

УДК 678.01:53+678.01:54+577.156.3+577.156.4

**ИССЛЕДОВАНИЕ СТРУКТУРООБРАЗОВАНИЯ И ФЕРМЕНТАТИВНОЙ
АКТИВНОСТИ ФРАГМЕНТОВ ПЕПСИНА И ТРИПСИНА
В ПРОЦЕССЕ АВТОЛИЗА И ЭЛЕКТРОДИАЛИЗА**

**З. А. Капралова, С. Я. Мирлина, П. В. Козлов,
В. А. Каргин, Р. И. Калюжная**

В работах [1—3] по исследованию переноса протеинов через непористые мембранны в процессе высоковольтного электродиализа было обнаружено, что белки значительного молекулярного веса способны проникать через такую мембрану с последующим образованием высокоупорядоченных надмолекулярных структур. Последнее явление отмечено также при действии на растворы белков ультразвука и химических реагентов.

Было предположено, что указанные воздействия вызывают диспергирование белков на элементарные структурные единицы или блоки, способные к последующим процессам структурообразования.

С этой точки зрения представляло интерес изучить белки, выполняющие активные биологические функции в организме, в частности — ферменты на примере пепсина и трипсина.

Успехи, достигнутые за последнее время в изучении взаимосвязи между строением ферментов и их каталитической активностью, позволили установить, что у ферментов носителем ферментативных свойств является не вся молекула, а лишь локализованный участок белковой молекулы, так называемый «активный центр» [4—6].

В то же время показано, что для сохранения активного центра третичная и вторичная структуры белка не менее существенны, чем первичная. Иными словами, сохранение каталитической активности связано с поддержанием определенной пространственной структуры белковой молекулы в целом или некоторой ее части. Эта точка зрения подтверждается многочисленными исследованиями, в том числе и экспериментами по изучению каталитических свойств продуктов автолиза протеинов [5, 7—9], сохранение незначительной активности которых связано, по-видимому, еще с сохранением существенной для энзиматического действия вторичной и третичной структур.

Целью настоящей работы явилось изучение процессов распада и последующего структурообразования, происходящих при автолизе и электродиализе ферментов — пепсина и трипсина, а также исследование изменения ферментативной активности продуктов их распада.

Методика исследования

Методика пятикамерного электродиализа подробно описана в работах [10, 1—3]. В данной работе была использована камера очень небольшого объема (объем средней камеры — 9 см³, боковых — 10 см³). В качестве мембранны использовали целлофан (толщина — 0,05 мм, степень набухания в воде при комнатной температуре ~ 70%). Растворы из боковых камер для дальнейших исследований подвергали лиофильному высушиванию.

Электронномикроскопические исследования проводили на электронном микроскопе JEM-5J при увеличении $\times 10000$ — 50000 . Образцы, нанесенные на коллоксилиновую подложку, предварительно оттеняли германием или окисью вольфрама на вакуумной установке ВУП-2. Исследовали водные растворы ферментов с концентрацией 0,01—0,1 %.

Определение удельного вращения изучаемых ферментов проводили на поляриметре фирмы Хильгер и модернизированном спектрополяриметре [11]. Длина трубки — 0,5 дм. Концентрация водных растворов — до 0,1 %. Для определения констант дисперсии использовали уравнение Друде в его простой форме $[\alpha]_\lambda = k/(\lambda^2 - \lambda_c^2)$; λ_c находили по прямой зависимости $1/[\alpha]$ от λ [12].

Ферментативную активность пепсина определяли по гемоглобину, используя методику Нортропа [13]. Концентрации растворов контролировали по стандартным данным: оптическая плотность 0,1 %-ного раствора пепсина при 280 мкм равна 1,43.

Для определения активности трипсина была использована методика Туппи [14]. Выбранное время инкубации — 1 час, температура — 30°. Для прекращения энзиматической реакции применяли 30 %-ный раствор уксусной кислоты. Коэффициент поглощения растворов определяли при 410 мкм на спектрофотометре СФ-4. Концентрации растворов контролировали по стандартным данным: плотность 0,1 %-ного раствора при 280 мкм трипсина равна 1,4 [15].

Экспериментальные данные и их обсуждение

Для выяснения поведения пепсина при электродиализе была проведена серия опытов в различных условиях.

Результаты экспериментов представлены в табл. 1.

Таблица 1
Влияние условий проведения автолиза и электродиализа пепсина на его энзиматическую активность

Опыт, №	Температура, °C	Продолжительность опыта, часы	Изменение pH за время опыта	Исходное количество фермента, г	Максимальное напряжение, в	Количество фермента, оставшегося в средней камере		Количество фермента, прошедшего через мембрану в боковые камеры		Количество фермента, прошедшего в ловушку, %	Активность фермента на единицу концентрации по сравнению с исходной, %
						r	%	r	%		
1	15	10	4—6	0,2	450	—	—	—	—	—	0
2	7	10	4—6	0,2	200	—	—	—	—	—	0
3	8	7	4	0,2	50	—	—	—	—	—	0
4	10	8	5	0,25	Простой диализ						85
5	10	9	4—6	0,3	250	10,117	39	0,07	26	35	0
6	10	9	5	0,3	Контрольный опыт						67
7	37	10	4—6	0,3	400	10,087	30	10,102	34	36	0
8	37	10	5	0,3	Контрольный опыт						53
											65

Как видно из табл. 1, в процессе автолиза-электродиализа через мембрану в боковые камеры и ловушки проникает значительная часть фермента. Результаты измерений активности продуктов автолиза, прошедших мембрану, а также фермента, оставшегося в средней камере, позволяют сделать заключение о том, что в процессе автолиза-электродиализа образуются неактивные продукты, в то время как фермент, оставшийся в средней камере, сохраняет еще значительную ферментативную активность. При проведении электродиализа пепсина в 0,5M ацетатном буфере, pH=4 [9] и против буфера (табл. 1, опыт 3) в продуктах автолиза, прошедших в боковые камеры, также не было обнаружено ферментативной активно-

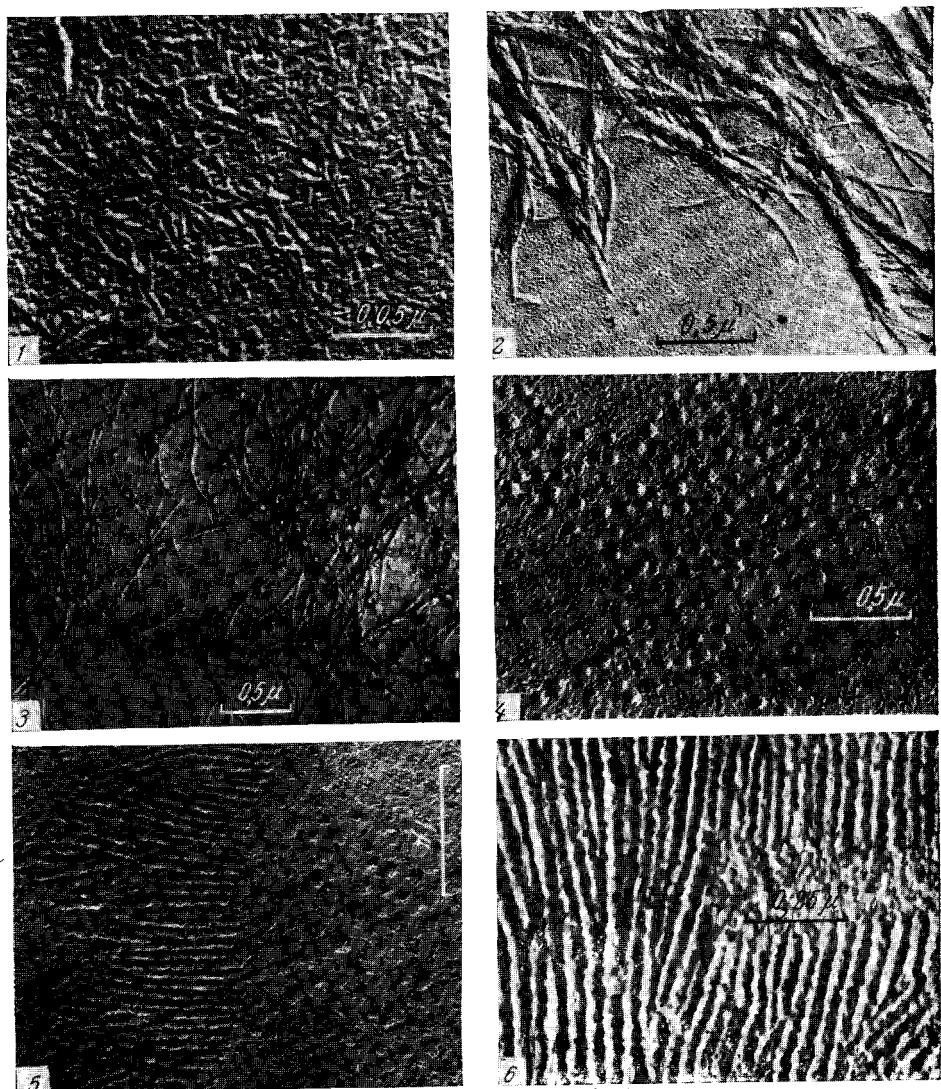


Рис. 1. Структура фрагментов трипсина, прошедших в боковые камеры в процессе электродиализа

Рис. 2, 3. Структура исходного трипсина

Рис. 4. Глобулярная структура исходного пепсина

Рис. 5, 6. Высокоупорядоченные структурные образования в исходном пепсине

сти. В данном случае измерение активности за время опыта (7 час.) было проведено дважды, через каждые 3,5 часа. Кроме того, для выяснения вопроса о возможности восстановления активности фермента при соединении продуктов автолиза, прошедших в боковые камеры и оставшихся в средней камере, была определена активность смеси равных количеств этих продуктов [16]. В данном случае увеличения активности не наблюдалось, что подтверждает глубокий автолиз фермента в средней и боковых камерах в процессе электродиализа.

Результаты исследования процесса автолиза-электродиализа трипсина представлены в табл. 2.

Таблица 2

Влияние условий проведения автолиза и электродиализа трипсина на его энзиматическую активность

Опыт, №	Температура, °C	Продолжительность опыта, часы	Изменение pH за время опыта	Исходное количество фермента, г	Максимальное напряжение, в	Количество фермента, прошедшего через мембрану в боковые камеры		Количество фермента, оставшегося в средней камере		Активность фермента на единицу концентрации по сравнению с исходной, %		
						г	%	г	%			
1	30—35	9	6—7	0,12	1000	0,027	22	0,004	3	75	0	—
2	27—33	5	6—7	0,11	800	0,018	16	0,013	12	72	0	20
3	30	5	6—7	0,1						6,6	67	
						Простой диализ						

Как видно из табл. 2, в процессе автолиза—электродиализа почти весь трипсин проходит в боковые камеры и большая его часть — в ловушки (до 75%). Количество фермента, оставшегося в средней камере, составляет лишь 3—12%.

Активность трипсина, находящегося в средней камере, уменьшается за время эксперимента в 5 раз. В продуктах автолиза, прошедших в боковые камеры, ферментативная активность не обнаружена.

Для выяснения происходящих в процессе автолиза-электродиализа изменений в структуре изучаемых ферментов были проведены измерения удельного вращения их водных растворов и вычислены константы дисперсии.

Результаты представлены в табл. 3.

Таблица 3

Зависимость (α)_λ от λ и константы дисперсии для исследуемых ферментов

Исследуемые продукты	рН	[α] _λ при различных длинах волн падающего света $\mu\text{м}$					λ_c
		589	578	546	436	405	
Исходный пепсин		4,6	60,3	—	—	—	—
Инактивированный пепсин		6	—	62,6	71,9	131,6	159,3
Продукты автолиза пепсина, прошедшие в боковые камеры	4	—	56	61	98,2	116,9	180±7
Продукты автолиза трипсина, прошедшие в боковые камеры	6—7	—	72	90,5	151,9	185,7	195±3

Таким образом, проведенные исследования показали, что получающиеся в процессе автолиза — электродиализа пепсина и трипсина продукты, обнаруживаемые в боковых камерах в значительных количествах, не проявляют ферментативных свойств.

Незначительная активность диализатов, наблюдалась при простом диализе исследуемых ферментов, может быть связана также с присутствием высокомолекулярной фракции белка, обнаруженной при седиментационных исследованиях. Однако специальные опыты по выделению высокомолекулярных фракций не были проведены, поэтому трудно установить, в какой мере эта фракция ответственна за наблюданную ферментативную активность.

Полученные в процессе автолиза-электродиализа фрагменты пепсина и трипсина были исследованы различными методами.

Седиментационные исследования фрагментов, прошедших мембрану при электродиализе, позволяют сделать вывод о присутствии в диализате только низкомолекулярной фракции, что подтверждается и низкими значениями приведенной вязкости, а также данными по оптическому вращению. Вычисленные на основании измерений удельного вращения при различных длинах волн константы дисперсии для продуктов автолиза пепсина (100 ± 7) и трипсина (195 ± 3) вполне согласуются с таковыми для беспорядочной конформации полипептидных цепей.

Электронномикроскопические исследования также подтвердили наличие низкомолекулярных фрагментов в растворах боковых камер. Для трипсина, прошедшего в боковые камеры, были обнаружены короткие цепочки с максимальной длиной до 500 \AA (рис. 1), в то время как для исходного трипсина были характерны высокоупорядоченные образования длиной до 10μ и выше и шириной $\sim 100 \text{ \AA}$ (рис. 2, 3). При исследовании исходного пепсина были обнаружены глобулы размером 500 \AA и выше (рис. 4), а также высокоупорядоченные структуры (рис. 5, 6), возникающие, очевидно, в результате линейной и боковой агрегации глобулярных частиц. Ширина полос таких образований составляет $\sim 500 \text{ \AA}$. Случай подобного взаимодействия глобулярных частиц отмечается в работах [17] для других белков, например инсулина, тропомиозина, актина и т. д.

Таким образом, проведенные исследования позволяют заключить, что в процессе электродиализа изучаемых ферментов происходит их глубокий автолиз с образованием низкомолекулярных фрагментов, не обладающих ферментативными свойствами, что, по-видимому, связано с разрушением специфической структуры ферментов и их активных центров.

Такие неактивные низкомолекулярные полипептиды, образующиеся в результате разрушения первичной структуры белка, т. е. разрыва полипептидной цепи, а также нарушения вторичной и третичной структур, обладая способностью проникать через целлюфановую мембрану, не склонны к последующему структурообразованию, приводящему к созданию высокоупорядоченных надмолекулярных структур [1—3].

Выводы

Исследование процессов автолиза-электродиализа ферментов пепсина и трипсина показало, что при этом образуются низкомолекулярные продукты, не обладающие ферментативной активностью и не способные к последующему структурообразованию.

В отличие от них для исследуемых исходных ферментов характерно образование высокоупорядоченных надмолекулярных структур.

Московский государственный
университет им. М. В. Ломоносова

Поступила в редакцию
26 VII 1963

ЛИТЕРАТУРА

1. В. А. Карагин, П. В. Козлов, С. Я. Мирлина, З. А. Капралова, Докл. АН СССР, 135, 1421, 1960.
2. З. А. Капралова, С. Я. Мирлина, П. В. Козлов, В. А. Карагин, Л. А. Попова, Высокомолек. соед., 4, 321, 1962.

3. В. А. Карагин, Н. В. Козлов, С. Я. Мирлина, З. А. Капралова, П. Ф. Чеботкевич, Высокомолек. соед., 4, 1882, 1962.
 4. Г. Нейрат, Сб. Современные проблемы биофизики, Изд. ин. лит., 1, 238, 1961.
 5. А. Е. Браунштейн, Сб. Актуальные вопросы современной биохимии, Изд. мед. лит., 2, 9, 1962.
 6. С. Е. Бреслер, Тр. V Международного биохимического конгресса, Симпозиум I, 1961, № 3, 20.
 7. G. R. Hess, E. Wainfan, J. Amer. Chem. Soc. 80, 501, 1958.
 8. В. В. Мосолов, Н. Д. Логинова, Докл. АН СССР, 146, 1209, 1962.
 9. M. Funatsu, K. Tokuyasu, J. Biochem., 49, 297, 1961.
 10. В. А. Карагин, Н. В. Козлов, С. Я. Мирлина, З. А. Капралова, Высокомолек. соед., 4, 167, 1962.
 11. В. М. Потапов, А. П. Терентьев, Ж. общ. химии, 31, 1003, 1961.
 12. К. Джерасси, Дисперсия оптического вращения, Изд. ин. лит., 1962, 15.
 13. Г. Нортроп, Кристаллические ферменты, Изд. ин. лит., 1950, 297.
 14. H. Tappu, Hooper-Jeyber's J. Physiol., 329, 278, 1962.
 15. С. Е. Бреслер, М. Шампуй, С. Я. Френкель, Биохимия, 26, 909, 1961.
 16. F. Kichards, J. Biol. Chem. 235, 2343, 1960.
 17. Ф. Во, Сб. Современные проблемы биофизики, Изд. ин. лит., 1, 115, 1961.
-

STRUCTURATION AND ENZYMATIC ACTIVITY OF PEPSIN AND TRYPSIN FRAGMENTS IN THE COURSE OF AUTOLYSIS AND ELECTRODIALYSIS

*Z. A. Kapralova, S. Ya. Mirlina, P. V. Kozlov, V. A. Kargin,
R. I. Kaluzhnaya*

Summary

A study of autolytic — electrodialytic processes of pepsin and trypsin have shown that they give rise to low molecular products devoid of enzymatic activity and incapable of subsequent structuration. In contrast the initial enzymes are characterized by a highly ordered supermolecular structure.