млекопитающих [1, 2]. ТКСТИ — это  $\alpha_1$ -гликопротеид, проявляющий высокое сродство к трипсину ( $K_1$   $6 \cdot 10^{-10}$  М) и менее выраженное сродство к химотрипсину ( $K_1$   $6 \cdot 10^{-6}$  М) [1, 2].

Методом химической модификации нами было установлено присутствие в реактивном центре ТКСТИ остатка аргинина [2]. Диск-электрофорезом в полиакриламидном геле был выявлен полиморфизм высокоочищенного препарата ТКСТИ [2].

Настоящая работа посвящена дальнейшему изучению природы и механизма действия ТКСТИ. Непосредственная задача этого исследования — изучение природы полиморфизма высокоочищенного препарата ингибитора и установление кинетических констант и характеристик (величины  $K_1$  для комплекса ТКСТИ с химотрипсином, величины константы скорости

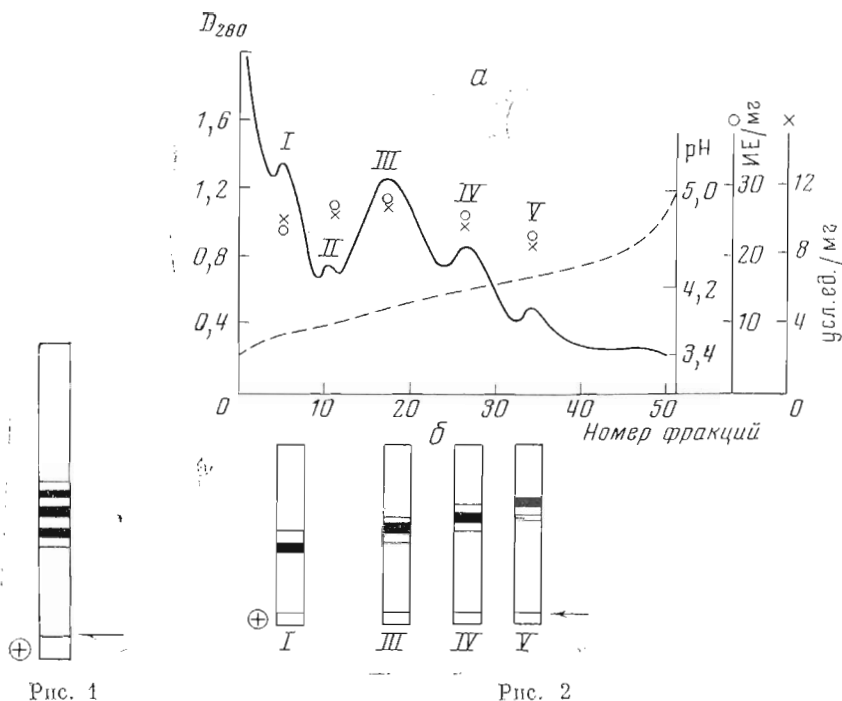


Рис. 1

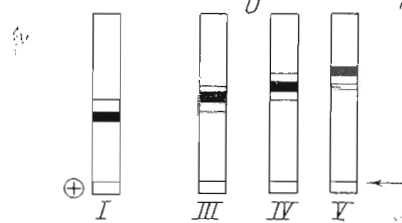


Рис. 2

Рис. 1. Электрофореграмма высокоочищенного препарата ТКСТИ в 11% полиакриламидном геле (рН разделения 9,5). Стрелкой здесь и далее указано положение бромфенолового синего

Рис. 2. Preparative изоэлектрофокусирование ТКСТИ: а — профиль элюции с колодки, б — электрофореграммы полученных изоформ в 11% полиакриламидном геле (рН разделения 9,5)

диссоциации ( $k_{-1}$ ) комплекса данного ингибитора с трипсином), а также определение числа реактивных центров в молекуле ТКСТИ.

Препарат ТКСТИ  $98 \pm 2\%$ -ной чистоты (высокоочищенный, уд. акт 38—40 ИЕ/мг относительно трипсина), использованный в данной работе, был получен из сыворотки крови кролика при помощи биоспецифической хроматографии на трипсин-сефарозе 4В [2]. Как видно из рис. 1, высокоочищенный препарат ТКСТИ гетерогенен и состоит из трех основных и двух минорных компонентов.

Пять компонентов ТКСТИ были выделены препаративным изоэлектрофокусированием в градиенте рН 3—5 и градиенте сахарозы 50—4% (рис. 2, а). Компоненты элюировались в соответствии с величинами их рI: I —  $3,6 \pm 0,01$ , II —  $3,73 \pm 0,01$ , III —  $3,88 \pm 0,01$ , IV —  $4,05 \pm 0,01$  и V —  $4,14 \pm 0,01$ .

Все пять компонентов ТКСТИ имеют практически одинаковую удельную активность относительно трипсина и химотрипсина, составляющую 85—90% исходной удельной активности нефракционированного препарата (рис. 2, а). На этом основании компоненты ТКСТИ были названы его изоформами, которые в соответствии с общепринятыми представлениями должны быть близки по спектру биологической активности и различаться по молекулярным характеристикам.

Выделенные препаративным изоэлектрофокусированием изоформы ТКСТИ исследовали диск-электрофорезом в полиакриламидном геле (рис. 2, б). Оказалось, что каждый из изоингибиторов ТКСТИ содержит незначительную примесь родственных изоформ.

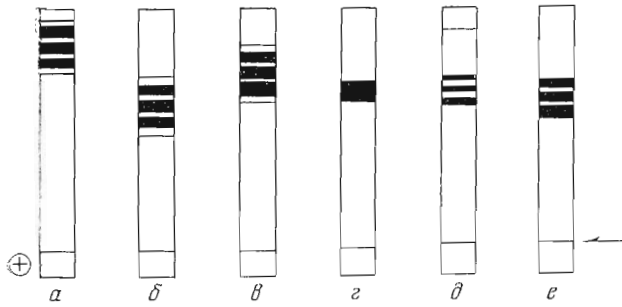


Рис. 3

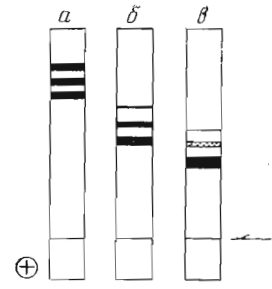


Рис. 4

Рис. 3. Электрофореграммы препарата ТКСТИ в полиакриламидном геле: *a* — 10% гель (рН 7,0), *б* — 12% гель (рН разделения 5,5); *в* — 10% гель, содержащий 6 М мочевины (рН 7,0); ТКСТИ обрабатывали 8 М мочевиной и 0,1% β-меркаптоэтанолом; *г* — 10% гель, содержащий 2 М мочевины, 0,1% додецилсульфат натрия и 0,1% β-меркаптоэтанол (рН 7,0); ТКСТИ обрабатывали 1% додецилсульфатом натрия, 0,1% β-меркаптоэтанолом и 2 М мочевиной; *д* — 11% гель (рН разделения 9,5); ТКСТИ обрабатывали нейраминидазой из *Vibrio cholerae* [4]; *e* — 11% гель (рН разделения 9,5); ТКСТИ обрабатывали 0,1н. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 ч при 80°

Рис. 4. Диск-электрофорез в 11% полиакриламидном геле (рН разделения 9,5) препарата ТКСТИ, предварительно обработанного 0,2% β-меркаптоэтанолом и 8 М мочевиной (*a*) и того же препарата после инкубирования при рН 9,2 (трис-НСI-буфер) и 37° в течение 134 (*б*) и 184 ч (*в*)

Выявленная гетерогенность суммарного препарата ТКСТИ не обусловлена сорбцией низкомолекулярных лигандов, присутствующих в буферных системах для электрофореза, поскольку: 1) подвижность изоформ ТКСТИ (I—V) к аноду при электрофорезе уменьшается по мере возрастания величин их *pI*, 2) препарат ТКСТИ имеет одинаковый состав компонентов (I—V) при его электрофоретическом исследовании в буферных системах с различными значениями рН и ионной силы (рис. 3, *a*, *б*). По-видимому, полиморфизм ТКСТИ — следствие структурных различий его молекул.

На рис. 3, *в* представлена электрофореграмма препарата ТКСТИ, предварительно обработанного 8 М мочевиной и 0,1% β-меркаптоэтанолом с целью полного разрушения третичной структуры глобул. Наличие в таком препарате пяти компонентов, а не одного, как можно было бы ожидать в случае гетерогенности по конформационным состояниям, позволяет исключить конформационные различия молекул ТКСТИ как одну из причин их полиморфизма [3].

Нами были изучены и другие возможные причины выявленной гетерогенности препарата ТКСТИ, которые могли быть обусловлены различиями в величинах молекулярных весов изоформ, в составах углеводного компонента, в аминокислотных составах, а также в степени амидирования боковых карбоксильных групп дикарбоновых аминокислот или в степени ацилирования ε-аминогрупп остатков лизина.

Данные по электрофорезу препарата ТКСТИ, предварительно обработанного 1% додецилсульфатом натрия в присутствии 0,1% β-меркаптоэтанол и 2 М мочевины (рис. 3, *г*), в 10% ПАГ, содержащем 0,1% додецилсульфат натрия, 0,1% β-меркаптоэтанол и 2 М мочевины, свидетельствуют о равенстве молекулярных весов изоформ ТКСТИ, поскольку была выявлена лишь одна полоса. Смещение этой полосы к аноду соответствует молекулярному весу бока, равному ~23 000 (сравнение с белками «мггиками»: химотрипсиногеном с *M* 25 000 и миоглобином с *M* 17 800).

Таблица 1

Углеводный состав компонентов ТКСТИ  
%, в скобках указано число остатков в молекуле гликопротеида *M* 23000

Моносахариды	Изоформы			
	I	III	IV	V
AcNeu	2,3 (1)	2,3 (1)	2,2 (1)	2,4 (1)
GalN + GlcN	4,8 (5)	4,8 (5)	5,1 (5)	4,9 (5)
Gal + Man	Не опр.	8,7 (11)	8,5 (11)	8,3 (11)

Таблица 2

Аминокислотный состав изоформ ТКСТИ (моль/моль белка) \*

Аминокислоты	Изоформы			
	I	III	IV	V
Lys	13,0	13,0	13,0	13,0
His	Следы	Следы	Следы	Следы
Arg	6,5 (7)	6,2 (6)	5,6 (6)	4,6 (5)
Asx	15,3 (15)	12,8 (13)	15,4 (15)	15,2 (15)
Thr	3,5 (4)	3,1 (3)	3,4 (3)	3,8 (4)
Ser	8,0 (8)	8,6 (9)	8,0 (8)	7,6 (8)
Glx	17,8 (18)	17,1 (17)	18,9 (19)	17,7 (18)
Pro	7,5 (8)	7,2 (7)	8,2 (8)	7,9 (8)
Gly	23,9 (24)	20,9 (21)	23,5 (24)	24,4 (24)
Ala	9,3 (9)	6,9 (7)	7,8 (8)	8,5 (9)
Cys	9,1 (9)	10,5 (11)	11,3 (11)	9,1 (9)
Val	4,7 (5)	4,3 (4)	4,6 (5)	4,7 (5)
Ile	2,6 (3)	2,1 (2)	2,2 (2)	2,3 (2)
Leu	10,2 (10)	10,1 (10)	11,3 (11)	10,2 (10)
Tyr	9,0 (9)	8,6 (9)	7,6 (8)	8,4 (8)
Phe	9,0	9,0	9,0	9,0

\* Приведенные величины представляют собой средние арифметические для результатов анализа не менее трех гидролизатов каждой изоформы.

ТКСТИ — гликопротеид, отличающийся высоким содержанием углеводов (~20%), в состав которых входит ацетилнейраминная кислота, гексозамины (глюкозамин и галактозамин) и гексозы (манноза и галактоза) [1]. Часто различия в углеводном составе являются причиной множественности форм гликопротеидов [4, 5].

Поскольку наиболее распространенная причина гетерогенности гликопротеидов — различия в содержании нейраминной кислоты в их молекулах [4, 6, 7], нами были проведены опыты, позволившие исключить указанную выше причину полиморфизма для ТКСТИ. Ингибитор десиализировали двумя способами: при помощи нейраминидазы (КФ 3.2.1.18) из *Vibrio cholerae* [4], а также путем кислотного гидролиза. Из электрофорграмм полученных препаратов (рис. 3, *б*, *в*) видно, что десиализирование не изменяет картины гетерогенности препаратов ТКСТИ.

Для изоформ I, III—V ТКСТИ были определены углеводные составы (табл. 1). Как видно из таблицы, изоингибиторы содержат одинаковое количество ацетилнейраминной кислоты, гексозаминов и гексоз.

Аминокислотные составы изоформ I, III—V также близки (табл. 2). Некоторые различия в содержании аспарагиновой и глутаминовой кислот, аланина, пролина не могли вызвать выявленную гетерогенность ТКСТИ. Обращают на себя внимание различия в содержании остатков аргинина, количество которого убывает с возрастанием  $pI$  изоформы. Подобная закономерность, однако, не может объяснить обнаруженную гетерогенность ТКСТИ, так как изоформа с наивысшим содержанием остатков аргинина, которая должна была бы иметь самую высокую величину  $pI$ , в действительности имеет самую низкую. Таким образом, обнаруженные различия в аминокислотном составе, в том числе в содержании остатков аргинина и дикарбоновых аминокислот, не могут являться причиной полиморфизма ТКСТИ.

Одной из причин гетерогенности может быть различная степень ацилирования  $\epsilon$ -аминогрупп остатков лизина. Данные предыдущей работы [2] позволяют исключить эту причину электрофоретической неоднородности ингибитора, поскольку при помощи малеинирования установлено, что  $\epsilon$ -аминогруппы его не ацилированы.

По данным аминокислотного анализа (табл. 2), в молекуле ТКСТИ содержится более 30 остатков дикарбоновых аминокислот. В литературе описаны белки, гетерогенность которых вызвана различной степенью амидирования боковых карбоксильных групп остатков аспарагиновой и глутаминовой кислоты [8—10]. В частности, это было установлено Шпейдером и Ласковским [9] для ингибитора Кунигца из поджелудочной железы быка и Грипом и сотр. [10] — для ингибитора Казала из поджелудочной железы человека. Прямое определение числа амидных групп в изоформах ТКСТИ [9, 11] из-за ограниченного количества препаратов изоформ было для нас затруднительно. Поэтому мы использовали метод Сперо и сотр. [8], согласно которому при длительной инкубации в щелочной среде предварительно денатурированных белков наблюдается постепенное отщепление амидных группировок.

При длительной инкубации ТКСТИ ( $pH$  9,2; 37°), возможно, вследствие частичного гидролиза амидных группировок наблюдается увеличение подвижности всех компонентов к аноду и накопление изоформы, отличающейся максимальной подвижностью в электрическом поле по направлению к аноду (рис. 4). Через 184 ч инкубации был получен препарат ингибитора, содержащий практически один компонент (рис. 4, в).

Таким образом, проведенные нами опыты показывают, что в щелочной среде, очевидно, происходит дезамидирование остатков дикарбоновых аминокислот, которое может значительно изменить характер гетерогенности препарата ТКСТИ при электрофорезе в полиакриламидном геле и, следовательно, возможной причиной гетерогенности ингибитора является различная степень амидирования боковых карбоксильных групп полипептидной цепи его молекул.

В настоящее время неизвестно, существует ли ТКСТИ в виде изоформ *in vivo*, или гетерогенность возникает в процессе выделения ингибитора из сыворотки крови кролика и его очистки. Постоянство картины гетерогенности (3 основных и 2 минорных компонента) для препаратов, полученных принципиально различными методами [2, 12], позволяет предположить, что множественность форм присуща ТКСТИ *in vivo*.

Физиологическое значение изоформ ТКСТИ пока не изучено. Джеринг, Шорп и Чеше [13] исследовали производные панкреатического ингибитора Кунигца, различающиеся степенью ацилирования  $\epsilon$ -аминогрупп остатков лизина, т. е. степенью основности или кислотности. Они показали, что производное ингибитора Кунигца с наименьшей основностью быстро выводится из организма мышей с мочой, а также продемонстрировали возможность дезацилирования ингибитора при помощи ациллазин-деацилазы (КФ 3.5.1.17) из почек свиньи. По аналогии можно предположить, что в плазме крови кролика присутствует фермент амидогидролаза,

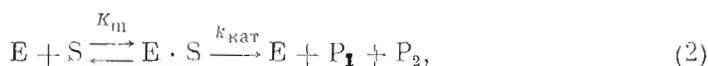
который гидролизует амидные группировки на карбоксильных группах белков и приводит к образованию ряда более кислых производных, из которых самое кислое будет легко выводиться из организма с мочой [13]. Таким образом может регулироваться уровень данного ингибитора в организме млекопитающего.

Как уже указывалось, одной из задач данной работы являлось дальнейшее изучение механизма взаимодействия ТКСТИ с трипсином и химо-трипсином. При выполнении этих исследований использовали «суммарный» препарат ТКСТИ, поскольку выше было показано, что изоформы ТКСТИ (I—V) имеют одинаковую удельную активность по отношению к трипсину и химотрипсину и близки структурно.

Взаимодействие природных ингибиторов с протеиназами может быть охарактеризовано кинетическими константами диссоциации комплекса фермент—ингибитор ( $K_i$ ), а также константами скоростей процессов образования ( $k_i$ ) и распада ( $k_{-i}$ ) этих комплексов. Так, ассоциация трипсина с его белковыми ингибиторами характеризуется первым порядком по отношению как к ферменту, так и к ингибитору, значения констант скоростей лежат в пределах  $10^6$ — $10^7$   $M^{-1} c^{-1}$  [14]. Константы скорости диссоциации имеют первый порядок относительно концентрации комплекса и характеризуются величинами  $10^{-4}$ — $10^{-6}$   $c^{-1}$  [14].

Ранее нами было показано, что константа диссоциации комплекса ТКСТИ — трипсин равна  $6 \cdot 10^{-10}$   $M$  [2]. Чтобы расширить представления о характере взаимодействия ТКСТИ с трипсином, нами была оценена константа скорости диссоциации их комплекса ( $k_{-i}$ ) методом, основанным на освобождении трипсина из комплекса ТКСТИ — трипсин при добавлении низкомолекулярного субстрата этилового эфира *N*-бензоиларгинина [15].

Этот процесс может быть описан следующей системой уравнений:



где  $E$  — фермент,  $I$  — ингибитор,  $E \cdot I$  — комплекс фермента с ингибитором,  $S$  — субстрат,  $E \cdot S$  — комплекс Михаэлиса фермента с субстратом,  $K_m$  — константа Михаэлиса для данного субстрата,  $k_{кат}$  — константа скорости гидролиза субстрата, равная  $0,28$   $c^{-1}$  [15],  $P_1$  и  $P_2$  — продукты реакции.

Уравнение (1) описывает диссоциацию комплекса  $E \cdot I$ , уравнение (2) — процесс гидролиза низкомолекулярного субстрата ферментом, освобождающимся из комплекса с ингибитором.

Березиним с соавт. [15] было показано, что при малых глубинах распада комплекса  $E \cdot I$  математическая обработка системы уравнений (1) и (2) приводит к следующему выражению для скорости ( $v$ ) реакции гидролиза субстрата:

$$v = \frac{k_{кат} [S]_0}{K_m + [S]_0} \sqrt{K_i [E \cdot I]_0} + \frac{k_{кат} [E \cdot I]_0}{K_m + [S]_0} \cdot k_{-i} t, \quad (3)$$

где  $K_i$  — константа диссоциации комплекса,  $t$  — время, в течение которого изменяется гидролиз субстрата.

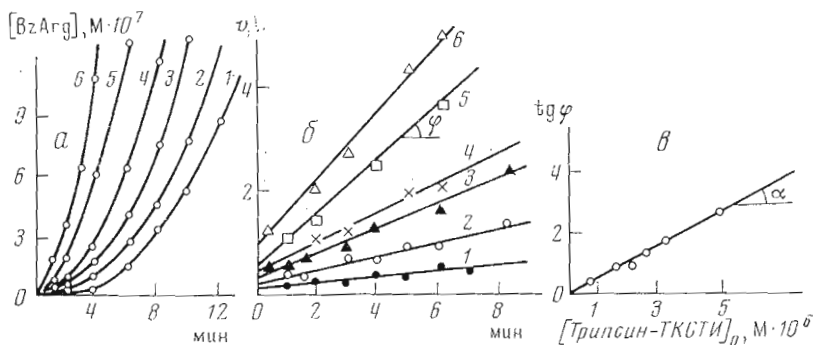


Рис. 5. Определение константы скорости диссоциации ( $k_{-1}$ ) комплекса ТКСТИ — трипсин ( $[BzArgOEt]_0 = 5 \cdot 10^{-4}$  М, объем пробы 3 мл): а — кинетические кривые образования продукта (BzArg) реакции гидролиза BzArgOEt трипсином, находящимся в равновесии с комплексом ТКСТИ — трипсин (концентрации комплекса 0,8 (1), 1,25 (2), 2(3), 2,7 (4), 3,3 (5), 5 (6) мк М; б — прямые, выражающие зависимость гидролиза BzArgOEt трипсином ( $v$ , М · мин $^{-1}$  · 10 $^7$ ) от времени (для прямых 1—6 концентрации комплексов ТКСТИ — трипсин те же, что для соответствующих кривых рис. 5, а); в — зависимость  $\operatorname{tg} \varphi$  (М · с $^{-2}$  · 10 $^{10}$ ) от концентрации комплекса ТКСТИ — трипсин

При условии  $[S]_0 \gg K_m$  выражение (3) принимает вид

$$v = k_{\text{кат}} \sqrt{K_1 [E \cdot I]_0} + k_{\text{кат}} [E \cdot I]_0 k_{-1} t. \quad (4)$$

Опыты, проводимые нами для оценки величины  $k_{-1}$ , заключались в получении хроматографически очищенного комплекса ТКСТИ с трипсином (трипсин—ТКСТИ) и последующей регистрации гидролиза этилового эфира бензоиларгинина трипсином, освобождающимся из этого комплекса при добавлении субстрата. Последующая графическая обработка экспериментальных данных, в соответствии с уравнением (4), давала возможность вычислить величину  $k_{-1}$ .

Были построены экспериментальные кривые накопления бензоиларгинина во времени при гидролизе субстрата трипсином, освобождающимся из комплекса трипсин—ТКСТИ (рис. 5, а), методом касательных к этим кривым найдены значения для скоростей реакции ( $v$ ) в заданный момент времени ( $t$ ), построены прямые в координатах  $v \div t$  и вычислены тангенсы углов наклона ( $\operatorname{tg} \varphi$ ) этих прямых (рис. 5, б). Затем была построена зависимость  $\operatorname{tg} \varphi$  от концентрации комплекса трипсин—ТКСТИ (рис. 5, в) и по тангенсу угла наклона полученной прямой ( $\operatorname{tg} \alpha$ ) вычислена величина  $k_{-1} = \operatorname{tg} \alpha / k_{\text{кат}}$ , равная  $(1,8 \pm 0,3) \cdot 10^{-4}$  с $^{-1}$ .

Значение константы скорости реакции ассоциации ( $k_1$ ) трипсина с ТКСТИ, полученное из экспериментальных констант  $K_1$  и  $k_{-1}$  по уравнению  $k_1 = k_{-1} / K_1$ , равно  $3 \cdot 10^6$  М $^{-1}$  с $^{-1}$ .

Таким образом, на основании полученных величин  $K_1$  и  $k_{-1}$  данный гликопротеид можно отнести к эффективным ингибиторам трипсина.

Взаимодействие ТКСТИ с химотрипсином приводит к образованию менее прочного комплекса, чем с трипсином. Так, величина константы диссоциации комплекса ( $K_1$ ), полученная ранее при использовании в качестве субстрата *n*-нитрофенилацетата, равна  $6 \cdot 10^{-6}$  М [2]. Определение в данной работе  $K_1$  методом титрования по Грину [16], но в присутствии специфического субстрата этилового эфира *N*-ацетилтирозина позволило уточнить эту величину (рис. 6). Она оказалась равной  $(9 \pm 3) \cdot 10^{-8}$  М, т.е. на два порядка ниже определенной ранее.

Поскольку ТКСТИ способен образовывать прочные комплексы как с трипсином, так и с химотрипсином, представляет интерес вопрос о числе

реактивных центров на молекуле данного гликопротеида. Ингибирование, происходящее на двух неперекрывающихся центрах, должно приводить к тому, что трипсин и химо трипсин будут связываться с ТКСТИ одновременно; если же эти ферменты связываются на одном или двух перекрывающихся участках на молекуле ТКСТИ, они будут конкурировать в связывании ингибитора.

Для выяснения этого вопроса мы изучали одновременно взаимодействие ТКСТИ с трипсином и химо трипсином (рис. 7). Как оказалось, образование комплекса химо трипсина с ТКСТИ приводит к потере последним анти триптической активности, вследствие чего повышается скорость гидролиза субстрата трипсином (рис. 7, а, 3).

Аналогичная картина наблюдается и при гидролизе специфического субстрата химо трипсином в присутствии ТКСТИ, преинкубированного с трипсином (рис. 7, б).

Полученные результаты говорят о конкурентном характере связывания трипсина и химо трипсина с ТКСТИ, что позволяет предполагать наличие одного или двух близкорасположенных реактивных центров на молекуле гликопротеида.

О существовании двух близкорасположенных центров свидетельствуют данные по химическому модифицированию гуанидогрупп остатков аргинина, в том числе и остатка аргинина, входящего в реактивный центр ТКСТИ, предназначенный для связывания трипсина [2]. Модифицированный таким образом ингибитор полностью лишен анти триптической активности [2], но сохраняет ингибирующую способность (~50%) относительно химо трипсина. Другими словами, ТКСТИ, в котором блокирован реактивный центр для связывания трипсина, частично сохраняет способность связывать химо трипсин.

Таким образом, результаты данной работы расширили наши представления о механизме взаимодействия ТКСТИ с трипсином и химо трипсином

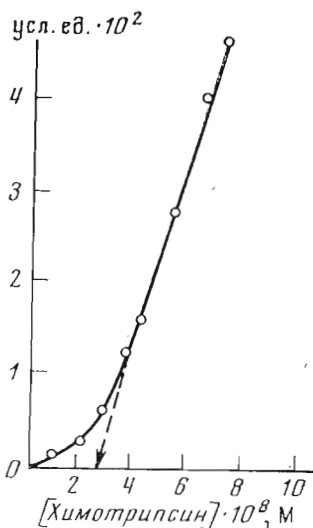


Рис. 6. Кривая титрования ТКСТИ ( $1,6 \cdot 10^{-8}$  М) химо трипсином в присутствии AcTyrOEt ( $1,5 \cdot 10^{-3}$  М). Условия:  $25^\circ$ , 0,05 М трис-HCl-буфер, pH 8, объем пробы 3 мл

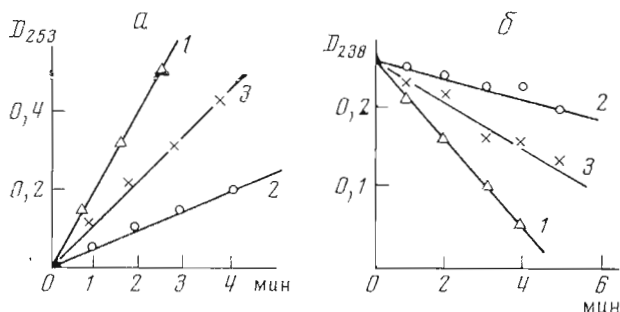


Рис. 7. Конкурентное взаимодействие ТКСТИ с трипсином (а) и химо трипсином (б). (Условия см. в подписи к рис. 6). а — гидролиз BzArgOEt трипсином без ТКСТИ (1) и в присутствии ТКСТИ (2), а также в присутствии ТКСТИ, преинкубированного с химо трипсином (3):  $[BzArgOEt]_0 = 5 \cdot 10^{-4}$  М,  $[трипсин]_0 = 7 \cdot 10^{-8}$  М,  $[ТКСТИ]_0 = 4 \cdot 10^{-8}$  М,  $[химо трипсин]_0 = 4 \cdot 10^{-8}$  М. б — гидролиз AcTyrOEt химо трипсином без ТКСТИ (1) и в присутствии ТКСТИ (2), а также в присутствии ТКСТИ, преинкубированного с трипсином  $[AcTyrOEt]_0 = 1,5 \cdot 10^{-3}$  М,  $[химо трипсин]_0 = 1,7 \cdot 10^{-7}$  М,  $[ТКСТИ]_0 = 7,8 \cdot 10^{-8}$  М,  $[трипсин]_0 = 7,3 \cdot 10^{-8}$  М



и позволили отнести ТКСТИ к типу белковых ингибиторов «постоянного» (permanent) [17] действия, а также высказать гипотезу о существовании в его молекуле двух реактивных центров для связывания трипсина и химотрипсина. Систематический анализ природы гетерогенности ТКСТИ позволил установить идентичность его изоформ в отношении биологической специфичности и структуры.

Процесс взаимодействия ТКСТИ с трипсином можно рассматривать как модель для изучения механизма действия ТКСТИ с сериновыми протеазами. Вероятно, физиологическая роль ТКСТИ, так же как и других известных ингибиторов плазмы крови млекопитающих [17], не связана в организме с ингибированием трипсина или химотрипсина. В настоящее время ведутся поиски фермента или ферментов, специфическое торможение которых определяет физиологическую роль ТКСТИ и подобных ему ингибиторов в организме млекопитающих.

## Экспериментальная часть

Использовали следующие препараты и реактивы: кристаллические препараты трипсина и химотрипсина (Ленинградский мяскокомбинат им. С. М. Кирова); этиловые эфиры N-ацетилтирозина и N-бензоиларгинина, N-ацетилтирозин (Reanal, Венгрия), глицин,  $\beta$ -аланин (Reanal, Венгрия), трис основной (Sigma, США), кумасси голубой GL (Serva, ФРГ), амфолины (ЛКВ, Швеция), сахароза (BDH, Англия), нейраминидаза из *Vibrio cholerae* (Serva, ФРГ).

Активность трипсина измеряли спектрофотометрическим методом по скорости гидролиза этилового эфира N-бензоиларгинина [18].

Активность химотрипсина определяли модифицированным спектрофотометрическим методом Шверта и Такенаке [19]. К 0,1—0,4 мл раствора химотрипсина  $4,5 \cdot 10^{-8}$  —  $1,8 \cdot 10^{-7}$  М в 0,0025 М HCl, содержащей 0,01 М CaCl<sub>2</sub>, добавляли 0,05 М трис-HCl-буфер (pH 7,8) до объема 0,5 мл, после чего приливали 3 мл  $1,5 \cdot 10^{-3}$  М этилового эфира N-ацетилтирозина в том же буфере. Оптическую плотность регистрировали на СФ-16 при 238 нм против  $0,8 \cdot 10^{-3}$  М N-ацетилтирозина в 0,05 М трис-HCl-буфере, рН 7,8. Отсчеты делали каждую минуту в течение 15 мин.

Антитриптическую активность ТКСТИ измеряли по торможению активности трипсина спектрофотометрически [18] и выражали в условных ингибиторных единицах (ИЕ). 1 ИЕ соответствует активности ингибитора, тормозящей расщепление 1 мкмоль этилового эфира N-бензоиларгинина в 1 мин в стандартных условиях.

Ингибиторную активность ТКСТИ относительно химотрипсина измеряли по торможению активности химотрипсина. К 0,1 мл раствора фермента ( $4,5 \cdot 10^{-8}$  —  $1,8 \cdot 10^{-7}$  М) в 0,0025 М HCl, содержащей 0,01 М CaCl<sub>2</sub>, добавляли 0,1—0,4 мл раствора ТКСТИ ( $1 \cdot 10^{-8}$  —  $2,5 \cdot 10^{-7}$  М) в 0,05 М трис-HCl-буфере, рН 7,8. Объем пробы доводили до 0,5 мл тем же буфером, после чего приливали 3 мл  $1,5 \cdot 10^{-3}$  М этилового эфира N-ацетилтирозина в 0,05 М трис-HCl-буфере (pH 7,8) и измеряли значение оптической плотности каждую минуту при 238 нм в течение 5—15 мин против  $0,8 \cdot 10^{-3}$  М N-ацетилтирозина в рабочем буфере.

За условную единицу антихимотриптической активности (усл. ед.) принимали активность ингибитора, тормозящего расщепление этилового эфира N-ацетилтирозина в 1 мин в стандартных условиях, выраженную в изменении оптической плотности при 238 нм.

Препаративное изоэлектрофокусирование препарата ТКСТИ проводили по методу [20] в приборе фирмы ЛКВ, в градиенте pH 3—5 и градиенте плотности сахарозы 50—4% с 1% амфолинами при напряжении 300—500 В при 6° в течение 60 ч.

На колонку ( $v$  110 мл) наносили от 30 до 60 мг ТКСТИ (30—35 ИЕ/мг) во всем объеме «легкого градиентного раствора». По окончании изоэлектрофокусирования собирали фракции по 1,5 мл и в каждом измеряли рН, удельную антитриптическую (ИЕ/мг белка) и антихимотриптическую активность (усл. ед./мг белка). Содержание белка в пробах элюата регистрировали по поглощению при 280 нм.

Объединенные фракции I—V (рис. 2, а) подвергали гель-фильтрации на сефадексе G-50 для освобождения от амфолинов и сахарозы и лиофилизовали.

*Диск-электрофорез* нативных и обработанных различными способами препаратов ТКСТИ в полиакриламидном геле проводили в следующих условиях: 1) 11 % гель, трис-глициновый буфер, рН разделения 9,5 (метод Дависа [21]); 2) 10% гель, 0,1 М Na-фосфатный буфер, рН 7,0 в присутствии и в отсутствие додецилсульфата натрия и мочевины [22]; 3) 12% гель, 0,05 М  $\beta$ -аланин-HCl-буфер, рН разделения 5,5 [23].

Для обнаружения зон белка столбики геля окрашивали 0,2% раствором кумасси голубого в 7% уксусной кислоте в течение 30 мин; избыток красителя отмывали 7% уксусной кислотой.

*Методы определения углеводов\**. Аминосахара определяли методом Эльсона — Моргана в модификации Рондля [24, 25], при определении нейтральных гексоз использовали методику Брукнера [26], определение нейраминаевой кислоты проводили по Уоррену [27].

*Десульфирование ТКСТИ* осуществляли а) обработкой нейраминидазой из *Vibrio cholerae* по методике работы [4] или б) кислотным гидролизом 0,01 н.  $H_2SO_4$  при 80° в течение 1 ч.

*Гидролиз амидных группировок* проводили по методике [8]. ТКСТИ предварительно обрабатывали 0,2%  $\beta$ -меркаптоэтанолом и 8 М мочевиной. От низкомолекулярных реагентов освобождались гель-фильтрацией на сефадексе G-25 (super fine), уравновешенном 0,01 М трис-HCl-буфером, рН 9,2. Белковые фракции объединяли и инкубировали в этом же буфере при 37°. Через каждые 24 ч из реакционной смеси отбирали пробы, которые подкисляли 0,01 н. HCl до рН 7, обессоливали диализом против дистиллированной воды, после чего исследовали электрофорезом в 11% полиакриламидном геле при рН разделения 9,5. Возможность омыления амидных группировок в указанных выше условиях была подтверждена гидролизом *L*-аспарагина с получением *L*-аспарагиновой кислоты. За ходом гидролиза *L*-аспарагина следили по электрофорезу на бумаге при 400 В, рН 6,5 (пиридин — вода — уксусная кислота, 1 : 980 : 19).

*Определение величины константы скорости диссоциации комплекса ТКСТИ—трипсин* проводили по методу Березина и согр. [15]. Хроматографически очищенный комплекс ТКСТИ—трипсин получали смешиванием 5,5 мг ТКСТИ в 1 мл 0,05 М трис-HCl-буфера (рН 8) с 5 мг активного трипсина (с учетом содержания активного трипсина в препарате) в 1 мл того же буфера. Смесь выдерживали 30 мин при 4°, затем вносили в колонку (200 мл) с сефадексом G-75, уравновешенным рабочим буфером. Элюцию вели 0,05 М трис-HCl-буфером (рН 8), собирая фракции по 3 мл. В каждой фракции определяли поглощение при 280 нм. Фракции, содержащие комплекс ТКСТИ—трипсин и не содержащие примеси трипсина, использовали для дальнейшей работы. Концентрацию хроматографически очищенного комплекса ТКСТИ—трипсин определяли по количеству ингибитора, освобожденного из комплекса после обработки последнего 5% трихлоруксусной кислотой.

К хроматографически очищенному комплексу ТКСТИ—трипсин ( $1,2 \cdot 10^{-6}$  —  $7,5 \cdot 10^{-6}$  М) в объеме 2 мл 0,05 М трис-HCl-буфера (рН 8) доба-

\* Образцы моносахаридов любезно предоставлены И. В. Цветковой (лаборатория патологии углеводного обмена Института биологической и медицинской химии АН СССР).

вляли 1 мл  $1,5 \cdot 10^{-3}$  М этилового эфира N-бензоиларгинина в том же буфере и производили измерения при 253 нм в течение 10—15 мин.

Аминокислотный анализ компонентов ТРСТИ был выполнен следующим образом: 1—1,5 мг каждого изоингибитора (I, III—V) гидролизовали в 1 мл 6,0 н. HCl в вакуумированных запаянных ампулах в течение 24 и 66 ч при  $105^\circ$ . Число остатков оксиаминокислот определяли экстраполяцией полученных для них значений к нулевому времени гидролиза, число остатков лейцина и изолейцина рассчитано по данным для 66-часового гидролиза белка. При расчетах исходили из ранее полученных данных [1] о наличии в молекуле ингибитора 9 остатков фенилаланина и 13 остатков лизина.

Определение содержания аминокислот в гидролизатах проводили в приборе Beckman-200.

Мы выражаем благодарность сотруднице Всесоюзного научно-исследовательского института генетики и селекции промышленных микроорганизмов Е. А. Тимохиной за выполнение аминокислотных анализов.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Нартикова В. Ф., Пасхина Т. С. (1975) Биоорг. химия, 1, 340—345.
2. Оглоблина О. Г., Якубовская Р. И., Платопова Л. В., Пасхица Т. С. (1975) Биоорг. химия, 1, 1176—1187.
3. Waheed A., Salahuddin A. (1975) Biochem. J., 147, 139—144.
4. Frenoy J.-P., Bourrillou R. (1974) Biochim. et biophys. acta, 371, 168—176.
5. Davis J. G., Zahnley J. C., Donovan J. W. (1969) Biochemistry, 8, 2044—2052.
6. Siefing G. E., Jr., Castellino F. J. (1974) J. Biol. Chem., 249, 7742—7746.
7. Hiwada K., Wachsmuth E. D. (1974) Biochem. J., 141, 293—298.
8. Spero L., Warren J. R., Metzger J. F. (1974) Biochim. et biophys. acta, 336, 79—85.
9. Schneider L., Laskowski M. Sr. (1974) J. Biol. Chem., 249, 2009—2015.
10. Green L. J., Roark D. E., Bartelt D. (1974) Bayer-Symp. V. Proteinase inhibit. Berlin e. a., 188—198.
11. Inglis A. S., Roxburg C. M., Takayanagi H. (1974) Anal. Biochem., 61, 25—31.
12. Нартикова В. Ф., Пасхина Т. С. (1969) Биохимия, 34, 282—292.
13. Jering H., Schorp G., Tschesche H. (1974) Z. Physiol. Chem., 355, 1129—1134.
14. Means G. E., Rayn D. S., Feeley R. (1974) Accounts Chem. Res., 7, 315—320.
15. Березип И. В., Казанская Н. Ф., Ларионова Н. П. (1970) Биохимия, 35, 261—269.
16. Green N. M. (1953) J. Biol. Chem., 205, 535—551.
17. Werle E., Zickgraf-Rüdel G. (1972) Z. Klin. Chem. und Klin. Biochem., 10, 139—150.
18. Нартикова В. Ф., Пасхица Т. С. (1970) Биохимия, 35, 187—195.
19. Schwert G. W., Takenaka J. (1955) Biochim. et biophys. acta, 16, 570—575.
20. Vesterberg O., Svensson H. (1966) Acta chem. scand., 20, 820—834.
21. Davis B. J. (1964) Ann. N. Y. Acad. Sci. USA, 121, 404—427.
22. Weber K., Osborn H. (1969) J. Biol. Chem., 244, 4406—4412.
23. Стронгин А. Я., Левин Е. Д., Степагов В. М. (1974) Химия природн. соедин., 226—229.
24. Elson J., Morgan W. T. J. (1933) Biochem. J., 27, 1824—1828.
25. Rondll C. M. J., Morgan W. T. J. (1955) Biochem. J., 61, 586—589.
26. Brückner J. (1955) Biochem. J., 60, 200—205.
27. Warren L. (1959) J. Biol. Chem., 234, 1971—1975.

Поступила в редакцию  
9.IV.1976

# MODE OF ACTION AND POLYMORPHISM OF THE ACID-RESISTANT TRYPSIN AND CHYMOTRYPSIN INHIBITOR FROM RABBIT SERUM

OGLOBLINA O. G., YAKUBOVSKAYA R. I., PLATONOVA L. V.,  
STRONGIN A. Ya., PASKHINA T. S.‡

*Institute of Biological and Medical Chemistry, Academy of Medical Sciences of the USSR, Moscow; Institute of Genetics and Selection of Industrial Microorganisms, Moscow*

The nature of polymorphism of the thermo- and acid-resistant trypsin and chymotrypsin inhibitor from rabbit serum has been investigated. By preparative isoelectric focusing the inhibitor was resolved into 5 isoforms with  $pI$  3.60, 3.73, 3.88, 4.05 and 4.14. Amino acid and sugar composition of the isoforms were established, and the data obtained, along with those for partial hydrolysis of dicarboxylic acid amides, suggest that polymorphism of the highly purified inhibitor arises as a consequence of a different number of amides present in isoforms. The inhibitor complex with chymotrypsin is characterized by dissociation constant  $K_i = 9 \cdot 10^{-8}$  M, and that with trypsin has the rate constant of  $1.8 \cdot 10^{-4}$  sec $^{-1}$ . Based on kinetic measurements and chemical modification of the inhibitor functional groups, two closely situated reactive sites were assumed in the active center for binding trypsin and chymotrypsin.

---