



УДК 577.156

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ТРИПСИНА С ЛИНЕЙНЫМИ  
ПОЛИКАРБОНОВЫМИ КИСЛОТАМИ

*Миргородская О. А., Иванова Г. П., Панзрин Е. Ф.,  
Москвичев В. В.*

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

Изучен автолиз трипсина в растворе в присутствии полиэлектролитов на основе предельных карбоновых кислот. Обнаружено, что скорость автолиза трипсина возрастает при его взаимодействии с полиэлектролитом, причем увеличение скорости тем больше, чем больше доля карбоксилсодержащего компонента в полимере. Предполагается, что наблюдаемое явление обусловлено возрастанием эффективной концентрации фермента вблизи полимерной цепи в результате электростатического взаимодействия между макромолекулами трипсина и полимера, имеющими разные знаки заряда.

В работах [1,2], посвященных изучению действия полиэлектролитов на протеолитические ферменты, показано, что электрохимическая природа полиэлектролита оказывается определяющей в явлении денатурации или стабилизации фермента. Взаимодействие анионов полиметакриловой кислоты с трипсином приводит к дестабилизации фермента [1]. Представляло интерес выяснить механизм инактивирующего воздействия полианионов на фермент на примере взаимодействия с трипсином сополимеров кротоновой кислоты с винилпирролидоном, в которых карбоксильные группы наиболее равномерно распределяются в цепи и нет блоков, состоящих из кротоновой кислоты [3]. Характер инактивации трипсина в присутствии сополимеров карбоновых кислот, по-видимому, можно сопоставить с инактивацией фермента под действием биополимера гепарина. Взаимодействие трипсина с гепарином имеет место при использовании фермента в качестве лекарственного препарата.

Цель настоящей работы заключалась в изучении особенностей взаимодействия трипсина с полиэлектролитами, несущими различное количество карбоксильных групп. В работе были использованы сополимеры винилпирролидона и кротоновой кислоты (ВПК, см. табл. 1), синтез которых описан ранее [3].

Взаимодействие фермента с полиэлектролитом проводилось нами в условиях, соответствующих оптимальной активности фермента (рН 7,85; 30°). В этих условиях цепь полиэлектролита полностью ионизована и несет отрицательный заряд, а глобула белка в целом имеет заряд положительного знака, что может приводить к сильному электростатическому взаимодействию между ними. Необходимо было убедиться, что механизм инактивации фермента при этом не отличается от механизма инактивации чистого трипсина, для которого в указанных условиях характерна автолитическая денатурация. На рис. 1 показано, что в присутствии полимера ВПК-3, содержащего 25% кротоновой кислоты, инактивация фермента, так же как и в исходном трипсине, сопровождается накоплением альфа-аминного азота. Это позволяет предположить, что механизм его инакти-

Физико-химические свойства полиэлектролитов (П) и их влияние на константу автолиза трипсина

Полимер	Содержание кroноновой кис- лоты в П, мольный %	Моля. вес, $\bar{M}$ [%, 131]	Концентрация COOH-групп при $k_{\max}$ , мм	$k_{\max}/k_0$
ВПК-1	12,4	50 000	2,8	4
ВПК-2	20,6	40 000	1,3	15
ВПК-3	24,9	25 000	0,7	38
ВПК-4	31,6	16 000	0,4	80
Поливинилпирролидон	—	12 000	0	1
Альгиновая кислота	100,0	48 000—186 000	0,1	26
Крононовая кислота	100,0	86,09	0	1

Примечание. ВПК — сополимер винилпирролидона и крононовой кислоты,  $k_0$  — константа скорости автолиза нативного трипсина,  $k_{\max}$  — константа максимальной скорости автолиза фермента (в присутствии полиэлектролита).

Таблица 2

Зависимость константы скорости автолиза трипсина ( $6 \cdot 10^{-6}$  М) от присутствия в растворе добавок полимерного и низкомолекулярного электролитов

Добавки к раствору трипсина	$k$ , $c^{-1}M^{-1}$	$k/k_0$	$^{\circ}C$	Добавки к раствору трипсина	$k$ , $c^{-1}M^{-1}$	$k/k_0$	$^{\circ}C$
—	37,0	1,0	30	ВПК-3 + 0,001 н. Ca <sup>2+</sup>	37,0	1,0	30
ВПК-3	1140,0	38,0	30	—	7,9	1,0	22
ВПК-3 + 0,2 н. Na <sup>+</sup>	36,0	1,0	30	Гепарин	395,0	50,0	22

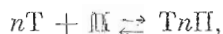
вазии в обоих случаях одинаков. Кроме того, в специальных опытах нами было показано, что присутствие полимера не приводит к изменению исходной активности фермента. Кинетика инактивации фермента в присутствии полимера (рис. 2) может быть изображена в виде прямых линий в координатах  $1/[T]_t - t$  ( $[T]_t$  — концентрация активного фермента в моль/л в момент времени  $t$ ), что соответствует кинетике процесса, протекающего по 2-му порядку

$$\frac{d[T]_t}{dt} = -k[T]_t^2.$$

Последнее можно также рассматривать как подтверждение автолитического механизма денатурации фермента в присутствии полимера. Графики, подобные приведенному на рис. 2, использовали для расчета константы скорости инактивации трипсина в различных условиях.

Исследование зависимости скорости автолиза трипсина от концентрации полиэлектролита в растворе показало, что она имеет экстремальный характер (рис. 3), причем в точке экстремума скорость автолиза трипсина в присутствии полиэлектролита значительно превышает скорость автолиза нативного фермента в тех же условиях.

Изучение аррендусовской зависимости автолиза трипсина в присутствии полимера ВПК-3 (рис. 4) показало снижение кажущейся энергии активации автолитической денатурации на 12 ккал/моль (с 37,5 ккал/моль, соответствующей автолизу нативного фермента, до 25,5 ккал/моль в присутствии полимера). Можно предположить, что обнаруженное явление — следствие ассоциации трипсина на полимере, протекающей по схеме



где  $T$  — трипсин,  $M$  — полиэлектролит,  $n$  — стехиометрический коэффициент, причем  $n \geq 2$ . Эффективная локальная концентрация фермента при этом возрастает в результате накопления двух или большего числа

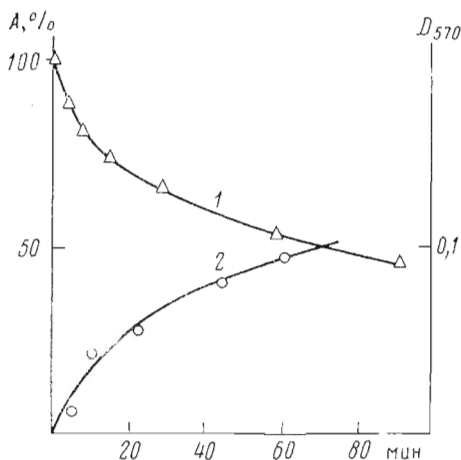


Рис. 1

Рис. 1. Остаточная активность ( $A$ , %) трипсина (1) в присутствии полимера ВПК-2 и накопление  $\alpha$ -аминного азота (2) в этой же системе

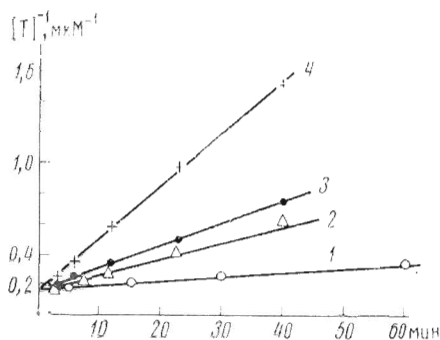


Рис. 2

Рис. 2. Анаморфозы кинетических кривых инактивации нативного трипсина ( $T$ ) и фермента в присутствии различных концентраций ВПК-2 (мг/мл): 0,02 (2), 0,53 (3), 2,7 (4)

его молекул на полимерной цепи. Последнее отражается на резком возрастании кажущейся константы скорости автолиза фермента. При дальнейшем увеличении концентрации полиэлектролита в растворе наблюдается перераспределение молекул трипсина между отдельными полимерными цепями:



так что  $n/m + 1 \rightarrow 1$  при  $m \rightarrow \infty$ . Эффективная концентрация трипсина снижается, приближаясь к таковой для раствора в среднем, и на зависимости относительной константы скорости от концентрации полиэлектролита наблюдается спад (рис. 3).

Максимальное увеличение относительной константы скорости автолиза  $k_{\text{макс}}/k_0$  для изученных полимеров, как следует из данных табл. 1 и рис. 3, пропорционально содержанию остатков кротоновой кислоты в сополимере, и экстремальное ускорение достигается при меньших концентрациях полимера в растворе. Симбатное изменение доли отрицательно заряженных ионизованных карбоксильных групп в цепи полимера и параметров автолитической денатурации фермента позволяет предположить, что определяющим в процессе денатурации трипсина является кулоновское взаимодействие.

Как видно из табл. 1, поливинилпирролидон не оказывает влияния на кинетику денатурации трипсина. Константа автолитической денатурации фермента не изменяется также и в присутствии мономера кротоновой кислоты. Таким образом, в основе явления ускорения автолиза трипсина лежит полимерный эффект, возникающий в результате электростатического взаимодействия гибкоцепного сополимера кротоновой кислоты с макромолекулой трипсина.

Взаимодействие трипсина с жесткоцепным полиэлектролитом — альгиновой кислотой — приводит к менее выраженному эффекту ускорения автолиза фермента, по-видимому, в результате не столь благоприятных условий для осуществления электростатического взаимодействия компонентов, как это имеет место в присутствии гибкоцепных сополимеров с кротоновой кислотой.

Еще одно свидетельство в пользу предположения об определяющей роли электростатического взаимодействия между полимером и трипси-

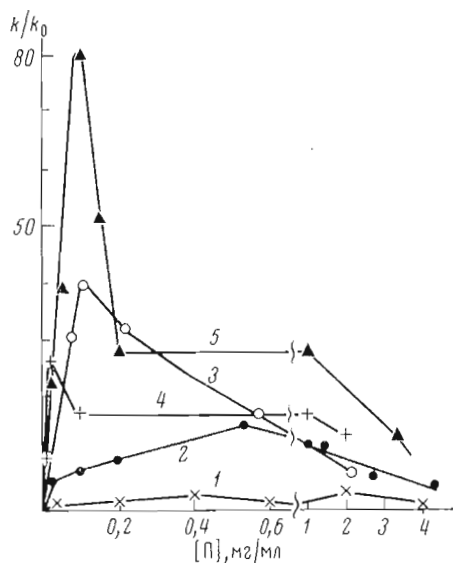


Рис. 3

Рис. 3. Зависимость относительной константы скорости автолиза трипсина от концентрации полиэлектролитов в растворе [П]: 1 — ВПК-1, 2 — ВПК-2, 3 — ВПК-3, 4 — альгиновая кислота, 5 — ВПК-4

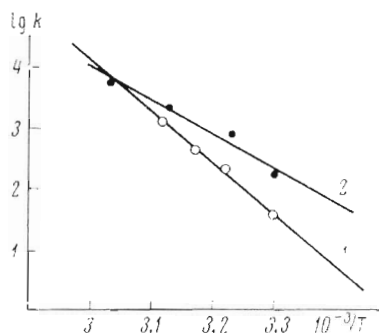
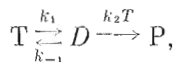


Рис. 4

Рис. 4. Зависимость от обратной абсолютной температуры ( $1/T$ ) логарифма константы скорости автолиза ( $\mu\text{-моль}^{-1}\cdot\text{с}^{-1}$ ) нативного трипсина (1) и трипсина в присутствии 4 мг/мл полимера ВПК-3 (2)

ном — снижение интенсивности подобных эффектов в присутствии низкомолекулярных электролитов, таких как  $\text{NaCl}$ ,  $\text{CaCl}_2$  (табл. 2). Введение в раствор фермента  $\text{NaCl}$  в концентрации 0,2 н. не оказывает существенного влияния на автолиз трипсина и вместе с тем полностью исключает ускорение автолиза трипсина в присутствии полимера, причем величина отношения  $k_{\text{макс}}/k_0$  снижается от 38 до 1. Аналогичное влияние на взаимодействие полимера с ферментом оказывают ионы  $\text{Ca}^{2+}$ .

Ускорение автолиза трипсина, наблюдаемое в растворе полиэлектролитов, необходимо, по-видимому, учитывать при оценке возможного биологического действия фермента, поскольку *in vivo* он может взаимодействовать с биополимерами, например гепарином, являющимся сильно ионизованным полиэлектролитом. Так, если константа скорости автолиза нативного трипсина при  $22^\circ$  составляет  $\sim 7,9 \text{ с}^{-1}(\text{моль/л})^{-1}$ , то в присутствии гепарина, взятого в концентрации 0,5 мг/мл, при pH 7,85 и температуре  $22^\circ$  в среде без минеральных ионов  $\text{Na}^+$  и  $\text{Ca}^{2+}$  автолиз фермента возрастает в 50 раз. Следует отметить, что в указанных условиях инактивация трипсина, по-видимому, протекает по двухстадийному механизму:



где D — денатурированная форма фермента, P — продукты автолиза. Эффективная константа скорости инактивации  $k$ , как следует из работы [4],

$$k = k_1 k_2 / k_{-1}.$$

Не исключено, что ускорение автолитической инактивации в присутствии полиэлектролита помимо эффекта «концентрирования» может также вызываться сдвигом равновесия первой стадии в сторону образования большего количества денатурированной формы фермента. Однако в настоящее время не представляется возможным определить  $k_i$  на отдельных стадиях процесса.

Таким образом, взаимодействие трипсина с полиэлектролитами кислотного характера сопровождается ускоренной автолитической денатурацией по сравнению с исходным ферментом. Предположение об определяющем влиянии электростатической природы взаимодействия между обоими компонентами рассматриваемой системы подтверждается симбатным изменением константы автолиза фермента и долей карбоксилсодержащего компонента в полимере, а также снижением относительной скорости автолиза трипсина в присутствии полимера при увеличении концентрации минеральных ионов.

### Экспериментальная часть

В работе использовали трипсин фирмы Spofa (ЧССР), дополнительно очищенный гель-хроматографией на G-50 по методу, описанному ранее [1], альгиновую кислоту производства Fluka AG (Швейцария), гепарин производства Spofa. Сополимеры винилпирролидона с кротоновой кислотой и поливинилпирролидон получали по методу, описанному ранее [3], методика определения средневязкостного молекулярного веса сополимера описана там же. Концентрацию активного трипсина [Т/Т] рассчитывали на основании результатов определения активности фермента, исходя из величины удельной активности использованного в работе фермента, равной 31,0 ед. акт./мг белка, и предполагая, что весь белок в очищенном исходном препарате является активным ферментом. Во всех экспериментах по изучению кинетики инактивации трипсина исходная концентрация активного фермента составляла  $6 \cdot 10^{-6}$  М. Измерения проводили при рН 7,85 и температуре 30° в 0,05 М трис-НСl-буфере. Протеолитическую активность трипсина определяли по модифицированной методике Кунитца [5], белок — по методу Лоури [6],  $\alpha$ -аминный азот — по методу Мура и Штейна [7].

### ЛИТЕРАТУРА

1. Кольцова С. В., Гликина М. В., Илларионова Н. Г., Самсонов Г. В. (1974) Молекулярн. биология, 5, 225—230.
2. Кольцова С. В., Илларионова Н. Г., Панарин Е. Ф., Рудковская Г. Д., Самсонов Г. В. (1975) Изв. АН СССР. Сер. хим., № 3, 643—649.
3. Ушаков С. Н., Кропачев В. А., Трухманова Л. Б., Груз Р. И., Маркелова Т. М. (1967) Высокомолек. соед., X (A), 1806—1813.
4. Антонов В. К., Воротынцева Т. И., Коган Г. И. (1970) Молекулярн. биология, 4, 240—244.
5. Kunitz M. (1947) J. Gen. Physiol., 30, 291—310.
6. Lowry O. H., Rosenbrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. (1951) J. Biol. Chem., 193, 265—275.
7. Moore S., Stein W. (1948) J. Biol. Chem., 176, 367—388.

Поступила в редакцию 5.IV.1976  
После доработки 16.VI.1976

### STUDIES ON TRYPSIN INTERACTION WITH LINEAR POLYCARBOXYLIC ACIDS

MIRGORODSKAYA O. A., IVANOVA G. P., PANARIN E. F.,  
MOSKIVITCHEV B. V.

*The All-Union Research Technological Institute  
of Antibiotics and Enzymes, Leningrad*

Autolysis of trypsin in solution was studied in the presence of polyelectrolytes based on unsaturated carboxylic acids. The rate of trypsin autolysis was found to increase on interaction with the polymer, the more so, the greater was the content of carboxyl component in the polymer. Such an increase was assumed to be determined by higher effective concentration of the enzyme near the polymeric chain as a result of electrostatic interaction between the trypsin and polymer macromolecules having the charges of opposite sign.