

**ВЛИЯНИЕ РЯДА ОРГАНИЧЕСКИХ РАСТВОРИТЕЛЕЙ
НА БИОЛОГИЧЕСКИЕ И НЕКОТОРЫЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ
СВОЙСТВА ПЕПСИНА И ПЕПСИНОГЕНА**

Л. А. Локшина, В. Н. Орехович, М. В. Склобовская

В связи с тем, что процесс превращения пепсиногена в пепсин, возможно, включает в себя изменения вторичной и третичной структуры молекулы белка, представляется интерес сравнительное исследование структуры этих белков. В настоящей работе мы проводили изучение некоторых физико-химических свойств пепсина и пепсиногена и их изменения под влиянием ряда органических растворителей, пытаясь выявить зависимость между структурой и биологической активностью белков. Исследовали влияние диоксана (ДО), диметилформамида (ДМФА) и этиленхлоргидрина (ЭХГ) на протеолитическую активность пепсина и способность пепсиногена превращаться в активный фермент, а также на вязкость и оптическое вращение этих белков.

Методика

Нами были использованы перегнанные и очищенные ДО, ДМФА и ЭХГ, кристаллические препараты пепсина и пепсиногена [1] и препараты этих белков, очищенные на колонке из DEAE-целлюлозы [2]. Измерения вязкости белковых растворов проводили при 25° в вискозиметре Оствальда (скорость истечения воды 75 сек). Оптическое вращение измеряли на фотоэлектрическом поляриметре¹. При работе с 1%-ной концентрацией белка и 100 мм-квадратной измерения проводили на 7 линиях ртутного спектра ($\lambda = 578, 546, 436, 405, 365, 334$ и 313 мкм). В случае 0,5%-ной концентрации белка и работы с 50 мм-квадратной из-за высокой относительной погрешности величин малых углов вращения, получаемых в области длинных волн (578 и 546 мкм), измерения проводили только на 5 линиях. Величины констант дисперсии оптического вращения (k и λ_c), дающие возможность судить о спирализации вторичной структуры белковой молекулы [3], рассчитывали по графикам, составленным на основании уравнения Друде $[\alpha] = k/(\lambda^2 - \lambda_c^2)$ [3].

Опыты проводили в следующих условиях: к водному раствору пепсина и пепсиногена добавляли органический растворитель, pH которого предварительно было доведено до 5,5. Через определенные промежутки времени проводили измерение протеолитической активности и вязкости. Протеолитическая активность определялась по расщеплению гемоглобина после предварительного разведения пробы водой. Фермент-субстратное отношение 1/1000.

Результаты исследований

В первых опытах по изучению действия ЭХГ и ДО на пепсин и пепсиноген (концентрация белков 100 $\mu\text{м.л}$) было обнаружено, что в присутствии 25—30%-ной концентрации ЭХГ и ДО происходит очень быстрая

¹ Прибор представляет собой переделанный прецизионный визуальный поляриметр, позволяющий проводить измерения в ультрафиолетовой области спектра. С этой целью в поляриметре была изменена поляризационная оптика (удалено полутеневое приспособление; никогда заменены призмами из папата, склеенными специальным клеем) и введена фотоэлектрическая регистрация углов вращения (зрительная труба заменена фотоумножителем ФЭУ-18, соединенным с зеркальным гальванометром). Источник света — ртутная лампа с монохроматором.

Угол вращения определяли по методу симметричных углов с хронометрическим учетом дрейфа нуля [4]. Относительная погрешность измерений угла вращения составляла 1—3%.

денатурация этих белков. Полная потеря активности пепсина и способности пепсиногена превращаться в активный фермент отмечалась уже через 1—3 мин. после добавления указанных растворителей. 20%-ная концентрация ЭХГ и ДО не оказывала столь сильного воздействия на пепсин и пепсиноген: через 5—10 мин. отмечалась только незначительная инактивация белков. В связи с тем, что при определении протеолитической активности проба сильно разводилась, и концентрация органического растворителя в момент определения активности не превышала 0,2—0,3%,

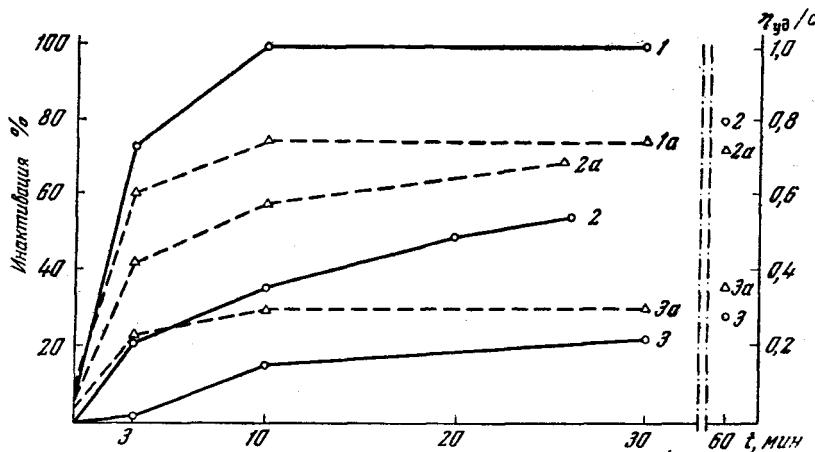


Рис. 1. Влияние ДО на активность и вязкость пепсина:

1, 2, 3 — активность пепсина после действия 50, 40 и 30%-ных растворов ДО;
1a, 2a, 3a — приведенная вязкость раствора пепсина в 50, 40 и 30% ДО

можно было заключить, что ЭХГ и ДО в концентрации 25—30% вызывают полную и необратимую (во всяком случае, в течение короткого времени) инактивацию пепсина и лишают пепсиноген способности превращаться в активный пепсин.

При проведении опытов с более высокими концентрациями белка в пробе (1—10 мг/мл) было обнаружено, что инактивация пепсина и пепсиногена под действием ДО протекает при более высоких концентрациях растворителя. Так, при концентрации белков 1 мг/мл полная потеря активности за 1—3 мин. отмечалась в 40%-ном растворе ДО, а при концентрации пепсина 10 мг/мл — в 50%-ном растворе ДО. В последнем случае в 30%-ном растворе ДО инактивация пепсина протекала весьма медленно (см. рис. 1) и даже после суточного действия растворителя отмечалось сохранение примерно 50%-ной активности. Наблюдаемое защитное действие высоких концентраций белка при инактивации ДО можно, вероятно, объяснить аутополиэлектролитным эффектом. Подобных исследований с ЭХГ провести не удалось из-за низкой растворимости пепсина и пепсиногена в 20—40%-ных растворах ЭХГ.

Обнаружив инактивирующее действие ЭХГ и ДО на пепсин и пепсиноген, мы занялись изучением вопроса относительно возможных изменений физико-химических свойств белков под действием этих растворителей. Для этого необходимо было, однако, работать с сравнительно высокими концентрациями белка в пробе (0,5—1%). Как уже указывалось, растворимость пепсина и пепсиногена в 20—40%-ных растворах ЭХГ крайне мала (200—500 μ /мл), и поэтому изучение вязкости и оптического вращения в этом случае оказалось невозможным. Растворимость пепсиногена в ДО также оказалась недостаточной для точного измерения вязкости и оптического вращения (в 40%-ном растворе ДО можно получить 0,2%-ный раствор белка). В силу этого для сравнительной характеристики изменений физико-химических свойств пепсина и пепсиногена нам пришлось исполь-

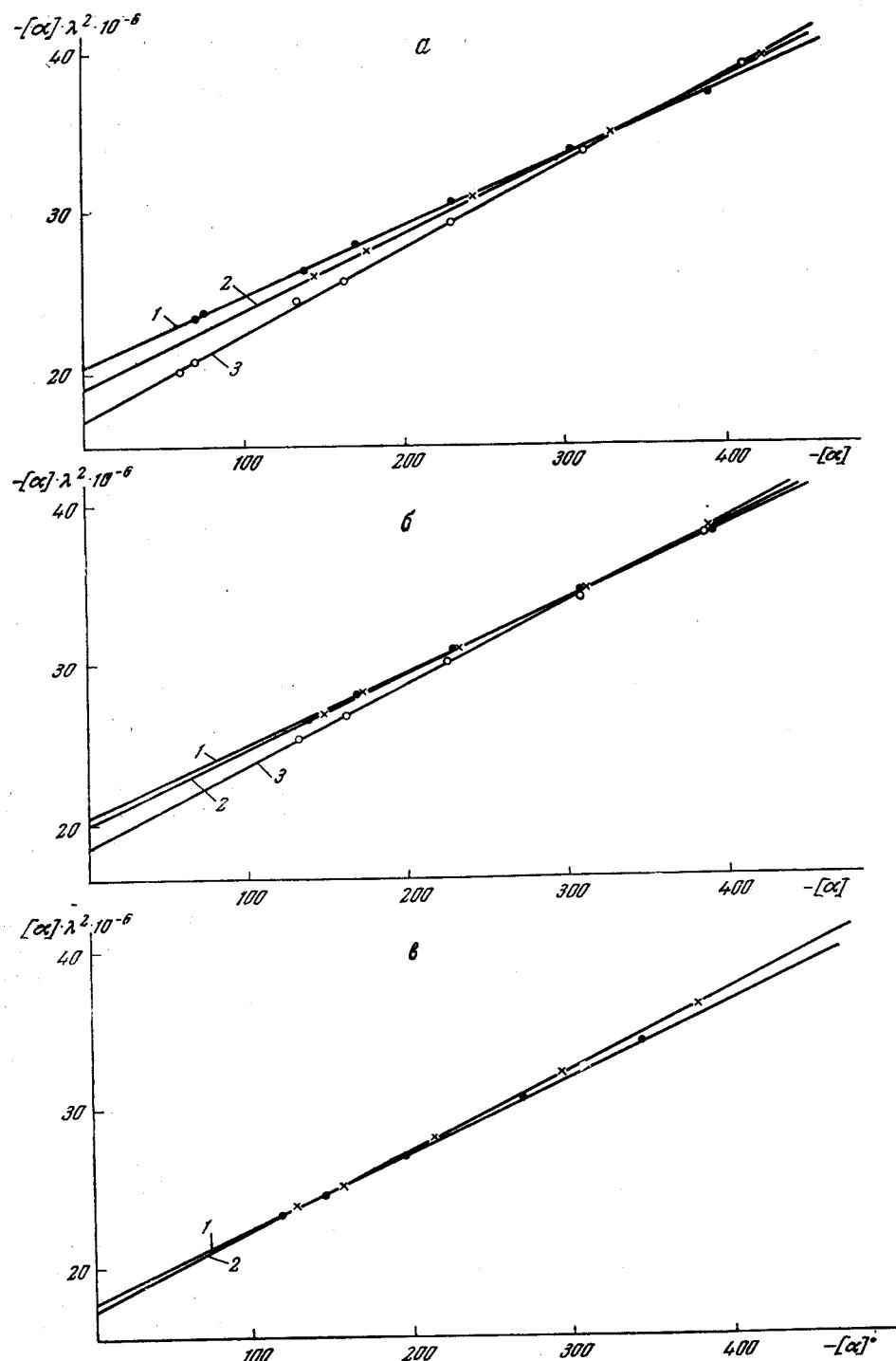


Рис. 2. Влияние ДО и ДМФА на дисперсию оптического вращения пепсина и пепсиногена.

а: 1 — пепсин нативный в H_2O ; 2 — пепсин в 30 % ДО; 3 — пепсин в 50 % ДО;
 б: 1 — пепсин нативный в H_2O ; 2 — пепсин в 30 % ДМФА; 3 — пепсин в 50 % ДМФА;
 в: 1 — пепсиноген нативный в H_2O ; 2 — пепсиноген в 40 % ДМФА

зователь еще один органический растворитель — ДМФА, который, как было обнаружено нами, также вызывает инактивацию белков.

Пепсин в отличие от пепсиногена очень хорошо растворим в ДО; и в этом случае оказалось возможным проследить за изменением формы молекулы в процессе его инактивации. Опыты проводили с ~1%-ным раствором пепсина. Как видно на рис. 1, в 50%-ном растворе ДО за первые 10 мин. происходит полная инактивация пепсина. При этом приведенная вязкость белкового раствора увеличивается с величины 0,05, характерной для нативного пепсина, до величины 0,70—0,75, т. е., в 15 раз. По мере дальнейшего действия ДО величина вязкости пепсина значительно не изменяется. На рис. 2 видно, что значения параметров оптического вращения — ротационной и дисперсионной констант k и λ_c — изменяются при замене воды на ДО от величин $k = 20,3 \cdot 10^6$ и $\lambda_c = 214 \text{ мк}$ для нативного белка до $k = 16,9 \cdot 10^6$ и $\lambda_c = 230 \text{ мк}$ для пепсина в 50%-ном растворе ДО. В 40%-ном растворе ДО процесс инактивации пепсина протекает более медленно: за 10 мин. происходит падение активности на 30—35%, за 30 мин. — примерно на 60% (рис. 1). Полная инактивация пепсина отмечалась только после двухчасового действия растворителя. Падение активности пепсина сопровождалось значительным увеличением вязкости раствора белка (см. рис. 1). Определения оптического вращения по ходу процесса инактивации нами не проводились из-за значительной продолжительности измерений.

Под влиянием 30%-ного раствора ДО активность пепсина изменялась сравнительно слабо, снижаясь после одн часового действия примерно на 30%. Сохранение активности белка отмечалось в течение нескольких суток. Приведенная вязкость пепсина изменялась параллельно изменению активности, увеличиваясь в этом случае до 0,36. Значения констант оптического вращения для пепсина в 30%-ном растворе ДО, измеренные после суточного действия растворителя при сохранении ~50%-ной активности фермента, были равны: $k = 18,8 \cdot 10^6$; $\lambda_c = 223 \text{ мк}$. Таким образом, из данных, полученных нами относительно действия ДО на пепсин, следует, что процесс инактивации пепсина сопровождается значительным увеличением вязкости раствора белка, что обусловлено раскручиванием белковой глобулы. Происходящее наряду с этим увеличение дисперсионной константы (λ_c) и соответствующее снижение ротационной константы (k) свидетельствуют об увеличении степени спиральности в молекуле.

Результаты опытов по изучению действия на пепсин ДМФА представлены на рис. 2 и 3. Как видно на рисунках, как и в ДО, в 30%-ном растворе ДМФА при 1%-ной концентрации белка происходит быстрая инактивация пепсина, сопровождающаяся резким увеличением вязкости и изменениями параметров оптического вращения. Под влиянием 30%-ного раствора ДМФА активность пепсина существенно не изменялась, в то время как вязкость увеличивалась в 7—8 раз по сравнению с исходным состоянием. Значения k и λ_c в этом случае были такими же, как и у нативного пепсина (таблица). Надо отметить, однако, что величины параметров оптического вращения пепсина, инактивированного 50%-ным раствором ДМФА, меньше отличаются от соответствующих значений для нативного белка, чем в случае пепсина, инактивированного 50% ДО. По-видимому, и сам процесс инактивации пепсина под действием ДМФА несколько отличен от инактивации ДО: при удалении ДМФА путем dialиза или при разведении пробы водой наблюдалась частичная реактивация пепсина.

Изучение изменений физико-химических свойств пепсиногена под действием ДМФА проводилось нами при концентрации белка 0,5% и концентрациях ДМФА 30 и 40%, так как при более высоких концентрациях пепсиногена и ДМФА отмечалось осаждение белка. Как видно из графика (рис. 4), под влиянием 40% ДМФА наблюдается постепенное снижение способности пепсиногена к активации: за 10 мин. способность

Таблица

Растворитель	Пепсин					Пепсиноген				
	активность, %	$\eta_{уд}/c$	b/a^1	$k \cdot 10^{-6}$, град. $m\mu^2$	λ_c , $m\mu$	способность к активации	$\eta_{уд}/c$	b/a^1	$k \cdot 10^{-6}$, град. $m\mu^2$	λ_c , $m\mu$
H_2O	100	0,05	5,5	$20,3 \pm 0,4$	214 ± 2	100	0,06	6,5	$17,5 \pm 0,4$	225 ± 2
50% ДО	0	0,074	35	$16,9 \pm 0,4$	230 ± 2					
30% ДО	100	0,23	17							
50% ДМФА	50	0,36	22	$18,8 \pm 0,4$	223 ± 2					
40% ДМФА	0		35	$18,6 \pm 0,4$	226 ± 2	80	0,28	20		
40% ДМФА						0	0,54	30		
30% ДМФА	100	0,26	18	$20,1 \pm 0,4$	216 ± 2	100	0,08	8	$17,1 \pm 0,4$	227 ± 2
	80	0,4	24							

¹ По уравнению Симха. Приводятся приближенные данные без экстраполяции приведенной вязкости к бесконечному разведению, специального определения удельного объема белков и учета гидратации.

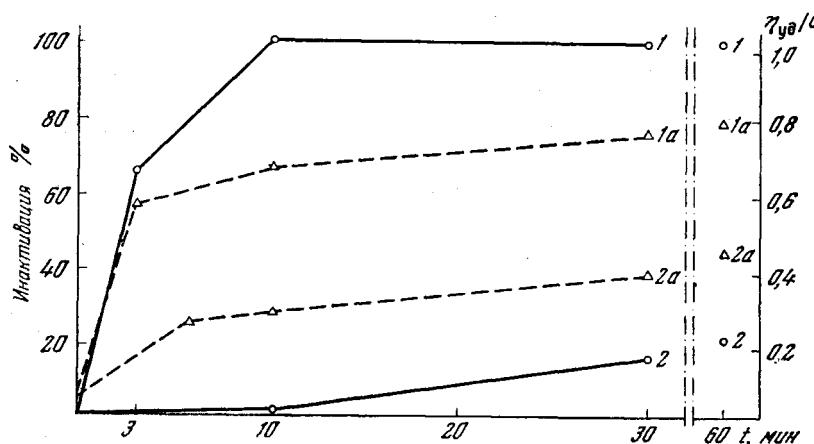


Рис. 3. Влияние ДМФА на активность и вязкость пепсина:

1, 2 — активность пепсина после действия 50 и 30% растворов ДМФА; 1a, 2a — приведенная вязкость раствора пепсина в 50 и 30% ДМФА

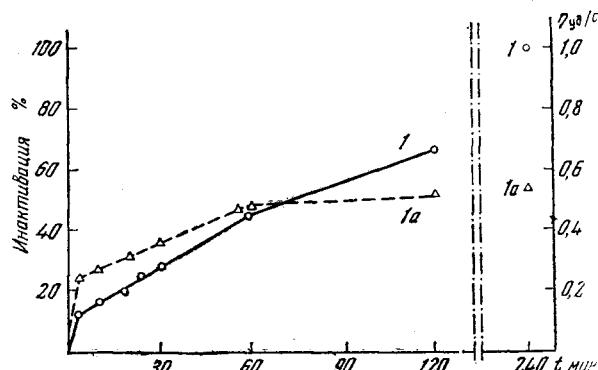


Рис. 4. Влияние ДМФА на активируемость и вязкость пепсиногена:

1 — активируемость пепсиногена после действия 40% раствора ДМФА; 1a — приведенная вязкость раствора пепсиногена в 40% ДМФА

пепсиногена превращаться в пепсин снижалась ~ на 20%, за 60 мин.—~ на 50%. Полная потеря активируемости пепсиногена отмечалась спустя 3—4 час. после начала действия ДМФА. Потеря пепсиногеном способности активироваться сопровождалась значительным увеличением вязкости раствора белка, которое, правда, было несколько меньше изменения вязкости при инактивации пепсина. Оптические свойства пепсиногена, однако, оставались почти без изменения: значения k и λ_c пепсиногена, утратившего способность превращаться в активный пепсин, мало отличались от таковых нативного белка (см. рис. 2 и таблицу). Под влиянием 30% ДМФА способность пепсиногена активироваться и вязкость белка изменились довольно слабо. Надо отметить, что инактивация пепсина и пепсиногена под действием ДО и ДМФА, как это было обнаружено нами, сильно зависит от pH среды, увеличиваясь при сдвиге pH в более щелочную область. В связи с тем, что при исследовании пепсиногена использование 50%-ной концентрации ДМФА было затруднено из-за низкой растворимости белка, для получения более быстрой инактивации в 40% ДМФА опыты проводились при pH ~ 6.

Более подробно влияние pH и некоторых ионов на инактивацию пепсина и пепсиногена ДО и ДМФА будет освещено в отдельном сообщении.

Обсуждение результатов

Из наших данных следует, что при частичной замене воды менее полярными органическими растворителями — ДО, ЭХГ и ДМФА — происходит быстрая инактивация пепсина и пепсиногена, сопровождающаяся значительными изменениями формы молекулы активного белка и его предшественника. Пепсин, как известно, является сравнительно устойчивым белком, выдерживающим нагревание до 60°, и не теряет активности в присутствии многих денатурирующих белки веществ [8, 10]. Характерным свойством пепсина является его большая лабильность по отношению к OH-ионам: при pH выше 6 происходит быстрая и практически необратимая инактивация пепсина [5, 6, 13]. Другие денатурирующие белки вещества, такие как мочевина, гуанидинхлорид, не оказывают на пепсин столь сильного действия [7, 9—11]. Инактивация пепсина под их влиянием протекает довольно медленно и обусловлена либо усилением автолиза пепсина (при pH 3—5), либо повышением чувствительности белка в OH-ионам (при pH выше 5) [10—11]. Сравнительно слабый эффект на пепсин мочевины и гуанидинхлорида — вещества, которые, как известно, разрушают водородные связи с молекулах белков, может свидетельствовать о том, что обычные водородные связи не играют особенно существенной роли в структуре молекулы пепсина. Это представление подтверждают, в известной мере, данные исследования оптического вращения нативного пепсина. Величина дисперсионной константы $\lambda_c = 212—216 \text{ мк}$, обнаруженная для пепсина рядом исследователей и подтвержденная нами, как уже отмечалось в работах Перлманн [10] и Иергенсонса [16], может указывать на низкое содержание или даже на отсутствие спирализованных участков в молекуле этого белка. В отличие от большинства исследованных белков, при денатурации которых наблюдается снижение величины λ_c , указывающее на разрушение вторичной структуры, инактивация пепсина щелочью, нагреванием и LiBr сопровождается увеличением λ_c [10, 15]. Как видно из полученных нами данных, суммированных в таблице, инактивация пепсина 50%-ным раствором ДМФА и особенно ДО, а также частичная инактивация 30%-ным раствором ДО сопровождается увеличением дисперсионной константы λ_c . Это может свидетельствовать о возможно происходящем увеличении степени спирализации полипептидной цепи. В 30%-ном растворе ДМФА, после действия которого пепсин сохраняет свою активность, значения λ_c белка мало отличаются от таковой нативного пепсина.

Пепсиноген, как видно из полученных нами данных, имеет величину $\lambda_c = 225-226 \text{ мкм}$, указывающую на наличие в молекуле а-спиральной конфигурации. При денатурации пепсиногена ДМФА, когда терялась его способность к активации, практически не наблюдалось изменения параметров оптического вращения, т. е. не происходило дополнительной спирализации молекулы. Наличие а-спиральной структуры в пепсиногене и возможно меньшее количество ее или отсутствие в пепсине, а также сделанное заключение о том, что инактивация пепсина сопровождается, по-видимому, увеличением спиральной конфигурации, позволяет высказать предположение, что для активности пепсина важна раскрученная форма полипептидной цепи, и что процесс активации пепсиногена, возможно, включает в себя деспирализацию какого-то участка вторичной структуры молекулы.

Однако наряду с высказанным предположением возможна также и другая трактовка полученных данных. Можно допустить, что в молекуле пепсина, как и в молекуле пепсиногена, имеются упорядоченные а-спиральные участки полипептидной цепи. Кроме них, в молекуле нативного пепсина может присутствовать какая-то специфическая конфигурация, возможно даже связанная с активностью фермента, которая влияет на величину λ_c , уменьшая ее (как например, левая спираль). Процесс инактивации пепсина сопровождается разрушением этой конфигурации, в пепсиногене она отсутствует.

Подобное предположение лучше согласуется с данными Доти, который, предложив новый способ расчета степени спиральной конфигурации в молекулах белков, нашел в пепсине около 30% упорядоченной спиральной структуры [17]. Однако указанный способ расчета не является строго количественным даже по мнению самого автора.

Механизм действия ЭХГ, ДО и ДМФА — веществ, менее полярных, чем вода, можно представить себе следующим образом [14, 7]. При частичной замене воды названными растворителями увеличивается сольватация гидрофобных боковых цепей, вследствие чего ослабляется их взаимодействие, т. е. ослабляется один из основных типов связей, стабилизирующих третичную структуру белковой молекулы. Наряду с этим из-за уменьшения диэлектрической постоянной среды усиливается электростатическое взаимодействие заряженных групп белка, что в случае пепсина — белка, содержащего 5—7 свободных основных групп и 35—38 свободных COOH-групп [12], будет сказываться в основном в усилении отталкивания одноименных отрицательных зарядов, что и поведет к растягиванию белковой глобулы. Вследствие двух названных причин происходит деформация третичной структуры нативного белка. Это мы и обнаруживаем по резкому увеличению вязкости. В результате нарушения третичной структуры белка, которая могла препятствовать образованию вторичной структуры на некоторых участках полипептидной цепи, происходит дополнительная спирализация белковой молекулы. Полученные нами данные хорошо согласуются с результатами работ Бреслера и сотр., Янга и Доти, показавшими дополнительную спирализацию яичного и сывороточного альбуминов, фиброна и некоторых других белков в растворах в ЭХГ, ДО и ряде других растворителей [3, 14].

Как видно из приведенных в таблице данных, при инактивации пепсина под действием 50%-ных растворов ДО и ДМФА происходит значительное растягивание белковой молекулы: степень асимметрии молекулы пепсина, рассчитанная по уравнению Симха, увеличивается примерно в 6 раз. Под влиянием более низких концентраций ДО и ДМФА, после действия которых не отмечалось значительной инактивации белка и существенных изменений его оптических параметров, также наблюдалось растягивание белковой глобулы: степень асимметрии молекулы увеличивалась в 3—4 раза. Аналогичные данные были получены и для пепсиногена. Этот факт может указывать на то, что третичная структура белка или отдельные ее участки

могут претерпевать довольно большие изменения, которые или не сказываются на биологической активности пепсина и его предшественника, или легко обратимы, восстанавливаясь при определении протеолитической активности после удаления органического растворителя.

Выводы

При частичной замене воды менее полярными органическими растворителями — ЭХГ, ДО и ДМФА — наблюдается инактивация пепсина и потеря способности пепсиногена превращаться в активный фермент.

При инактивации пепсина 50%-ными растворами ДО и ДМФА происходит значительное изменение формы молекулы белка: увеличение степени асимметрии белковой молекулы свидетельствует о растягивании белковой глобулы; изменения констант дисперсии оптического вращения указывают на возможность увеличения в молекуле белка количества спиральных участков.

Потеря способности пепсиногена превращаться в активный пепсин, происходящая под влиянием ДМФА, также сопровождается растягиванием белковой молекулы; однако существенных изменений во вторичной структуре белка в этом случае не обнаружено.

Институт биологической
и медицинской химии

Поступила в редакцию
11 XI 1960

ЛИТЕРАТУРА

1. Д. Нортроп, М. Кунитц, Р. Херриотт, Кристаллические ферменты, Изд. ин. лит., 1950.
2. Л. М. Гинодман, Доклад на годичной конференции ин-та биологич. и медицинской химии, 1960.
3. J. Yang, R. Doty, J. Amer. Chem. Soc., 79, 761, 1957.
4. H. Rudolph, J. Opt. Soc. America, 45, 5059, 1955.
5. H. Edelhoch, J. Amer. Chem. Soc., 79, 6100, 1957.
6. H. Edelhoch, J. Amer. Chem. Soc., 80, 6640, 1958.
7. H. Edelhoch, J. Amer. Chem. Soc., 80, 6648, 1958.
8. H. Edelhoch, Biochim. Biophys. Acta, 38, 113, 1960.
9. G. Perlmann, Arch. Biochem. and Biophys., 65, 210, 1956.
10. G. Perlmann, Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 45, 915, 1959.
11. O. Blumenfeld, J. Leonis, G. Perlmann, J. Biol. Chem., 235, 379, 1960.
12. O. Blumenfeld, G. Perlmann, J. Gen. Physiol., 42, 553, 1959.
13. S. Yanagi, F. Bovey, Federat. Proc., 17, 340, 1958.
14. С. Е. Бреслер, В. П. Кущнер, С. Я. Френкель, Биохимия, 24, 685, 1959.
15. B. Jirgensons, Arch. Biochem. and Biophys., 78, 235, 1958.
16. B. Jirgensons, Arch. Biochem. and Biophys., 85, 532, 1959.
17. P. Doty, Proc. 4 Intern. Congr. Biochem. v. 8, стр. 8, 1960.

EFFECT OF ORGANIC SOLVENTS ON BIOLOGICAL AND PHYSICOCHEMICAL PROPERTIES OF PEPSIN AND PEPSINOGEN

L. A. Lokshina, V. N. Orekhovich, M. V. Sklobovskaya

S u m m a r y

Partial replacement of water by the less polar organic solvents ethylene chlorohydride (ECH), dioxane (DO) and dimethylformamide (DMFA) is accompanied by inactivation of pepsin and the loss in ability of pepsinogen to transform into the active enzyme. Considerable changes in the shape of the protein molecule occur when pepsin is inactivated with 50% solutions of DO and DMFA; increase in viscosity of the protein solution by 15 fold as compared with the native protein bears evidence of a stretching of the globule; the change in the optical rotatory dispersion constants shows that helical areas may appear. The loss in ability of pepsinogen to transform into active pepsin taking place under the influence of DMFA is also accompanied by changes in the shape of the protein molecule, as can be seen from the corresponding increase in viscosity of solutions of this protein. The values of the optical rotation constants in this case, however, differ little from those of the native protein.