



УДК 577.156.02

ВЛИЯНИЕ ХИМИЧЕСКОЙ МОДИФИКАЦИИ ТРИПСИНА НА ЕГО ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ С РАЗЛИЧНЫМИ СУБСТРАТАМИ И ИНГИБИТОРАМИ

*Миргородская О. А., Богачева Т. И., Зайцева Л. А.,
Москвичев Б. В.*

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

Рассматривается химическая модификация трипсина сополимером винилпирролидона и коричной кислоты. Показано, что модифицированный трипсин по сравнению с нативным ферментом сохраняет 50% исходной казеинолитической активности, обладает более высокой молекулярной массой и большей стабильностью в условиях автолиза; его рН-оптимум несколько сдвинут в щелочную область. Связывание трипсина с полимером приводит к значительному снижению сродства фермента к ингибитору из соевых бобов и ингибиторам сыворотки крови человека и к увеличению в несколько раз его фибринолитической активности. Изменения каталитических свойств протеиназы объясняются взаимодействием отрицательно заряженной полиэлектролитной матрицы фермента с субстратами и ингибиторами.

Химическое связывание протеолитических ферментов с полимерами может служить основой для получения новых тромболитических лекарственных средств. Высокомолекулярные производные ферментов, как правило, обладают повышенной устойчивостью в среде организма [1, 2]. Модификация протеиназ может приводить также к значительным изменениям каталитических свойств ферментов. Данная работа посвящена изучению процесса связывания трипсина (КФ 3.4.21.4) с синтетическим водорастворимым сополимером винилпирролидона и коричной кислотой и изучению влияния полимерного окружения на взаимодействие трипсина с низко- и высокомолекулярными субстратами и ингибиторами.

Модификацию трипсина сополимером винилпирролидона и коричной кислоты (далее — полимер) проводили с помощью водорастворимого карбодимида (*n*-толуолсульфонат-*N'*-циклогексил-*N'*-β-(4-метилморфолий)этилкарбодимида — КДИ); в результате реакции происходит образование амидной связи между карбоксильными группами полимера и аминокгруппами белка.

При ковалентном связывании трипсина с полимером происходит значительная инактивация фермента, по-видимому, вследствие модификации аминокислотных остатков, важных для поддержания нативной конформации [3]. При выборе условий связывания необходимо было также учитывать электростатическое взаимодействие фермента с поликарбоновой кислотой. Экспериментальные данные, представленные на рис. 1, указывают на то, что в присутствии полимера возрастает скорость автолитической денатурации трипсина в результате образования межмолекулярного дис-

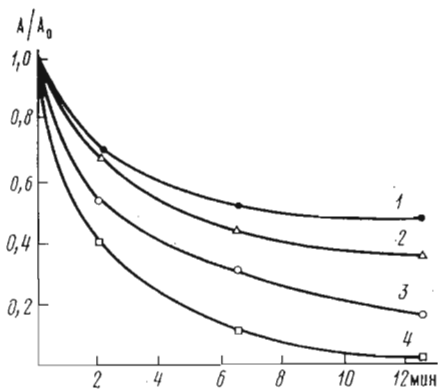


Рис. 1

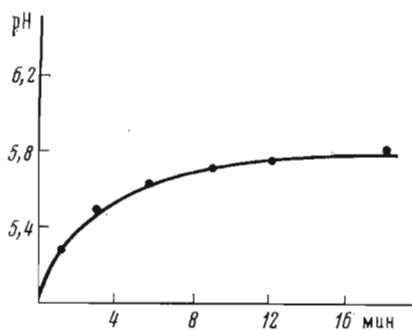


Рис. 2

Рис. 1. Инактивация трипсина в условиях автолиза в отсутствие (1) и в присутствии сополимера винилпирролидона и коричной кислоты в концентрации 0,04 (2), 0,4 (3), 2 мг/мл [4], $[E_0] 2 \cdot 10^{-5}$ М, 0,05 М трис-НСI-буфер, рН 8,0; А – активность

Рис. 2. Изменение рН в процессе активации сополимера винилпирролидона и коричной кислоты карбодимидом. Пояснения в тексте

социрующего комплекса между трипсином и полимером. Этот эффект, по-видимому, носит общий характер, он был подробно изучен на примере взаимодействия протеиназ с различными полиэлектролитами: сополимерами винилпирролидона и кротоновой кислоты [4], гепарином [5, 6], декстрансульфатом [7, 3]. Электростатическое взаимодействие фермента с полиэлектролитом и сопровождающую его инактивацию протеиназы можно в значительной степени исключить введением в раствор NaCl в концентрации, превышающей 0,25 М [3].

Чтобы свести к минимуму взаимодействие трипсина с карбодимидом, также приводящее к инактивации фермента, было решено разделить процесс модификации на две стадии: активацию полимера с помощью КДИ и ацилирование трипсина активированным полимером. Активацию полимера карбодимидом проводили в водном растворе при рН 5,0; при этом наблюдалось увеличение рН раствора (рис. 2). Прекращение изменения рН рассматривали как окончание процесса активации. Ацилирование трипсина активированным полимером проводили в присутствии 0,25 М NaCl при рН 8,0. Как показало изучение продуктов связывания трипсина с активированным полимером методом ТСХ на сефадексе G-150, в этих условиях в растворе не оставалось свободного трипсина. Модификация трипсина сопровождалась увеличением молекулярной массы ферментативно активного производного по сравнению с нативным ферментом. Подвижность продукта ковалентного связывания трипсина с поликарбоновой кислотой на тонкослойных гелевых хроматограммах была близка к подвижности голубого декстрана с $M 2\ 000\ 000$. Казеинолитическая активность модифицированного трипсина составляла 50% от исходной.

При изучении полимерного производного трипсина особое внимание было уделено его взаимодействию с субстратами и ингибиторами различных типов.

На рис. 3 представлены кривые автолитической денатурации нативного и модифицированного трипсина. Модифицированный трипсин значительно устойчивее в этих условиях по сравнению с нативным. Отношение констант скоростей автолитической денатурации второго порядка равно 12. Следует отметить, что полная инактивация нативного трипсина в смеси с полимером в соотношении, эквивалентном их содержанию в модифицированном трипсине (1:2), протекает в этих условиях в течение нескольких секунд. Высокая стабильность модифицированного фермента по отноше-

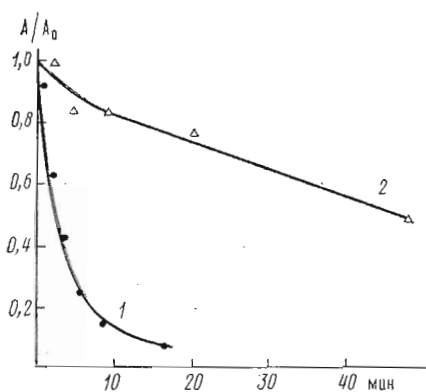


Рис. 3

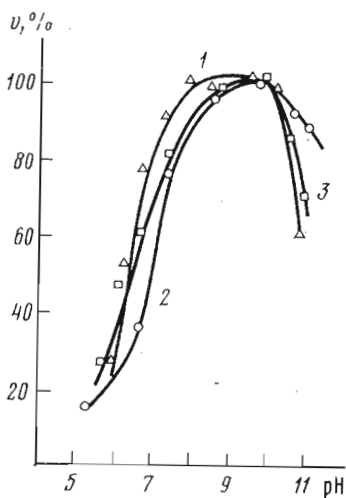


Рис. 4

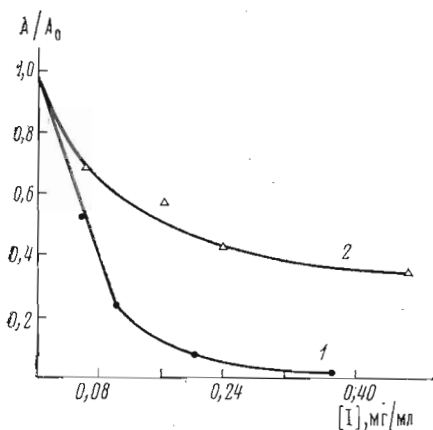


Рис. 5

Рис. 3. Инактивация нативного (1) и модифицированного (2) трипсина (концентрация 6 и 2 мкМ соответственно) в условиях автолиза: 0,05 М трис-НСl-буфер, pH 8,0; 47° С

Рис. 4. Зависимость от pH скорости гидролиза этилового эфира N-бензил-L-аргинина нативным (1) и модифицированным (2, 3) трипсином при ионной силе раствора 0,05 (1, 2) и 0,3 (3)

Рис. 5. Ингибирование нативного (1) и модифицированного (2) трипсина (концентрация 0,42 и 2,89 мкМ соответственно) ингибитором из соевых бобов

нию к автолизу, по-видимому, обусловлена, во-первых, пространственным и электрохимическим экранированием молекулы трипсина полимерной матрицей, выступающей в роли субстрата, и, во-вторых, тем, что при связывании с полимером в трипсине оказываются модифицированными аминокислотные остатки лизина, т. е. именно те, к которым фермент проявляет специфическую активность [3, 9].

При изучении зависимости скорости ферментативного гидролиза этилового эфира бензоиларгинина от pH было показано, что pH-профиль модифицированного трипсина сдвинут в щелочную область (рис. 4). Смещение pH-оптимума протеиназ, связанных с полианионными матрицами, в условиях низкой ионной силы наблюдали ранее [3, 7, 8]. Оно объясняется локальным повышением концентрации водородных ионов в микроокружении фермента в результате их взаимодействия с полианионом полимера. Изменение концентрации водородных ионов вблизи молекулы трипсина приводит к кажущемуся сдвигу рК имидазольной группы, находящейся в активном центре. Величина этого сдвига оценивается по изменению величины рН, при которой скорость гидролиза субстрата равна половине ее предельного значения для нативного и модифицированного фермента. Она составляет 0,6 при μ 0,05 и становится близкой к нулю при увеличении ионной силы до 0,25.

Полимерное микроокружение фермента оказывает сильное влияние на его взаимодействие с высокомолекулярными ингибиторами и субстра-

Сравнительная характеристика свойств нативного и модифицированного трипсина

Трипсин	k автолиза, $M^{-1} \text{ c}^{-1}$ (47° C , $\text{pH } 8,0$)	K_i , M		A_{Φ}^M/A_{Φ}^N *	
		ингибитором из соевых бобов	ингибитора- ми сыворотки крови	a	b
Нативный	$2,2 \cdot 10^3$	$1,5 \cdot 10^{-10}$	$3,7 \cdot 10^{-9}$	1,0	1,0
Модифицированный	$1,8 \cdot 10^2$	$3,0 \cdot 10^{-6}$	$1,9 \cdot 10^{-5}$	13,0	4,0

* A_{Φ}^M и A_{Φ}^N — фибринолитическая активность модифицированного и нативного трипсина, определенная по лизису фибриновых сгустков (a) и на фибриновых пластинах (b).

тами. Связывание с полимером приводит к резкому снижению средства трипсина к соевому ингибитору (рис. 5), величина константы ингибирования при этом возрастает на 4 порядка (таблица). В результате химической модификации ослабляется также взаимодействие трипсина с ингибиторами сыворотки крови человека (таблица). Как отмечалось ранее [9], электростатическое взаимодействие оказывает сильное влияние на средство трипсина к ингибиторам. Нативный трипсин является поликатионом, и электростатическое притяжение между его макромолекулой и макромолекулой ингибитора, имеющей отрицательный заряд в условиях эксперимента, облегчает образование комплекса фермент — ингибитор. При модификации заряд молекулы трипсина меняет знак, и возникающее при этом электростатическое отталкивание способствует снижению средства его полимерного производного к ингибитору.

Сополимер винилпирролидона и коричной кислоты в известной степени является аналогом природного полианиона гепарина, обладающего сильным антикоагулянтным действием. Поэтому можно ожидать, что связывание трипсина с такой матрицей повлечет за собой изменение фибринолитических свойств протеиназы. Фибринолитическую активность нативного и модифицированного трипсина определяли двумя способами: по лизису фибриновых сгустков и на стабилизированных фибриновых пластинах. Результаты, полученные при использовании этих методов, хорошо согласуются между собой (таблица). В составе конъюгата с полимером трипсин обладает повышенной фибринолитической активностью. Активация трипсина при химической модификации является следствием взаимодействия полимерной матрицы с фибрином и продуктами его протеолитической дегградации. Промежуточные продукты, образующиеся в процессе ферментативного гидролиза фибрина и фибриногена, образуют диссоциирующие комплексы различного состава друг с другом, а также с исходными фибрином и фибриногеном [10, 11]. Взаимодействие отрицательно заряженной полимерной матрицы фермента с субстратом может влиять на ориентацию последней относительно активного центра трипсина. При этом модифицированный трипсин будет расщеплять иные пептидные связи в молекуле фибрина или фибриногена, нежели нативный [12]. Изменение структуры промежуточных продуктов протеолиза фибрина и фибриногена приведет к нарушению процесса их агрегации. Это повышает доступность частично гидролизованного субстрата для дальнейшего расщепления и тем самым приводит к увеличению фибринолитической активности трипсина.

Таким образом, связывание трипсина с поликарбоновой кислотой сопровождается значительными изменениями его взаимодействия с различными субстратами и ингибиторами. Следует отметить, что влияние полимерного микроокружения фермента на расщепление низкомолекулярного субстрата зависит от состава среды и исчезает при увеличении ионной силы. При взаимодействии модифицированного трипсина с высокооргани-

зованными макромолекулами (ингибиторами, фибриногеном) полиэлектролитные свойства матрицы полимера проявляются более отчетливо. Такие эффекты в меньшей степени зависят от ионной силы и могут наблюдаться в условиях, близких к физиологическим.

Модификация трипсина сополимером винилпирролидона и коричной кислоты, с одной стороны, защищает фермент от инактивации вследствие автолитического расщепления и под действием ингибиторов, с другой — обеспечивает более глубокую степень гидролиза фибрина.

Экспериментальная часть

В работе использовали кристаллический трипсин (Spofa, СССР), ингибитор из соевых бобов (Reanal, ВНР), бычий фибриноген отечественного производства), человеческий фибриноген (3-я станция переливания крови, Ленинград). Сополимер винилпирролидона и коричной кислоты, содержащий 30 мол. % коричной кислоты, предоставил ИВС АН СССР, а водорастворимый карбодимид (*n*-толуолсульфонат-N-циклогексил-N'-β-(4-метилморфолиний)этилкарбодимид) — ИОХ ССО АН СССР. Сыворотку крови человека получали из свежей донорской крови и использовали в течение 24 ч.

Связывание трипсина с сополимером винилпирролидона и коричной кислоты. Полимер (2 мг/мл) выдерживали в водном растворе в присутствии КДИ (4 мг/мл) при исходном рН 5,0 в течение 10—15 мин до достижения постоянного значения рН (~5,8). Полученный раствор приливали к раствору трипсина в буфере (рН 8,0), содержащем 0,2 М NaCl, до достижения весового соотношения полимер — трипсин, 2 : 1. Связывание фермента заканчивалось в течение 10 мин. Контроль полноты связывания осуществляли методом ТСХ на сефадексе G-150 в 0,05 М трис-HCl-буфере, рН 8,0 [13].

Казеиноподобную активность трипсина определяли по модифицированной методике Кунитца [13], эстеразную активность по этиловому эфиру бензоиларгинина — как описано в работе [14]. Определение фибринолитической активности по лизису сгустков и на стабилизированных фибриновых пластинах описано в работах [15, 16].

Методика изучения инактивации нативного и модифицированного трипсина в условиях автолитической денатурации и под действием ингибиторов, а также расчет константы скорости автолиза и константы ингибирования описан в нашей предыдущей работе [9].

Авторы считают своим приятным долгом выразить благодарность ст.н.сотр. Е. Ф. Панарину (ИВС АН СССР) за предоставленные образцы сополимера винилпирролидона и коричной кислоты.

ЛИТЕРАТУРА

1. Abuchowski A., McCoy J. R., Palczuk N. C., T. van Es, Davis F. F. (1977) J. Biol. Chem., 252, 3582—3589.
2. Gregoriadis G. (1977) Nature, 265, 407—411.
3. Иванова Г. П., Миргородская О. А., Панарин Е. Ф., Москвичев Б. В. (1977) Био-орган. химия, 3, 127—132.
4. Миргородская О. А., Иванова Г. П., Панарин Е. Ф., Москвичев Б. В. (1976) Био-орган. химия, 2, 1695—1699.
5. Миргородская О. А., Тенникова Т. Б., Москвичев Б. В. (1978) Биохимия, 43, 1924—1928.
6. Миргородская О. А., Иванова Г. П., Тенникова Т. Б., Москвичев Б. В. (1978) Био-орган. химия, 4, 972—977.
7. Стрельцова З. А., Браудо Е. Е., Толстогузов В. Б. (1975) Биоорган. химия, 1, 267—272.
8. Strelzowa S. A., Tolstogusow W. B. (1977) Colloid and Polymer Sci, 255, 1054—1066.
9. Богачева Т. И., Миргородская О. А., Москвичев Б. В. (1977) Биохимия, 42, 609—615.

10. Alkjaersig N., Davies A., Fletcher A. (1977) *Thrombos. Haemost.*, 38, 524—535.
11. Abe Takeshi, Kazama Mutsuyoshi, Takara Chieko, Miura Yasuhiro, Yasuda Junichi (1977) *Jap. J. Med. Sci. et Biol.*, 30, 91—99.
12. Alexander B., Riman A., Katchalski E. (1966) *Thrombos. Diathes. Haemorrh.*, 16, 507—525.
13. Богачева Т. И., Миргородская О. А., Москвичев Б. В. (1976) *Прикл. биохим. микробиол.*, 12, 428—431.
14. Schwert G. W., Takenaka Y. (1955) *Biochim. et biophys. acta*, 16, 570—575.
15. Баскова И. П. (1976) в кн.: *Практикум по физиологической химии*, с. 89, изд-во МГУ, М.
16. Конников А. П. (1953) *Тр. Ин-та эпидемиол., микробиол. и гигиены им. Пастера*, с. 35.

Поступила в редакцию
12.II.1979

EFFECT OF TRYPSIN CHEMICAL MODIFICATION ON ITS INTERACTION WITH VARIOUS SUBSTRATES AND INHIBITORS

MIRGORODSKAYA O. A., BOGACHEVA T. I., ZAITSEVA L. A.,
MOSKVICHEV B. V.

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

Trypsin was covalently bound to copolymer of vinylpyrrolidone and cinnamic acid using water-soluble carbodiimide. As compared to native enzyme, this preparation retains 50% of caseinolytic activity, is characterized by higher molecular weight, lesser propensity to autolysis, and pH optimum somewhat shifted to the alkaline region. The trypsin coupling to copolymer is accompanied by the reduction of enzyme affinity for both soy-bean and blood serum inhibitors with concomitant several-fold enhancement of the fibrinolytic activity. The described alterations of the enzymatic properties are accounted for by the interaction of the negatively charged enzyme-polymer matrix with substrates and inhibitors.