

УДК 541(64+49):547.96

**КОМПЛЕКСООБРАЗОВАНИЕ ТРИПСИНА С РАСТВОРИМЫМИ
СОПОЛИМЕРАМИ НА ОСНОВЕ ВИНИЛПИРРОЛИДОНА
И КАРБОКСИЛСОДЕРЖАЩИХ КИСЛОТ**

***Кольцова С. В., Илларионова Н. Г., Кривобоков В. В.,
Трухманова Л. Б., Самсонов Г. В.***

Исследовано взаимодействие трипсина с растворимыми сополимерами винилпирролидона с кротоновой или метакриловой кислотой, содержащими от 4 до 30 мол.% карбоксилсодержащей кислоты. Показано, что в нейтральной области pH трипсин образует с этими сополимерами растворимые комплексы различного типа в зависимости от способа распределения карбоксильных групп в полимерной цепи, функционального состава сополимеров и мольного соотношения сополимер: трипсин в исходной комплексной системе. Определены оптимальные условия получения комплексов трипсина с сополимерами винилпирролидона с кротоновой кислотой, в которых трипсин полностью сохраняет ферментативную активность по белковым субстратам. Методами дисперсии оптического вращения и кругового диахроизма проведено детальное исследование конформационного состояния макромолекул трипсина в комплексах. Сделан вывод о наличии некоторых структурных изменений в трипсине, приводящих к частичному ингибированию фермента, в комплексах, полученных при мольном соотношении сополимер: трипсин <1 в исходной комплексной системе.

В работах [1, 2] мы показали, что комплексообразование трипсина с гомополикислотами, в частности полиметакриловой кислотой (ПМАК), в нейтральных буферных растворах сопровождается ингибированием фермента, вызванным нарушением нативной конформации трипсина при связывании с ПМАК в необратимый комплекс. Однако, принимая во внимание имеющиеся данные о «полюсном» распределении зарядов на поверхности макромолекулы трипсина [3], можно ожидать, что взаимодействие трипсина с полианионами, полимерная цепь которых не содержит блоков кислотных звеньев, а также локальных участков с высокой концентрацией отрицательно заряженных групп, не будет сопровождаться необратимыми структурными изменениями трипсина из-за ограниченных возможностей полифункционального взаимодействия макромолекул белка и полимера.

В данной работе в качестве полианионных комплексантов трипсина мы использовали серию сополимеров винилпирролидона с кротоновой кислотой, для которых установлено [4], что звенья кротоновой кислоты распределены по цепи в виде изолированных единичных фрагментов, а также для сравнения, серию сополимеров винилпирролидона с метакриловой кислотой (МАК), содержащих блоки звеньев МАК [5]. Следует отметить, что в литературе имеются некоторые сведения относительно кинетики автолиза трипсина в присутствии сополимеров винилпирролидона с кротоновой кислотой [6]. Однако этих данных недостаточно для суждения о механизме инактивации трипсина в комплексах с данными сополимерами. Задача нашего исследования состояла в анализе равновесных условий и кинетики комплексообразования, изучении стабильности комплексов, а также конформационного состояния связанного трипсина.

В данной статье рассмотрены результаты гель-хроматографического и кинетического исследований взаимодействия трипсина с сополимерами винилпирролидона с кротоновой кислотой или МАК в водных буферных растворах в зависимости от pH, ионной силы μ , мольного соотношения полимера и белка в исходной смеси, а также от функционального состава сополимера. Приведены результаты детального конформационного анализа исследуемых комплексных систем.

Кристаллический трипсин фирмы «Spofa» очищали дополнительно гель-хроматографией на колонке с сефадексом G-50 в 0,001 M HCl по методике [1]. Сополимеры винилпирролидона с кротоновой кислотой и винилпирролидона с МАК синтезировали по методам [4, 5] соответственно. Исследуемые образцы фракционировали на колонке с сефадексом G-200 в 0,5 M растворе NaCl. Состав фракционированных сополимеров определяли методом ПМР. Спектры ПМР сняты в водных (D_2O) растворах при 20° на частоте 60 МГц (спектрометр C-60HL). ММ фракционированных сополимеров определяли по коэффициентам седиментации и диффузии, используя формулу Сведенберга [7]. В работе использовали фракционированные образцы с соотношением винилпирролидон : кротоновая кислота = 96 : 4 (I), 84 : 16 (II), 76 : 24 (III), 69 : 31 (IV) и винилпирролидон : МАК = 93 : 7 (V), 86 : 14 (VI) и 60 : 40 (VII); ММ образцов I–VII составляла 120 000–130 000. Сополимеры и трипсин растворяли в 0,002 M фосфатном буферном растворе исследуемого значения pH, и варьировали от 0,01 до 0,1 добавлением NaCl к указанному буферному раствору. Концентрацию трипсина в исходном растворе определяли спектрофотометрически, а также методом Лоури. Комплексные системы готовили смешанием исходных растворов трипсина ($8 \cdot 10^{-6}$ моль/л) и сополимеров ($1,6 \cdot 10^{-6}$ – $3,2 \cdot 10^{-5}$ моль/л) в отношении 1 : 1 по объему при 20°.

Гель-хроматографию смесей трипсина с сополимерами винилпирролидона с кротоновой кислотой проводили на колонке (2×70 см) с сефадексом G-150 при pH 6,0, μ 0,01, 5–7° и скорости элюции 10 мл/ч. В колонку вводили 5 мл смеси, содержащей $4 \cdot 10^{-5}$ моль/л трипсина и $8 \cdot 10^{-6}$ – $8 \cdot 10^{-5}$ моль/л сополимеров. Время инкубации смесей до введения в колонку 10 мин и 4 ч при 20°.

Дисперсию оптического вращения трипсина свободного и в комплексе с сополимером (III) измеряли на спектрополяризиметре «Pepol-60» с качающимся анализатором. Измерения дисперсии оптического вращения проводили в интервале длин волн λ 350–600 нм; концентрацию растворов по трипсину $2 \cdot 10^{-5}$ моль/л, длины кювет 0,05 и 0,2 м. Спектры кругового диахроизма измеряли на спектрополяризиметре UV-5 фирмы «Jasco»; концентрация растворов по трипсину $1,6 \cdot 10^{-5}$ моль/л, длина кюветы 0,002 м.

Изучение влияния сополимеров на активность трипсина проводили при pH 6,0–7,5, ионной силе 0,01–0,1 и 20°. Концентрация трипсина в контролльном эксперименте и в смесях с сополимером $4 \cdot 10^{-6}$ моль/л, концентрация сополимера $8 \cdot 10^{-7}$ – $1,6 \cdot 10^{-5}$ моль/л. Время инкубации исследуемых растворов при 20° перед измерением их ферментативной активности 10 мин и 3 ч.

Стабильность трипсина и комплексов трипсина с сополимером III исследовали в условиях автокатализа (pH 7,5; 37°). Для получения кинетических кривых инактивации из термостатируемых растворов периодически отбирали пробы и определяли их остаточную казеинолитическую активность по методу [2]. Активность трипсина (A) определяли в условных единицах, выраженных в единицах оптической плотности трехлоруксусных фильтратов казеина на единицу поглощения трипсина при 280 нм.

При изучении влияния сополимеров винилпирролидона с кротоновой кислотой (I–IV) на протеолитическую активность трипсина показано (рис. 1), что кривые зависимости активности трипсина от концентрации сополимера в смеси имеют минимум, соответствующий максимальной инактивации трипсина при мольном отношении сополимер : трипсин < 1. При этом с увеличением содержания кротоновой кислоты в сополимере наблюдается углубление минимума кривой, которое связано, как показано методом гель-хроматографии, с относительным увеличением количества включенного в комплекс трипсина при одном и том же значении сополимер : трипсин < 1 и, кроме того, может быть обусловлено более жесткой фиксацией фермента вследствие увеличения числа связей между трипсином и сополимером при возрастании плотности отрицательного заряда на полимерной матрице в ряду сополимеров I–IV. При отношении сополимер : трипсин > 2 наблюдается восстановление исходной активности трипсина (кривые 1–4). Из сопоставления кривых 2 и 2' (рис. 1) следует, что при мольном соотношении сополимер : трипсин < 1 степень инактивации трипсина в комплексной системе является функцией времени. Например, при увеличении времени инкубации смеси трипсина с сополимером II с 10 мин до 3 ч при 20° степень инактивации трипсина возрастает с 15 до 40%. Напротив, как следует из тех же кривых 2 и 2', ферментативная активность комплексных систем, полученных при отношении сополимер : трипсин ≥ 2 , не зависит от времени инкубации в исследуемом временном интервале (0,2–3 ч). На основании этих данных можно сделать предположение о различии механизмов взаимодействия трипсина с сополимерами I–IV при отношениях сополимер : трипсин < 1 и сополимер : трипсин ≥ 2 .

С целью выяснения природы взаимодействия трипсина с сополимерами винилпирролидона с кротоновой кислотой было изучено влияние pH и μ

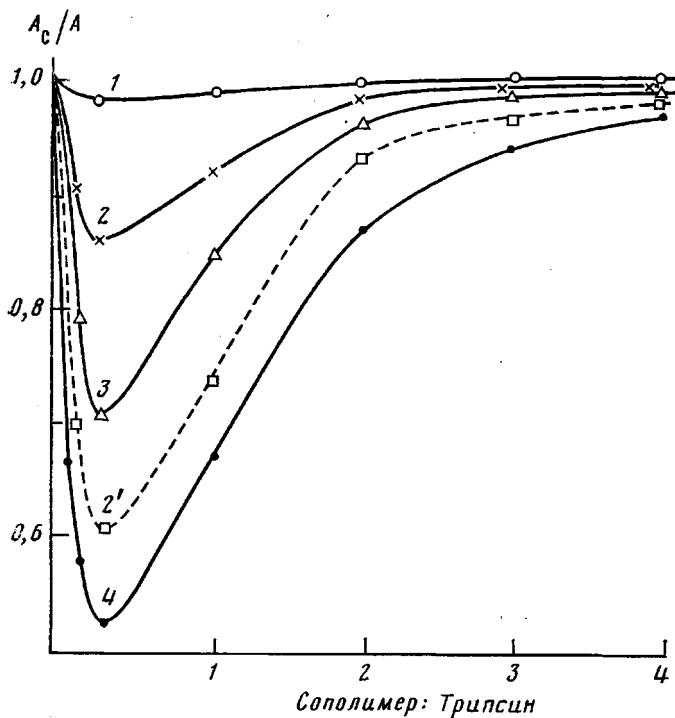


Рис. 1. Зависимость активности трипсина в смесях с сополимерами I (1), II (2'), III (3) и IV (4) от мольного соотношения сополимер: трипсин при 20°, pH 6,0, μ 0,01 и времени инкубации смеси 10 мин (1–4) и 3 ч (2'). Концентрация трипсина в смеси $4 \cdot 10^{-6}$, концентрация сополимеров I–IV – $8 \cdot 10^{-7}$ – $1,6 \cdot 10^{-5}$ моль/л. A_c – активность трипсина в смеси с сополимерами при данном времени инкубации, A – исходная активность трипсина

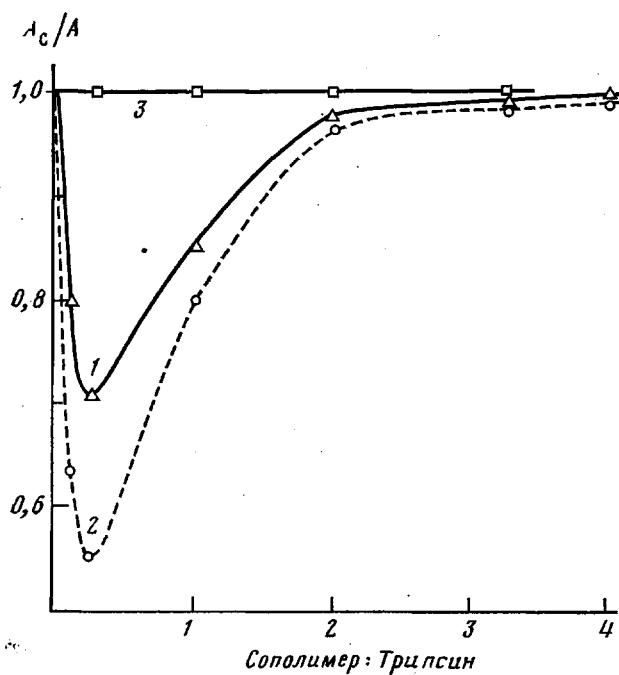


Рис. 2. Влияние pH и ионной силы на инактивацию трипсина в смеси с сополимером III при 20° и времени инкубации 10 мин. Концентрация трипсина в смеси $4 \cdot 10^{-6}$, концентрация сополимера III – $8 \cdot 10^{-7}$ – $1,6 \cdot 10^{-5}$ моль/л. 1 – pH 6,0; μ 0,01; 2 – pH 7,4; μ 0,01; 3 – pH 7,4; μ 0,1

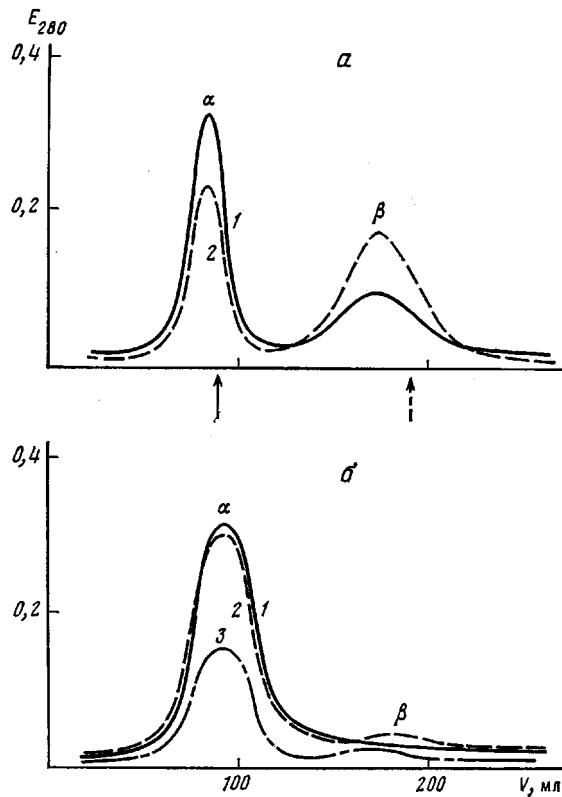


Рис. 3. Гель-хроматограммы смесей трипсина с сополимером III при pH 6,0, μ 0,01 и 5°. Мольное соотношение сополимер : трипсин = 0,2 (а) и 2 (б). Время инкубации смеси 10 мин (1) и 3 ч (2). β – рехроматография комплекса α после инкубации при 5° в течение 15 ч. Стрелками отмечены значения V_0 для свободных сополимера (сплошная линия) и трипсина (штриховая)

на инактивацию фермента. На рисунке 2 на примере сополимера III показана сильная зависимость степени инактивации трипсина от этих параметров, что свидетельствует о доминирующей роли ион-ионного взаимодействия в системах трипсин — исследуемый полианион в условиях, где макромолекула трипсина имеет суммарный положительный заряд. Этот вывод согласуется с данными работ [2, 6].

Для проверки предположений, сделанных на основании данных рис. 1, об образовании различного типа комплексов трипсина с сополимерами I—IV в зависимости от отношений сополимер : трипсин в исходной смеси мы использовали метод гель-хроматографии для анализа исследуемых систем. На рис. 3 приведены хроматограммы смесей трипсина с сополимером III, полученные при pH 6,0 и μ 0,01. Видно, что при отношении сополимер : трипсин = 0,2 и времени инкубации смеси 10 мин до введения в колонку хроматограмма состоит из двух пиков, соответствующих фракциям α и β . Фракция α выходит с объемом элюции, равным V_0 сополимера III, содержит трипсин и представляет собой комплекс. Удельная активность трипсина в этом комплексе составляет 60% от активности исходного трипсина. Фракция β содержит трипсин, неактивна и имеет V_0 на 30 мл меньше, чем V_0 трипсина в контрольном эксперименте. При увеличении времени инкубации смеси трипсина с сополимером III до введения в колонку с 10 мин до 3 ч наблюдается уменьшение количества фракции α и увеличение фракции β . Аналогичный переход мы наблюдали при исследовании системы трипсин — ПМАК [2], где было показано образование активного и неактивного комплексов и медленный переход активного комплекса в неактивную форму; количество связанного с трипсином полимера в неактивном комплексе рассчитывали по разности общей массы вы-

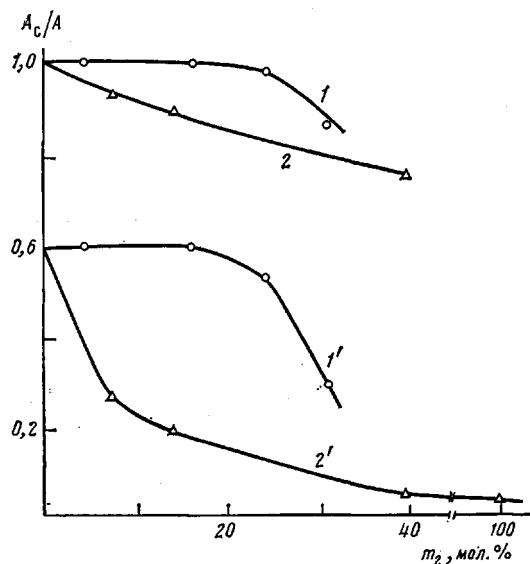


Рис. 4. Влияние состава сополимеров на активность трипсина в комплексах с сополимерами винилпирролидона с кротоновой кислотой (1, 1') и винилпирролидона с МАК (2, 2') при pH 7,4, μ 0,01, 20° и времени инкубации 10 мин (1, 2) и 3 ч (1', 2'). Мольное соотношение сополимер : трипсин ≥ 2 . Концентрация звеньев кротоновой кислоты или МАК для всех сополимеров одинакова и равна $4 \cdot 10^{-3}$ моль/л. Концентрация трипсина $6 \cdot 10^{-6}$ моль/л, что соответствует концентрации $\epsilon\text{-NH}_2$ -групп лизина $6 \cdot 10^{-5}$ моль/л; m_2 — содержание звеньев кротоновой кислоты или МАК в сополимере

деленной и обессоленной фракции и массы белка, определенной по общему азоту методом Кельдаля. При отношении сополимер : трипсин = 2 (рис. 3, б) весь введенный в колонку трипсин в исследуемой смеси с сополимером III элюируется во фракции α независимо от времени инкубации смеси до введения в колонку. При этом удельная активность трипсина в комплексе составляет не менее 95% от активности исходного трипсина. При рехроматографии фракции α в условиях первичной хроматографии (рис. 3, б) V_0 этой фракции не меняется. Полученные результаты хорошо согласуются с данными рис. 1. При хроматографии смеси трипсина с сополимером III (отношение сополимер : трипсин = 2, pH 6,0 и μ 0,1) хроматограмма состоит из двух пиков, соответствующих свободному сополимеру и свободному трипсину, что свидетельствует об обратимости взаимодействия в изучаемой системе и подтверждает сделанный ранее вывод об определяющей роли ион-ионного взаимодействия трипсина с полианионами в исследуемом интервале pH (6–7,5). Сопоставительный хроматографический анализ смесей трипсина с сополимерами I–III при отношении сополимер : трипсин = 0,2 и времени инкубации смеси 10 мин показал, что общий вид хроматограмм аналогичен тому, что представлено на рис. 3, а, а общее количество связанного в комплексы трипсина возрастает с 30 до 100% при увеличении содержания звеньев кротоновой кислоты в сополимере от 4 до 24 мол. %. При отношении сополимер : трипсин = 2 для сополимеров I и II на хроматограмме наблюдается только один пик, соответствующий высокоактивному комплексу α , как и в случае сополимера III (рис. 3, б).

Из данных, приведенных на рис. 1–3, следует, что для изучения влияния типа распределения функциональных групп в исследуемых карбоксил-содержащих сополимерах на каталитические свойства трипсина при взаимодействии с ними наиболее интересна область отношений сополимер : трипсин ≥ 2 , где комплексообразование трипсина с сополимерами I–III не сопровождается ингибированием фермента в широком диапазоне экспериментальных условий. На рис. 4 представлены зависимости активности комплексов трипсина от содержания звеньев кротоновой кислоты или МАК

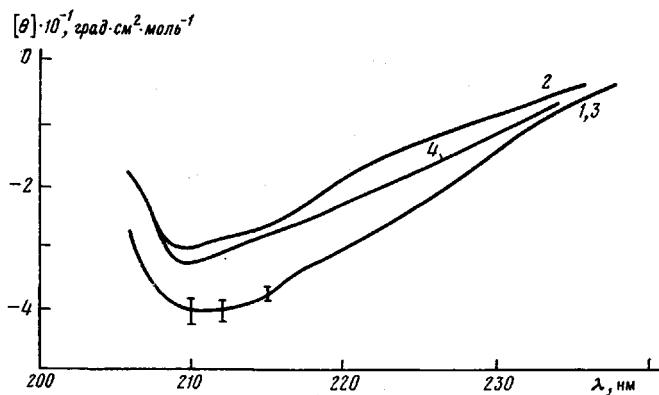


Рис. 5. Спектры кругового дихроизма трипсина и комплексов его с сополимером III и ПМАК при рН 6,0, μ 0,01 и 20°; время инкубации 3 ч, концентрация трипсина $1,6 \cdot 10^{-5}$ моль/л. 1 — трипсин; 3 — трипсин+сополимер III при мольном соотношении сополимер : трипсин = 2; 2 и 4 — трипсин+сополимер III и трипсин+ПМАК соответственно при мольном соотношении сополимер : трипсин = 0,2

в исследуемых сополимерах. Видно, что в случае сополимеров винилпирролидона с кротоновой кислотой, содержащих до 25 мол.-% кротоновой кислоты, трипсин в комплексе обладает активностью, равной активности свободного трипсина, в то время как при взаимодействии с сополимером винилпирролидона с МАК наблюдается инактивация фермента во всем исследуемом интервале составов сополимеров, причем при содержании звеньев МАК около 40 мол.-% степень ингибирования трипсина практически равна таковой в системе трипсин — ПМАК. Таким образом, при наличии блоков мономерных звеньев карбоксильных кислот в полимерной цепи, например, в случае сополимеров винилпирролидона с МАК, независимо от состава сополимера механизм инактивации трипсина в комплексах с этими сополимерами во всем исследуемом интервале составов аналогичен тому, что был показан для комплексов трипсина с ПМАК [2], а именно, происходит нарушение нативной конформации трипсина при полифункциональном взаимодействии с полианионами, что подтверждается приведенными ниже данными дисперсии оптического вращения и кругового дихроизма. Следует отметить, что результатом полифункционального взаимодействия, т. е. полимерного эффекта [8] при комплексообразовании ферментов, в частности трипсина, с полиэлектролитами, является воздействие полимера-носителя на структуру макромолекулы в целом, а не на активный центр, так как низкомолекулярные аналоги полиэлектролитов не оказывают ни ингибирующего, ни стабилизирующего действия на фермент [9].

Методами дисперсии оптического вращения и кругового дихроизма проведено сравнительное исследование конформационного состояния трипсина свободного и в комплексах с сополимером III, полученных при отношении Константы дисперсии оптического вращения для трипсина и комплексов трипсина с сополимером III

Образец	Растворитель	Время инкубации при 20°, ч	λ_c , нм	$K_C \cdot 10^{-6}$
Трипсин	0,001 M фосфатный буфер + 0,01 M NaCl, pH 6,1	0,2 24	223±5 224±5	-147±6 -137±6
Трипсин + III сополимер : трипсин = 0,2	То же	3	225±5	-169±6
Трипсин + III сополимер : трипсин = 2	То же	3	225±5	-148±6

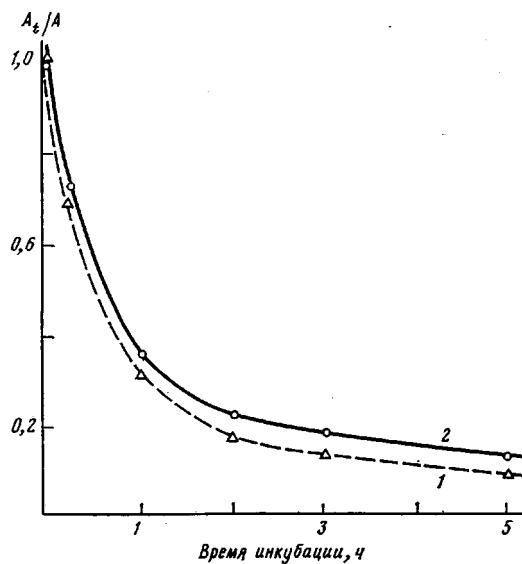


Рис. 6. Термостабильность трипсина и комплекса его с сополимером III при pH 6,5, μ 0,01, 37° и мольном соотношении сополимер : трипсин = 2.
1 — трипсин, 2 — комплекс

сополимер : трипсин = 0,2 и 2. Данные дисперсии оптического вращения обрабатывали по одночленному уравнению Друде, полученные константы λ_c и K_c , связанные со вторичной и третичной структурами фермента, приведены в таблице.

В исследуемой области pH, где трипсин имеет наиболее компактную структуру [10], полученные константы дисперсии оптического вращения для нативного трипсина находятся в согласии с данными работы [11].

Из таблицы видно, что в случае комплекса, полученного при отношении сополимер : трипсин = 0,2, наблюдается изменение K_c подобно тому, как было получено для комплекса трипсина с ПМАК [2]. Обработка данных по уравнению Шехтера — Блаута приводит к тому же заключению: макромолекула трипсина в этом комплексе несколько разворачивается. В комплексе с сополимером III, полученном при соотношении сополимер : трипсин = 2, трипсин не испытывает никаких конформационных изменений. Полученные данные по дисперсии оптического вращения подтверждаются спектрами кругового диахроизма (рис. 5). Спектры кругового диахроизма нативного трипсина и комплекса трипсина с сополимером III, полученного при соотношении сополимер : трипсин = 2, совпадают, в то время как спектр комплекса трипсина с этим сополимером при отношении сополимер : трипсин = 0,2 аналогичен спектру для комплекса трипсин — ПМАК.

На основании полученных экспериментальных данных можно сделать вывод, что в исследуемых комплексных системах, включающих трипсин и сополимеры винилпирролидона с кротоновой кислотой различного состава, реализуются по меньшей мере два типа комплексов в области низкого (<25 мол. %) содержания кротоновой кислоты. Во-первых, при мольном соотношении сополимер : трипсин < 1 образуются комплексы типа трипсин — ПМАК, когда в системе происходит медленный переход активного комплекса в неактивную форму, сопровождающийся необратимыми конформационными изменениями макромолекулы трипсина. Во-вторых, при соотношении сополимер : трипсин ≥ 2 в исследуемых системах образуются, по-видимому, комплексы типа трипсин — низкомолекулярный аналог сополимера, когда обратимое связывание трипсина с сополимером винилпирролидона с кротоновой кислотой не сопровождается ни ингибированием фермента, ни его стабилизацией (рис. 6) вследствие образования ограниченного числа связей между белком и полимером и низкой устойчивости таких комплексов [8, 12, 13].

ЛИТЕРАТУРА

1. Кольцова С. В., Гликина М. В., Самсонов Г. В. Изв. АН СССР. Сер. хим., 1970, № 8, с. 1895.
2. Кольцова С. В., Гликина М. В., Илларионова Н. Г., Самсонов Г. В. Мол. биол., 1971, т. 5, вып. 2, с. 225.
3. Keil B., Dlouhá V., Holeýšovský V., Šorm F. Coll. Czechoslov. Chem. Commun., 1968, v. 33, № 7, p. 2307.
4. Ушаков С. Н., Кропачев В. А., Трухманова Л. Б., Груз Р. И., Маркелова Т. М. Высокомолек. соед. А, 1967, т. 9, № 8, с. 1807.
5. Наджимутдинов Ш., Тураев А. С., Усманов А. Х., Усманов Х. У., Чулпанов К. Докл. АН СССР, 1976, т. 226, № 5, с. 1113.
6. Миргородская О. А., Иванова Т. П., Панарин Е. Ф., Москвичев Б. В. Биоорганская химия, 1976, т. 2, № 12, с. 1695.
7. Цветков В. Н., Эскин В. Е., Френкель С. Я. Структура макромолекул в растворах. М.: Наука, 1964, с. 424.
8. Самсонов Г. В. Высокомолек. соед. А, 1979, т. 21, № 4, с. 723.
9. Кольцова С. В., Илларионова Н. Г., Панарин Е. Ф., Рудковская Г. Д., Самсонов Г. В. Изв. АН СССР. Сер. хим., 1975, № 3, с. 643.
10. Lazzdunski M., Delage M. Biochim. Biophys. Acta, 1967, v. 140, № 3, p. 417.
11. Smille L. B., Kay C. M. J. Biol. Chem., 1961, v. 236, p. 112.
12. Кольцова С. В., Самсонов Г. В. Изв. АН СССР. Сер. хим., 1976, № 1, с. 168.
13. Зезин А. Б., Рогачева В. Б. В кн.: Успехи химии и физики полимеров. М.: Химия, 1973, с. 3.

Институт высокомолекулярных
соединений АН СССР

Поступила в редакцию
27.IX.1981

FORMATION OF TRYPSIN COMPLEXES WITH SOLUBLE COPOLYMERS OF VINYL PYRROLIDONE AND CARBOXYL-CONTAINING ACIDS

*Kol'tsova S. V., Illarionova N. G., Krivobokov V. V.,
Trukhmanova L. B., Samsonov G. V.*

Summary

The interaction of trypsin with soluble copolymers of vinyl pyrrolidone with crotonic and methacrylic acids containing 4-30 mol.% of carboxyl-containing acid has been studied. In the neutral range of pH values trypsin was shown to form the soluble complexes of various type depending on the character of distribution of carboxyl groups in the polymer chain, functional composition of copolymers and copolymer/trypsin molar ratio in the initial complex system. The optimal conditions of formation of complexes of trypsin with copolymers of vinyl pyrrolidone with crotonic acid were found permitting to preserve entirely the enzyme activity of trypsin towards protein substrates. The conformational state of trypsin macromolecule in complexes was studied in details by dispersion of optical rotation and circle dichroism methods. The existence of some structural changes in trypsin was concluded resulting in partial inhibition of enzyme in complexes obtained for copolymer/trypsin molar ratio being <<1.