

ССА - 76

547.963.32:547.96:577.156

ВЛИЯНИЕ ДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕИНОВОЙ КИСЛОТЫ НА РАСЩЕПЛЕНИЕ БЕЛКОВ НЕКОТОРЫМИ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИМИ ФЕРМЕНТАМИ

А. И. Опарин, Г. А. Деборин и В. З. Баранова

Институт Биохимии им. А. Н. Баха, Академии Наук Союза ССР, Москва

Поступило 21. мая 1957. г.

Было исследовано влияние дезоксирибонуклеиновой кислоты на ход протеолиза яичного альбумина, сывороточного альбумина и казеина трипсином и химотрипсином. Установлено что ДНК тормозит протеолитический процесс при значениях рН лежащих выше изоэлектрической точки фермента и субстрата. При предварительной инкубации субстрата с ДНК наблюдалось также торможение протеолиза. Было исследовано и влияние величины соотношения ДНК/субстрат и полимерности ДНК на процесс протеолиза.

В связи с той важной ролью, которую играют в организме нуклеиновые кислоты в последние годы внимание ряда исследователей привлечено к изучению влияния этой группы веществ на активность различных ферментов в опытах *in vitro*. Славик и Сметана¹ установили, что дрожжевая рибонуклеиновая кислота и аденин тормозят действие протеиназ ниже их изоэлектрической точки в физиологических концентрациях. Шорм и Грубешова² также обнаружили подавление панкреатических протеиназ рибонуклеиновой кислотой поджелудочной железы. Смирнова³ нашла, что под влиянием дрожжевой РНК происходило усиление гидролитической функции протеаз *C. diphtheriae* в то время как при участии нуклеиновых соединений *C. diphtheriae* происходило повышение их синтетической функции. Чепинога и Павловский⁴ на белковых препаратах из мышц-альдолазе и энолазе показали обратимое торможение их ферментативной активности при взаимодействии с нуклеиновыми кислотами, особенно с высокополимерной ДНК. Мосс⁵ обнаружил торможение аргиназной активности в присутствии РНК. Батлер⁶ нашел, что дрожжевая нуклеиновая кислота является сильным адсорбентом амилаз солода, поэтому добавление сухого препарата нуклеиновой кислоты к солодовому экстракту удаляло большую часть ферментативной активности; десорбция фермента восстанавливала его активность. Имеется сообщение о торможении активности лизоцима в присутствии ДНК и РНК⁷.

Механизм взаимодействия нуклеиновых кислот с ферментными белками не является пока достаточно выясненным, однако имеются основания считать, что при этом образуются комплексы, компоненты которых могут быть связаны между собою как при помощи электростатического взаимодействия или водородной связи, так и при посредстве вандерваальсовых сил или ковалентной химической связи. Образование таких комплексов установлено Чепинога⁸; Ямане⁹ а также Гайдушеком и Доти¹⁰ при помощи исследования светорассеяния и Нетом с сотр.¹¹ при помощи микроэлектрофореза.

Как указывалось выше, исследования изменения протеолитической активности ферментов в присутствии нуклеиновых кислот касались, главным образом, роли РНК и проводились в основном при значениях pH лежащих ниже изоэлектрической точки фермента и субстрата. При этих условиях, как известно, происходит выпадение в осадок нерастворимых нуклеопротеидов, в результате образования солеобразных соединений между кислотными и основными группировками реагирующих веществ. Нам представлялось более интересным исследование влияния высокополимерной ДНК на протеолитический процесс в условиях, когда взаимодействие ДНК с ферментом не приводило к выпадению осадка, т. е. при значениях pH лежащих выше изоэлектрической точки фермента и субстрата.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Для опытов использовалась ДНК, выделенная из зобной железы теленка, молекулярный вес которой, определенный вискозиметрически¹², составлял $0,8-1 \times 10^6$. Трипсин выделялся из поджелудочной железы быка по Кунитцу и Нортропу¹³ и подвергался диализу против $0,05 M NaCl$ в течение нескольких суток. Субстратами служили кристаллические препараты белков, полученные по методу Барановского-яичный альбумин из куриных яиц, сывороточный альбумин из сыворотки крови лошади и казеин, выделенный из коровьего молока.

Определение кинетики протеолиза проводилось спектрофотометрически по модифицированному методу Кунитца. Из опытных смесей, содержащих фермент и субстрат, через определенные периоды инкубации (фосфатный буфер pH 8,0—8,4) брались пробы по $0,1$ мл, к которым одновременно добавляли по 4 мл. дистиллированной воды и $0,1$ мл. 90% трихлоруксусной кислоты, конечная концентрация которой составляла $2,14\%$. После 45 мин. выдерживания при комнатной температуре и тщательного перемешивания определялись оптические плотности образовавшихся суспензий при $400 m\mu$ в спектрофотометре СФ-4. Прирост протеолиза характеризовался величиной ΔE , соответствующей разности между оптической плотностью, получаемой при нулевом времени протеолиза и оптической плотностью, получаемой в определенные промежутки времени. Контролем служил ход протеолиза в присутствии $1M NaCl$ которая служила растворителем в опытах с добавлением ДНК.

На всех приводимых графиках на оси абсцисс откладывалось время в часах, а на оси ординат-величина ΔE , выраженная в процентах от экстинкции при нулевом времени протеолиза.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ОПЫТОВ

На рис. 1 представлены кривые хода протеолиза сывороточного альбумина трипсином в отсутствие ДНК (контроль) и в присутствии ДНК в реакционной смеси. Из этих кривых следует, что в присутствии ДНК происходит замедление протеолитического процесса и снижение глубины гидролиза. На рис. 2 приведены аналогичные кривые, полученные при использовании в качестве субстрата яичного альбумина, а на рис. 3-кривые, полученные при использовании казеина в качестве субстрата триптического действия. Во всех случаях ДНК оказывает аналогичное действие.

Для выяснения механизма торможения процесса протеолиза в присутствии ДНК проводилось исследование влияния предварительной инкубации с ДНК одного фермента или одного субстрата. На рис. 4 приведены полученные данные. Кривая 1-сывороточный альбумин инкубировался с $NaCl$ в течение 45 мин при $37^\circ C$, после чего добавлялся свежий трипсин и снималась кривая протеолиза. Кривая 2-сывороточный альбумин инкубировался в течение 45 мин. с ДНК, после чего добавлялся свежий трипсин и снималась кривая протеолиза. Кривая 3-трипсин инкубировался с $NaCl$

после чего добавлялся свежий субстрат. Кривая 4-трипсин инкубировался с ДНК, после чего добавлялся свежий субстрат. В вариантах опыта 2 и 4 количество ДНК одинаково и соотношение ДНК /белок равно 1/15. Соотношение ДНК/ трипсин при предварительной инкубации их смеси равнялось 4/1, а соотношение фермент /субстрат в этих опытах составляло 1/70.

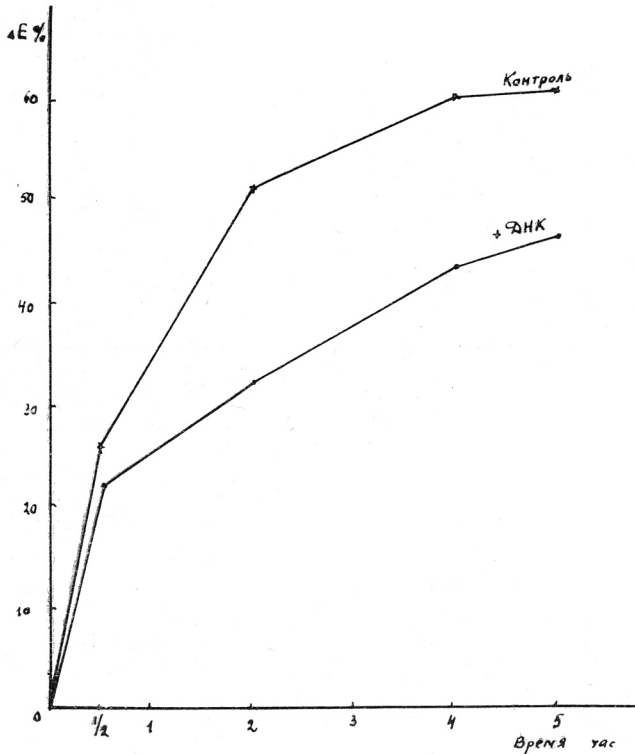


Рис. 1 Ход протеолиза сывороточного альбумина трипсином.

Из рассмотрения этих кривых вытекает, что резкое торможение протеолиза происходило только в случае предварительной инкубации с ДНК субстрата, тогда как предварительная инкубация с ДНК фермента практически не сказывалась на кинетике протеолиза. На основании результатов этих опытов можно прийти к заключению, что в системе сывороточный альбумин-трипсин ДНК оказывает влияние не на фермент, а на субстрат, давая общую картину торможения протеолитического процесса. Аналогично поставленный опыт с использованием в качестве субстрата казеина при других соотношениях компонентов (фермент:субстрат 1/625, ДНК:казеин 1/15 и ДНК:трипсин 41/1) дал менее ярко выраженную картину торможения протеолиза. На рис. 5 приведены результаты этого опыта. Кривая 1-контрольная, кривая 2- казеин инкубирован с ДНК, кривая 3-трипсин инкубирован с NaCl и кривая 4-трипсин инкубирован с ДНК.

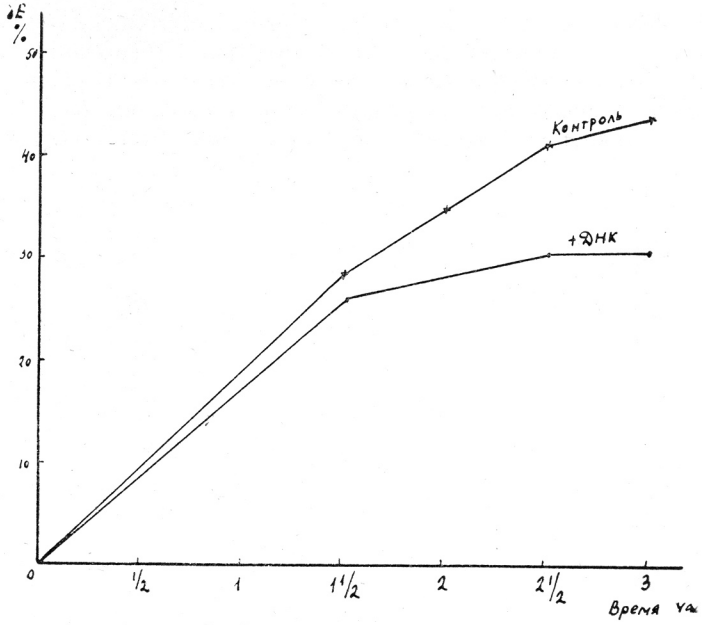


Рис. 2 Ход протеолиза яичного альбумина трипсином.

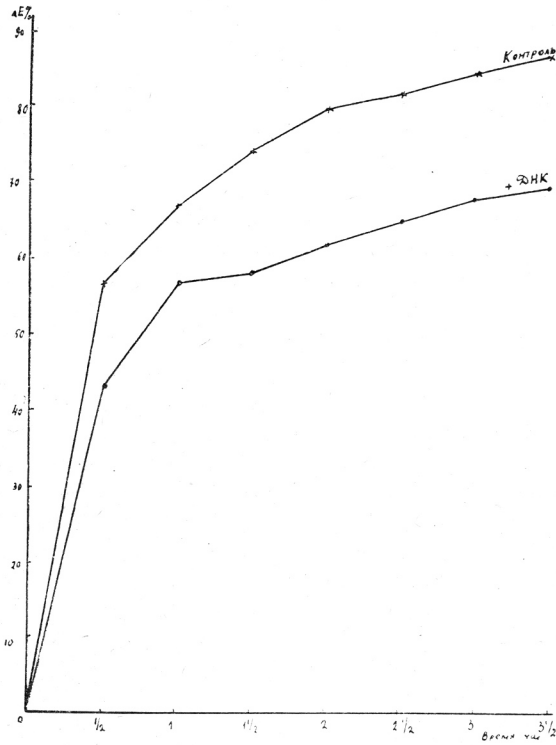


Рис. 3 Ход протеолиза казеина трипсином.

В этом опыте в результате предварительной инкубации с ДНК как фермента, так и субстрата наблюдалось заметное торможение протеолиза. Однако торможение протеолиза при предварительной инкубации трипсина с ДНК было заметно меньше, чем при предварительной инкубации казеина с ДНК. Учитывая очень большое соотношение ДНК /трипсин при их предварительной инкубации в этом опыте можно легко представить себе, что торможение в этом варианте опыта могло явиться результатом взаимодействия с ДНК казеина уже после его сливания с предварительно инкубированной смесью трипсина с ДНК.

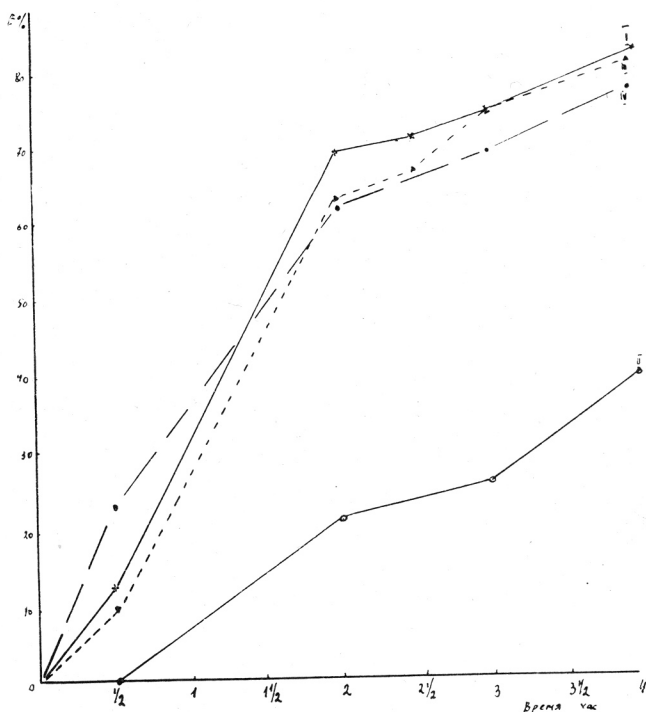


Рис. 4 Влияние предварительной инкубации с ДНК субстрата и фермента на ход протеолиза сывороточного альбумина трипсином.

Мы провели также определение влияния на ход протеолиза величины соотношения ДНК/сывороточный альбумин при предварительной инкубации их смеси (рис. 6). Как следует из этих кривых, увеличение соотношения ДНК/субстрат приводит к усилению торможения протеолиза и только при большом избытке ДНК над сывороточным альбумином (соотношения 1/0,6 и 1/0,5) не происходило дальнейшего торможения протеолиза. В ряде опытов найдено, что торможение протеолиза наступает и при очень большом избытке сывороточного альбумина над ДНК. Так например предварительная инкубация ДНК с сывороточным альбумином в отношении 1/76 давала заметное торможение протеолиза.

Учитывая тот факт, что высокополимерные нуклеиновые кислоты обладают большей способностью к взаимодействию с белками, нам представлялось интересным проследить как влияет полимерность ДНК на ход протеолиза казеина трипсином. Для этой цели раствор казеина инкубировался с различными препаратами ДНК (рис. 7). На кривой 1-нанесен контроль, кривая 2-казеин инкубирован с полимерным препаратом ДНК (Мол. вес 8×10^6), кривая 3-казеин инкубирован с коммерческим препаратом ДНК (Мол. вес около 4×10^6), кривая 4-казеин инкубирован с ДНК деполимеризованной при помощи дезоксирибонуклеазы до полного разжижения. После

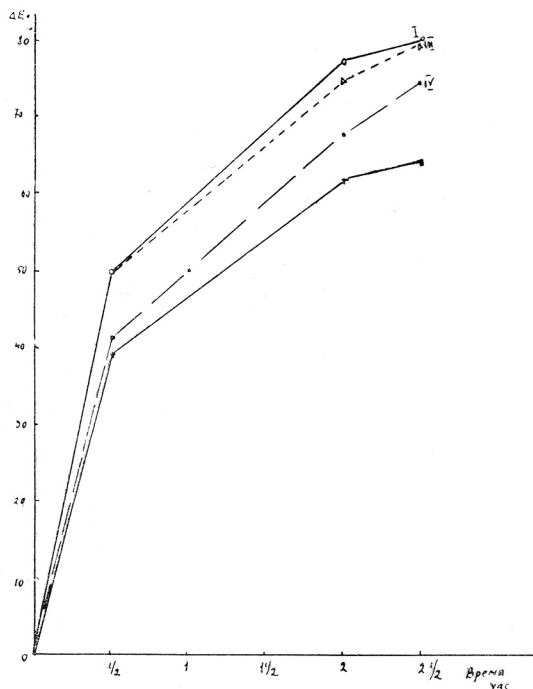


Рис. 5 Влияние предварительной инкубации с ДНК субстрата и фермента на ход протеолиза казеина трипсином. I — Контроль; II — казеин инкубирован с ДНК; III — трипсин инкубирован с NaCl, 2-ой контроль и IV — трипсин инкубирован с ДНК

такой предварительной инкубации во всех вариантах опытов добавлялся трипсин и снималась кинетика протеолиза. Из данных рис. 7 видно, что наибольшее торможение протеолиза имело место в случае инкубации казеина с ДНК с наибольшим молекулярным весом и самым слабым было торможение протеолиза при инкубации казеина с ДНК, обработанной дезоксирибонуклеазой.

Значительное торможение протеолиза было обнаружено также при переваривании казеина смесью двух протеолитических ферментов-трипсина и химотрипсина при наличии ДНК в реакционной смеси (рис. 8).

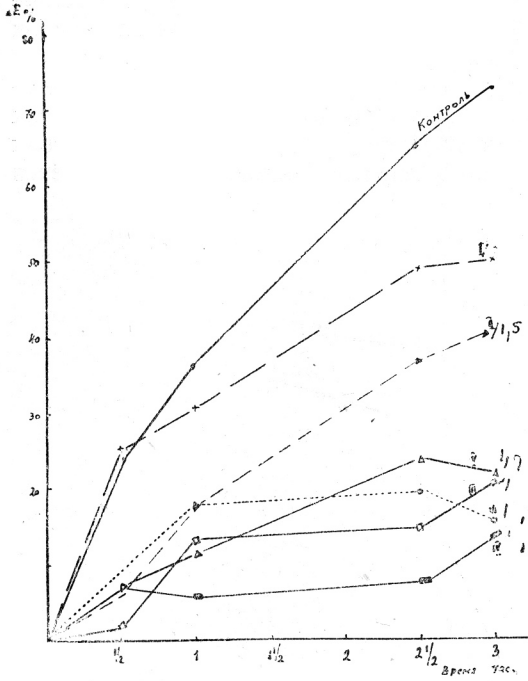


Рис. 6 Влияние величины соотношения ДНК/сывороточный альбумин на ход протеолиза трипсином. I — 1/3; II — 1/1,5; III — 1/1; IV — 1/0,8; V — 1/0,6; VI — 1/0,5.

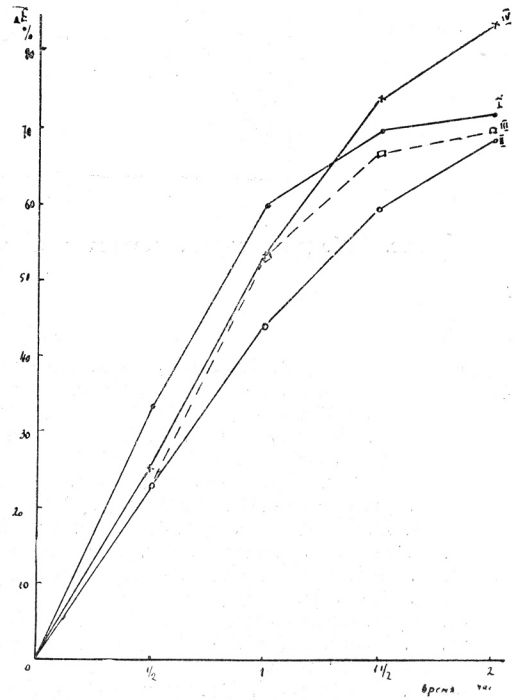


Рис. 7 Влияние степени полимерности ДНК на ход протеолиза казеина трипсином. I — Контроль; II — казеин инкубирован с полимерной ДНК; III — казеин инкубирован с коммерческим препаратом ДНК; IV — казеин инкубирован с деполимеризованной дезоксирибонуклеазой ДНК.

Ранее¹⁴ нами было показано, что энзиматические процессы протекающие вне организма могут зависеть от наличия в реакционной смеси небольших количеств липоидов, образующих комплексы с белками.

В настоящей работе установлено, что присутствие ДНК также существенно влияет на кинетику протеолитического процесса. Совокупность этих фактов свидетельствует о многообразии путей регулирования энзиматических процессов в такой сложной и многокомпонентной системе, какой является живая клетка.

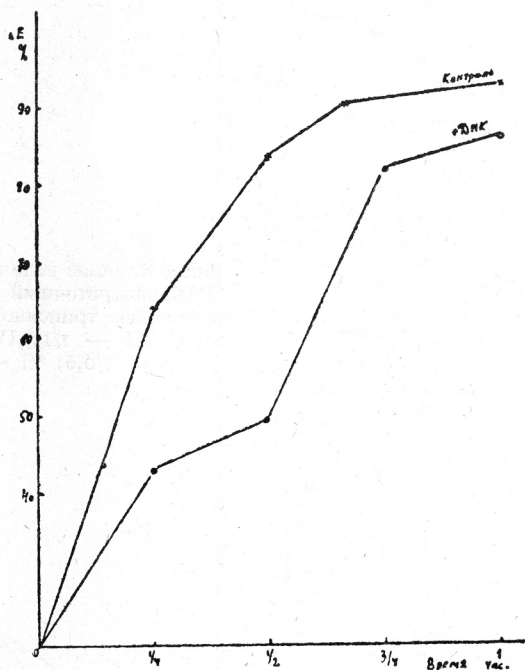


Рис. 8 Ход протеолиза казеина смесью трипсина с химотрипсином.

ЛИТЕРАТУРА

1. K. Slavik a R. Smetana, *Chem. Listy* **47** (1953) 253.
2. F. Šorm a M. Hrubešova, *Chem. Listy* **49** (1955) 115.
3. М. В. Смирнова, *Биохимия* **21** (1955) 561.
4. О. П. Чепинога и И. О. Павловский, *Укр. биох. ж.* **28** (1956) 308.
5. S. Moss, *Science* **115** (1952) 69.
6. J. Butler, *Nature* **156** (1945) 781.
7. R. Scarnes and D. Watson, *J. Bacteriol.* **70** (1955) 110.
8. О. П. Чепинога, *Укр. биох. ж.* **25** (1953) 115.
9. H. Jamane, *J. Physiol. Soc. Japan* **17** (1955) 555.
10. E. Geiduschek and P. Doty, *Biochim. et Biophys. Acta* **9** (1952) 609.
11. R. Nath, M. Cohlly and K. Givi, *J. Ind. Inst. Sci.* **37** (1955) 163.
12. Д. М. Спитковский, *Биофизика* **1**, вып. 4 (1956) 319.
13. Д. Нортроп, М. Кунитц и Р. Херриот, *Кристаллические ферменты*, Москва Иноиздат 1950.
14. А. Опарин, Н. Гельман и Г. Деборин, *Arch. Biochem. Biophys.* — в печати

IZVOD

Utjecaj dezoksiribonukleinske kiseline na cijepanje proteina proteolitskim fermentima

A. I. Oparin, G. A. Deborin i V. Z. Baranova

Budući da je poznato, da nukleinske kiseline utječu na različne fermentativne procese, u ovom je radu ispitano djelovanje dezoksiribonukleinske kiseline (DNK) na proteolitsku aktivnost tripsina. Kao supstrati upotrebljeni su različni kristalni preparati proteina: ovalbumin, serumski albumin i kazein. Ispitivanja su vršena kod vrijednosti pH, koje su ležale iznad izoelektrične točke fermenta i supstrata. Proces proteolize praćen je s pomoću spektrofotometra SF-4; razlike ekstinkcija (ΔE) nanošene su, izražene u postocima, u grafikonima na ordinate, a vrijeme je nanošeno na apscise. Rezultati su prikazani na slikama 1, 2 i 3, iz kojih razabiremo, da nazočnost DNK inhibira proteolizu.

Dalje je ispitano djelovanje prethodne inkubacije, bilo fermenta bilo suptrata s DNK, na proces proteolize. Pokazalo se, da inhibicija proteolize nastupa samo kod prethodne inkubacije supstrata s DNK, dakle da DNK utječe na supstrat, a ne na ferment.

Ispitan je i odnos koncentracija DNK : supstrat, te je ustanovljeno, da i u velikom suvišku supstrata prema DNK dolazi do znatne inhibicije proteolize.

Pokazalo se i to, da utjecaj na proces proteolize opada onako, kako opada molekularna težina DNK.

INSTITUT ZA BIOKEMIJU A. N. BAHA
AKADEMIJA NAUKA SSSR
MOSKVA

Primljeno 21. maja 1957.