

УДК 541.1

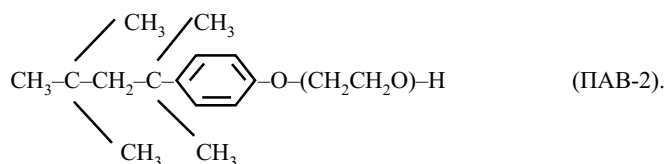
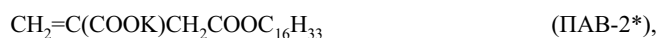
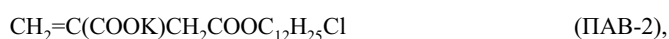
Влияние ПАВ различной природы на активность пероксидазы и трипсина

А.И. Давлетшин*, И.Г. Сильвестрова*, В.П. Зубов**, В.В. Егоров

(кафедра высокомолекулярных соединений)

Исследовано влияние природы гидрофильной группы в молекуле поверхностно-активного вещества на скорости ферментативных реакций водорастворимого белка трипсина и мембранотропного белка пероксидазы хрена в водном растворе. Найдено, что в обоих случаях катионноактивный ПАВ вызывает снижение, анионноактивный ПАВ – возрастание скорости процесса, а в случае неионного ПАВ влияние не обнаружено. Эти эффекты связаны с процессами структурообразования в системе белок–ПАВ, изученными методом Ленгмюра–Блоджетт. Обнаружено, что ПАВ в ряде случаев являются субстратами соответствующих ферментов.

Проблема взаимовлияния белков и липидов является ключом к пониманию механизма многих процессов, протекающих в биологических мембранах (рецепция, трансмембранный транспорт и др.). Однако исследования такого рода *in vivo* сопряжены с известными трудностями. Наиболее реальным путем изучения указанных объектов является их моделирование, например, с помощью систем белок–липид или одноцепной аналог последнего – ПАВ. Исследования последних лет в этой области [1–3] обнаружили ряд эффектов, связанных с влиянием природы синтетических ПАВ на поведение (в первую очередь на ферментативную активность) мембранных белков. В одних случаях показана активация ферментов под влиянием ПАВ [4], в других – ингибирование ферментативной активности [5]. Однако работы подобного рода не позволяют установить общие закономерности поведения таких систем. В настоящей работе исследовано влияние природы гидрофильной головной группы в молекуле ПАВ на ферментативную активность интегрального белка пероксидазы и водорастворимого периферического белка трипсина. Объектом изучения являлись катионные, анионные и неионные ПАВ следующего состава:



Исходные вещества и методы исследования

В работе использовали пероксидазу хрена фирмы «REANAL» (Венгрия), трипсин фирмы «СHEMАPOL» (Чехословакия), органические ПАВ, синтезированные на химическом факультете МГУ (примесей менее 0.1%) и бидистиллированную воду. Ферментативную активность пероксидазы исследовали в фосфатном буфере (рН 7.2) спектрофотометрическим методом ($\lambda = 440\text{нм}$). В качестве субстрата использовали 5-аминосалициловую кислоту (S-1). Измерения проводили на спектрофотометре «СФ-16» при 293 К (точность измерения составила 5%). Ферментативную активность трипсина исследовали в ТРИС-буфере в присутствии CaCl_2 методами рН-метрии [6] и спектрофотометрии при начальном значении рН 7.7. В качестве субстрата использовали этиловый эфир N-бензоил-L-аргинин гидрохлорид

*Ветеринарно-биологический факультет Московской государственной академии ветеринарной медицины и биотехнологии им.К.И.Скрябина.

**МИТХТ им.М.В.Ломоносова.

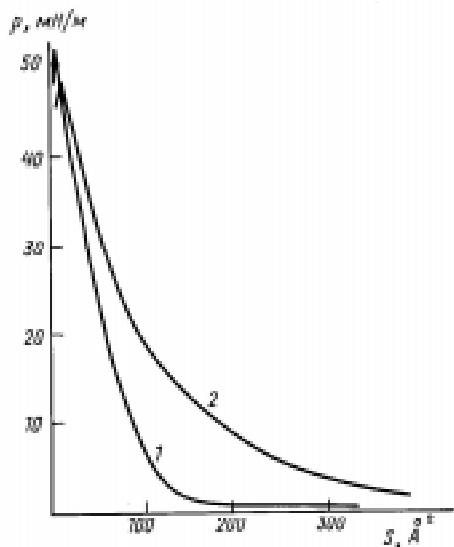


Рис.1. Изотермы «давление – площадь» на границе вода – воздух для монослоев: 1 – трипсина, 2 – пероксидазы (рН 6.8, Т = 293 К)

(S-2). Кислотность среды измеряли на рН-метре «ЭВ-74» при 293 К (точность измерения составила 7%).

Окислительную активность пероксидазы по отношению к ПАВ в воде исследовали путем измерения хемилюминесценции системы в процессе реакции на хемилюминометре (кафедра биофизики МГАВМБ) при 293 К. Строение монослоев на границе вода – воздух изучали с помощью изотерм «поверхностное давление – площадь» (293 К). В работе использовали весы Ленгмюра фирмы «Lauda» (Германия). Смеси ПАВ с белком имели молярные соотношения 100:1, 50:1 и 25:1.

Результаты и обсуждение

В предварительных экспериментах было обнаружено, что исследуемые органические ПАВ в ряде случаев могут являться субстратами указанных ферментов. В табл.1 показано, что под влиянием трипсина катионный ПАВ-1 и анионный ПАВ-2 подвергаются заметному гидролизу, причем скорость

Таблица 1

Скорость гидролиза ПАВ в присутствии трипсина
[Eps] = 4.2·10 моль/л, [ПАВ] = 2.5·10 моль/л, 293 К

ПАВ	ПАВ-1	ПАВ-2	ПАВ-3
V, моль/л·с	30.6	7.9	0

Таблица 2

Скорость перекисного окисления ПАВ в присутствии пероксидазы
[Eps] = 10 моль/л, [ПАВ] = 10 моль/л,
V = 2·10 моль/л·с, 293 К

ПАВ	ПАВ-1	ПАВ-2	ПАВ-3
V·10 моль/л·с	16	5	28*

*Скорость перекисного окисления ПАВ-3 в отсутствие трипсина .

процесса в первом случае заметно выше. В случае неионного ПАВ-3 процесс гидролиза не обнаружен.

Полученные результаты можно объяснить наличием в молекуле белка «гидрофобного кармана», способного связывать ПАВ, а также присутствием в молекулах анионных и катионных ПАВ сложноэфирных связей, являющихся потенциальными субстратами для протеолитических ферментов [7, 8]. В молекуле неионного ПАВ такие связи отсутствуют.

Как следует из табл. 2, в присутствии пероксидазы все исследуемые вещества подвергаются окислению перекисью водорода, скорость которого возрастает в ряду: ПАВ-2, ПАВ-1, ПАВ-3. Этот результат свидетельствует о том, что поверхностно-активные соединения, содержащие непредельные связи (ПАВ-1 и ПАВ-2) или другие активные группы (ПАВ-3) в гидрофильной части молекулы, способны связываться и окисляться в активном центре пероксидазы. При этом

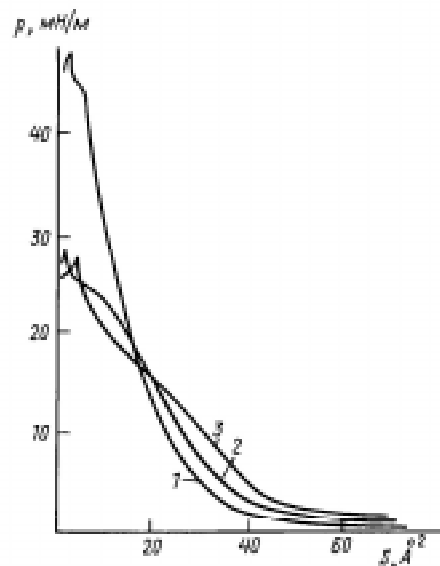


Рис.2. Изотермы «давление – площадь» на границе вода – воздух для монослоев: 1 – ПАВ-1, 2 – смесь ПАВ-1 с трипсином (100:1), 3 – смесь ПАВ-1 с пероксидазой (100:1) (рН 6.8, Т = 293 К)

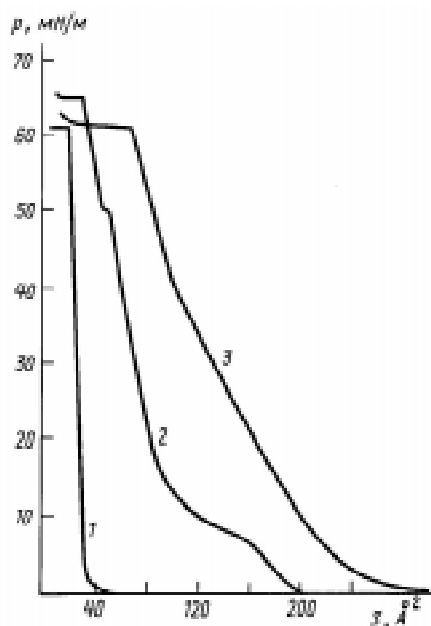


Рис.3. Изотермы «давление – площадь» на границе вода – воздух для монослоев: 1 – стеариновая кислота (аналог ПАВ-2), 2 – смесь стеариновой кислоты с трипсином (50:1), 3 – смесь стеариновой кислоты с пероксидазой (50:1) (рН 6,8, Т = 293 К)

скорость окисления существенно зависит от строения молекулы ПАВ.

В табл. 3 представлены данные по ферментативной активности мембранотропного белка пероксидазы по отношению к его специфическому субстрату S-1, полученные в отсутствие и в присутствии ПАВ. Как показано в табл. 3, активность пероксидазы не меняется при добавлении неионного ПАВ-3, увеличивается в присутствии анионного ПАВ-2 и уменьшается под влиянием катионного ПАВ-1. Последний эффект может быть результатом ингибирования ферментативной активности пероксидазы, имеющей суммарный отрицательный заряд в растворе, противоположно заряженным поверхностно-активным веществом [5] или ее де-

Таблица 3

Скорость перекисного окисления субстрата S-1, активированного пероксидазой, в отсутствие и в присутствии ПАВ ([Eps] = 10 моль/л, [S-1] = 3,3·10 моль/л, рН 7,2, 293 К)

ПАВ	Отсут-ствие ПАВ	ПАВ-1	ПАВ-2	ПАВ-3		
ПАВ-10, моль/л	0	15	66	2,5	20	130
V 10, моль/л·с	200	65	40	280	220	220

Таблица 4

Скорость гидролиза субстрата S-2, активированного трипсином, в отсутствие и в присутствии ПАВ ([Eps] = 2,6·10 моль/л, [S-2] = 5,0·10 моль/л, 293 К)

ПАВ	Отсут-ствие ПАВ	ПАВ-1		ПАВ-2*		ПАВ-3	
ПАВ-10, моль/л	0	1,25	3,8	1,7	3,3	6,78	
V 10, моль/л·с	12	9,4	1,4	89	220	12	

* В качестве аналога ПАВ-2 использован анионный ПАВ SDS.

натурации [9]. Заметная скорость окисления ПАВ-1 в присутствии пероксидазы, отмеченная выше, может быть косвенным свидетельством в пользу первого предположения.

Активацию фермента в присутствии анионного ПАВ-2 и отсутствие влияния на него неионного ПАВ-3 можно связать с образованием ассоциатов белок – ПАВ, способных либо концентрировать субстрат [10], либо индуцировать конформационную перестройку фермента.

Для проверки выдвинутого предположения структурообразование в системе белок – ПАВ было исследовано методом Ленгмюра – Блоджетт. На рис.1 представлены изотермы «давление–площадь» для монослоя пероксидазы, а на рис.2, 3 – для монослоев ПАВ, полученных в отсутствие и в присутствии фермента. Видно, что в случае ПАВ-3 добавление пе-

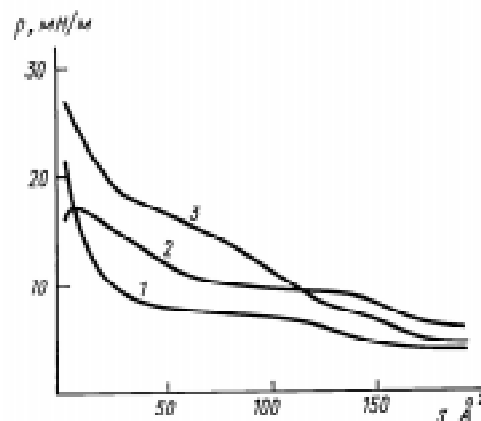


Рис.4. Изотермы «давление – площадь» на границе вода – воздух для монослоев: 1 – ПАВ-3, 2 – смесь ПАВ-3 с трипсином (50:1), 3 – смесь ПАВ-3 с пероксидазой (50:1) (рН 6,8, Т = 293 К)

роксидазы вызывает простое расширение монослоя, связанное, очевидно, с встраиванием белка. В случае анионного ПАВ (в качестве структурного аналога ПАВ-2 использован ПАВ-2*) структура монослоя под влиянием белка несколько изменяется. В нем появляется новое состояние, характеризующееся низким давлением коллапса и меньшей площадью, приходящейся на молекулу. Это состояние может быть связано с образованием ассоциатов белок – анионный ПАВ. В случае ПАВ-1 поведение всего монослоя при добавлении пероксидазы существенно изменяется: резко снижается давление коллапса и увеличивается площадь, приходящаяся на молекулу. Это может быть результатом изменения структуры слоя катионного ПАВ под влиянием отрицательно заряженных молекул белка.

Полученные результаты свидетельствуют в пользу выдвинутого предположения об образовании ассоциатов пероксидаза – ПАВ в случае анионного, а также, по-видимому, и катионного соединений, и их отсутствии в случае неионного ПАВ. Согласно известной точке зрения [3], ПАВ должны различным образом влиять на мембранные и периферические белки. В этой связи представляло интерес исследовать влияние тех же веществ на типичный периферический белок трипсин и сравнить с их влиянием на пероксидазу.

В табл. 4 приведены значения скорости триптической активации гидролиза субстрата S-2 в отсутствие и в присутствии исследуемых ПАВ. Видно, что неионное ПАВ не оказывает влияния на скорость реакции, катионное замедляет, а анионное ускоряет ферментативную реакцию, т.е. наблюдаются эффекты, аналогичные полученным в случае пероксидазы. Поскольку, как было показано выше, ПАВ-1 и ПАВ-2 подвергаются гидролизу в присутствии фермента, есть основания предположить, что существует связь обнаруженных эффектов с процессами структурообразования в системе белок – ПАВ. В целях проверки данного предположения соответствующие монослои были исследованы методом Лангмюра – Блоджетт. На рис. 1 – 3 приведены изотермы «давление – площадь» для монослоев трипсина, ПАВ и их смесей. Видно, что введение белка в монослой неионного ПАВ вызы-

вает простое расширение слоя, добавление трипсина к анионному ПАВ приводит к появлению новой фазы (ассоциаты белок – ПАВ) с большей плотностью и меньшим давлением коллапса, а в случае катионного ПАВ наблюдается изменение структуры и поведения всего монослоя, а именно, его расширение с одновременным резким снижением давления коллапса.

Полученные данные указывают на отсутствие структурообразования в системе белок – неионное ПАВ, что, по-видимому, и является причиной отсутствия влияния последнего на ферментативную реакцию. Образование структуры с белком в случае анионного ПАВ может быть причиной возрастания скорости ферментативной реакции, например, вследствие увеличения концентрации субстрата в области активного центра фермента путем солюбилизации S-2 в мицеллах ПАВ [10]. Снижение скорости реакции при добавлении катионного ПАВ можно объяснить обратимым связыванием молекул ПАВ в области активного центра фермента [5]. Таким образом, в работе показана связь кинетических явлений, наблюдающихся в процессе ферментативной реакции в присутствии синтетических органических ПАВ со структурообразованием в системе белок – ПАВ, зависящим от природы последнего. При этом наблюдаются структурно-кинетические аналогии в поведении интегрального и периферического белков в присутствии ПАВ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Наметкин С.П., Кабанов А.В., Клячко Н.Л., Левашов А.В.* // Биорган.химия. 1991. **17**. С. 606.
2. *Кабанов А.В., Клячко Н.Л. и др.* // Молекул.биология. 1987. **21**. С. 275.
3. *Левашов А.В.* // Итоги науки и техники. Биотехнология. 1987. **4**. С. 112.
4. *Клячко Н.Л., Левашов А.В., Мартинек К.* // Молек.биология. 1984. Вып. 4. **18**. С. 1019.
5. *Афиногенов Г.Е., Панарин Е.Ф.* /: Антимикробные полимеры. СПб., 1993.
6. *Фрайфельдер Д.* Физическая биохимия. М., 1980.
7. *Антонов В.К.* Химия протеолиза. М., 1991.
8. Биотехнология пероксидаз растений и грибов // Итоги науки и техники. М., 1992. С. 171.
9. *Жоли М.* Физическая денатурация белков. М., 1968. С. 41.
10. *Березин И.В.* Действие ферментов в обращенных мицеллах. М., 1985.