

H. HEINLO

TRÜPSIINI ENSÜMAATILISE AKTIIVSUSE SÄILIVUSEST JA AUTOLÜÜSI INHIBEERIMISEST SOJAOAST ERALDATUD INHIBIITORI TOIMEL *

X. ХЕИЛЛО. О СОХРАНЕНИИ ЭНЗИМАТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ И ИНГИБИРОВАНИИ
АУТОЛИЗА ТРИПСИНА В ПРИСУТСТВИИ ИНГИБИТОРА ИЗ СОЕВЫХ БОБОВ

H. HEINLO. PRESERVATION OF TRYPTIC ACTIVITY AND INHIBITION OF AUTOLYSIS OF
TRYPSIN IN THE PRESENCE OF SOYBEAN INHIBITOR

Trüpsiini (T) iseloomustab võime aktiveeruda ja lõhustuda madal-molekulaarseteks fragmentideks niipea, kui pH tõuseb üle 5. Kahel viimasel aastakümnel on paljud [1-8] uurinud T autolüüsi produktide, s. o. T fragmentide fermentatiivset aktiivsust. Ensüümi fragmentide aktiivsuse uurimine pakub huvi seoses küsimusega, kui suur osa fermenti molekulist on vajalik, et tagada fermentreaktsiooni.

Meie varasemates töodes [9, 10] uuriti T leeliselise ja happelise autolüüsi tingimustes saadud produktide eraldumist geelfiltratsioonil ja elektrofooresil, samuti eraldunud fragmentide katalüütilist aktiivsust. Selgus, et katalüütiline aktiivsus on seotud vähemalt $5/8$ -ga natiivse T molekulist. Veelgi väiksemad autolüüsiga saadud fragmendid osutusid katalüütiliselt vähe- või mitteaktiivseteks.

Käesolevas töös uuriti trüpsiini—trüpsiiniinhibiitori komplekside (T—STI kompleks) autolüüsi ja sellega kaasnevaid muutusi ensüümi aktiivsuses. Komplekside moodustamiseks kasutati sojaoast eraldatud trüpsiiniinhibiitorit (STI), mis ühineb T-ga koheselt ja suhteliselt püsivalt, kusjuures inhibeerimine on stöhhiomeetriline ja konkureeriv. T—STI kompleksi ehituse kohta puuduvad täpsed andmed. Levinud aga on seisukoht, et side-med kompleksis on mittekovalentsed. T—STI kompleks on ebastabiilne pH happelises piirkonnas [11].

Käesolevas uurimistöös püüti selgitada, millist toimet avaldab STI trüpsiini autolüüsi kulule ja kuidas muutub T fermentatiivne aktiivsus sõltuvalt T ja STI kaalulistest vahekordadest.

Metoodika

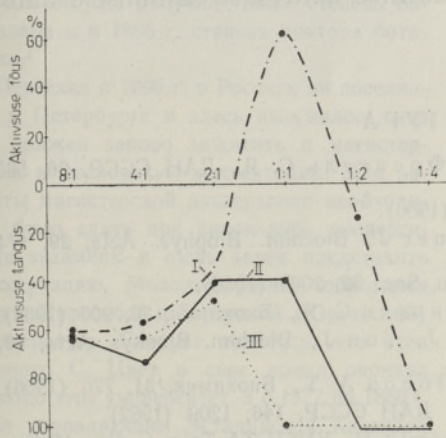
Reagentidena kasutati Spofa kristalset T-d ja Reanali STI-d. T ja STI lahustamiseks, samuti eluendina autolüsaatide geelfiltratsioonil Sephadexi G-100 kolonnis (1,2×140 cm) kasutati 0,1 m formiaatpuhvrit (pH=3,2), millele lisati NaCl kuni ioontugevuseni $\mu=0,5$. T ja STI proovid kaaluti vahekordades 8:1, 4:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:4. Autolüüsi proovid samades kaalulistes vahekordades lahustati boraatpuhvris (pH=8,6) ja inkubeeriti 3,5 tundi temperatuuril 35°C. Autolüüs lõpetati formiaatpuhvri lisamisega kuni lahus saavutas

* Uurimus valmis ENSV TA korrespondentliikme O. Kirreti juhendamisel.

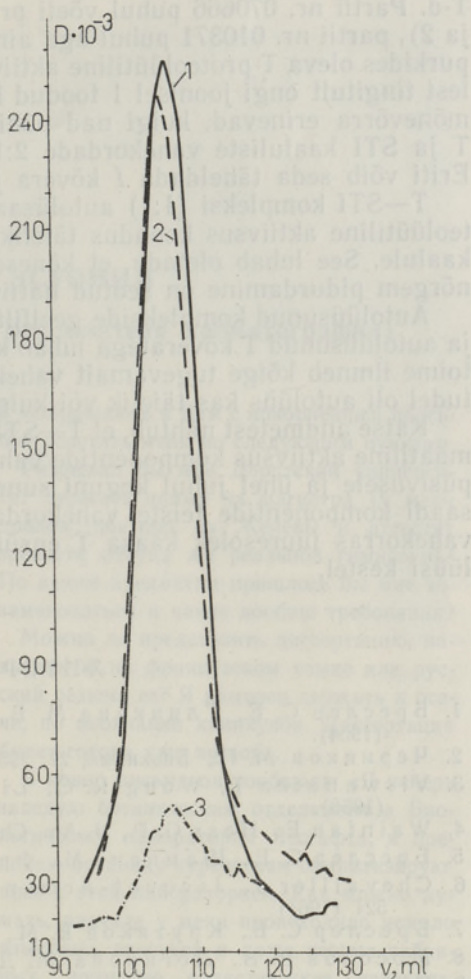
pH=3,2. T-sisalduse muutused proovides määrati spektrofotomeetriliselt lainepikkusel 280 nm ultraviolettspektromeetri (Spektromom 201) abil. T ensümaatilist aktiivsust T—STI kompleksides hinnati kaseiini (Hammarsten, Reanal) hüdrolüüsi intensiivsuse järgi [12].

Uurimistulemused

Andmed T aktiivsuse kohta autolüüsunud ja autolüüsumata fermentiinhibiitori kompleksides on esitatud joonisel 1. Neist selgub, et T ensümaatiline aktiivsus vähenes autolüüsi kulgedes oluliselt T ja STI kõikide vahelkordade puhul, välja arvatud 1:1. T ülelulga korral (8:1,



Joon 1. T aktiivsuse muutumine T—STI kompleksides. I — T (nr. 1)—STI, II — T (nr. 2)—STI, III — T (nr. 3)—STI.



Joon 2. Natiivse T (1), autolüüsunud T—STI (2) ja autolüüsunud T (3) geelfiltratsioonikõverad.

4:1, 2:1) on aktiivsuse vähenemine tingitud peamiselt inhibiitoriga seostamata jäänud T molekulide autolüütilisest lagunemisest. Nendes tingimustes inhibeeris STI lisand T aktiivsust vaid 60—50%. STI suure ülelulga korral (1:4) aga seostati kõik T molekulid inhibiitoriga; see põhjustas kuni 100-protsendilise aktiivsuse languse ja autolüüsi pidurduse. T ja STI vahelkorra 1:1 puhul täheldati proteolüütilise aktiivsuse teatavat suurenemist ehk paremat säilimist, võrreldes T—STI autolüüsumata kompleksi aktiivsusega. T suuremat fermentatiivset aktiivsust komplekside autolüüsates täheldati ka siis, kui mõlema komponendi kaalulised kogused suurendati kas 5- või 10-kordseks. Kirjeldatud nähtus on seega reeglipärane ja huvipakkuv, kuid siiani pole sellele tähelepanu juhitud. Teataval määral on tähelepanu vääriv, et V. Mosolov ja M. Loginova eraldasid T autolüüsast geelfiltratsiooni teel ühe madalmolekulaarse fraktsiooni, mille esteraasne aktiivsus oli kõrgem kui lähtetrüpsiinil [8].

Täienduseks ülalöeldule tuleb märkida, et T—STI komplekside moodustamiseks kasutati kahest erinevast partiist nr. (070666 ja 010371) pärinevat

T-d. Partii nr. 070666 puhul võeti proovid kahest erinevast purgist (nr. 1 ja 2), partii nr. 010371 puhul aga ainult ühest purgist (nr. 3). Kõigis neis purkides oleva T proteolüütiline aktiivsus oli küllaltki erinev. Võib olla sellest tingitult ongi joonisel 1 toodud kolme katse andmed (kõverad I—III) mõnevõrra erinevad, kuigi nad põhiliselt viitavad kõik ühele ja samale: T ja STI kaaluliste vahekordade 2:1 ja 1:1 puhul suureneb T aktiivsus. Eriti võib seda täheldada I kõvera juures.

T—STI kompleksi (1:1) autolüsaadi geelfiltratsiooni fraktsioonide proteolüütiline aktiivsus koondus täielikult piirkonda, mis vastab T molekulkaalule. See lubab oletada, et kõnesoleva aktiivsuse suurenemine või siis nõrgem pidurdamine on seotud natiivse T molekulidega.

Autolüüsunud komplekside geelfiltratsioonikõverate võrdlemine natiivse ja autolüüsunud T kõveratega lubab kinnitada, et T autolüüsi pidurdav STI toime ilmneb kõige tugevamalt vahekorra 1:1 puhul (joon. 2), teistel juhtudel oli autolüüs kas täielik või kulges nõrgemini.

Katse andmetest nähtub, et T—STI kompleksi autolüüsil ilmutab T ensümaatiline aktiivsus komponentide vahekorra 1:1 juures tendentsi suuremale püsivusele ja ühel juhul koguni suurenemisele, võrreldes andmetega, mis saadi komponentide teiste vahekordade juures. Seega aitab STI sobivas vahekorras juuresolek kaasa T ensümaatilise aktiivsuse säilimisele autolüüsi kestel.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бреслер С. Е., Глинкина М. В., Френкель С. Я., ДАН СССР, **96**, 565 (1954).
2. Черников М. П., Биохимия, **21**, 295 (1956).
3. Viswanatha T., Wong R. C., Liener J., Biochim. Biophys. Acta, **29**, 174 (1958).
4. Wainfan E., Hess G. P., J. Am Chem. Soc., **82**, 2069 (1960).
5. Бреслер С. Е., Шампань М., Френкель С. Я., Биохимия, **26**, 909 (1962).
6. Chevallier J., Jacquot-Armand J., Yon J., Biochim. Biophys. Acta, **92**, 521 (1964).
7. Бреслер С. Е., Крутяков В. М., Попов А. Т., Биохимия, **31**, 776 (1966).
8. Мосолов В. В., Лягинова М. Д., ДАН СССР, **146**, 1209 (1962).
9. Kirret O., Lippmaa E., Arro I., Heinlo H., ENSV TA Toimet., Füs.-Matem. ja Tehn.-tead. seeria, **15**, 612 (1966).
10. Kirret O., Arro I., Heinlo H., ENSV TA Toimet., Keem.-Geol., **18**, 83 (1969).
11. Boyer P. D., Lardy H., Myrbäck K., The Enzymes, **4**, New York, 1960.
12. Bergmeyer H. U., Methoden der enzymatischen Analyse, Verlag Chemie, Weinheim, 1962, S. 811—818.

Eesti NSV Teaduste Akadeemia
Keemia Instituut

Toimetusse saabunud
25. I 1972