Доклады Академии наук СССР
1955. Том 104, № 2

БИОХИМИЯ

И. РЫХЛИК, Ю. ШВЕЙЦАР и академик Чехословацкой Академии наук Ф. ШОРМ

СИНТЕЗ ПРОТЕАЗ И АМИЛАЗЫ В ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЕ МЫШИ IN VITRO

(Представлено академиком А. И. Опариным 1 VII 1955)

Поджелудочная железа является весьма подходящим органом для изучения протеосинтеза, так как она характеризуется способностью очень быстро синтезировать белки, обладающие энзиматическим действием, усиление которого можно хорошо определить надежными методами. Физиологический ход синтеза панкреатических энзимов in vivo изучал в последнее время Мирски (1) на поджелудочной железе мыши. Синтез амилазы в срезах поджелудочной железы голубя in vitro был впервые осуществлен Хокином (2), позже в этом органе был установлен in vitro также и синтез эстеразы и рибонуклеазы (3). Однако синтез этих энзимов происходил в значительно меньшем проценте случаев, чем у амилазы. Опыты Хокина с синтезом амилазы in vitro в поджелудочной железе голубя повторили Фернандес и Хункейра (4), но им не удалось доказать синтеза. Синтезом амилазы в гомогенате поджелудочной железы занимались Хесин (5) и Штрауб (6).

Настоящая работа посвящена синтезу протеаз и амилазы в поджелудочной железе мыши in vitro.

Синтезом панкреатических протеаз in vitro до сих пор никто не занимался, хотя протеазы являются хорошо определяемыми панкреатическими энзимами и образуют главную часть белков панкреатического секрета. Мы предпочли поджелудочную железу мыши железе голубя (которой пользовались остальные авторы), потому что анатомическое строение поджелудочной железы мыши позволяет очень быстро приготовить препарат без больших повреждений тканей. В поджелудочной железе мыши синтез энзимов происходит in vivo очень быстро. Уже через 6 час. после секреционного импульса происходит полная реституция органа вплоть до первоначального состояния (7, 1).

Так как для опытов всегда употреблялись поджелудочные железы нескольких (10—12) мышей, то различие между данными отдельных опытов было невелико.

Для опытов мы пользовались белыми мышами весом 20 г. Их поджелудочную железу мы опорожняли секреционным стимулом, который вызывался впрыскиванием 5—7 μг карбаминоилхолина. Через 2 часа после впрыскивания мыши умерщвлялись путем декапитации, поджелудочные железы вынимались, немедленно охлаждались в ледяной бикарбонатной среде Кребса и разрезались острыми ножницами на кусочки величиной 2 × 2 мм. Инкубация производилась, как правило, в течение 3 час. в аппарате Варбурга в бикарбонатной среде Кребса с 0,2% глюкозой, в газообразной смеси O_2 с 5% CO_2, при температуре 40° и с количеством ткани 50—80 мг на один сосудик. По окончании инкубации все содержимое сосудиков охлаждалось до 0°, гомогенизировалось, и вслед за тем определялась активность энзима. Зимогены протеаз, присутствующие в гомогенате, переводились в активные энзимы при помо-

щи энтерокиназы в боратном буфере pH 7,9 с 0,002 *M* $CaCl_2$. Активирование производилось при 4° вплоть до максимальной активности и продолжалось 24—48 час. Активность сохранялась неизменной в течение дальнейших 72 час. Активность протеаз определялась методом, описанным Славиком и Сметана ([8]), при котором не мешает ни наличие соединений с ароматическим ядром, ни присутствие восстановителей. В противоположность первоначальному методу, мы пользовались в качестве субстрата 2% казеином в боратном буфере pH 8,5. Единицей активности протеазы мы считали количество энзима, переводящее в трихлоруксусный фильтрат при данных условиях 10% белка субстрата. Расщепление казеина активированным гомогенатом поджелудочной железы мыши протекало согласно кинетике реакции нулевого порядка. В этой работе мы ограничились определением общей протеолитической активности гомогената, определяемой трипсином и химотрипсином, и не стремились определить обе протеазы независимо друг от друга. Для установления активности амилазы метод по Смиту и Ро ([9]) был видоизменен таким образом, чтобы крахмальный дигест не нужно было после окончания реакции разбавлять. Поэтому мы пользовались в качестве субстрата 0,024% крахмальным раствором и 0,002 *M* раствором иода для получения цветной реакции. Расщепление крахмала происходило как молекулярная реакция. Активность выражалась константой скорости.

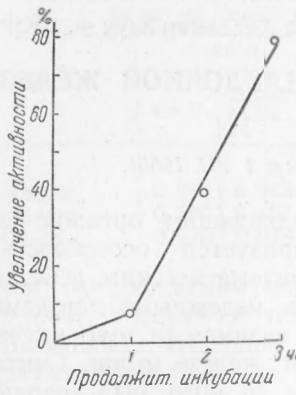


Рис. 1. Зависимость синтеза панкреатических энзимов in vitro от времени

В первых опытах мы определяли зависимость процесса синтеза от времени у протеаз и амилазы в поджелудочной железе мыши in vitro. Стандартный опыт изображен на рис. 1. После начальной лагфазы происходит быстрый синтез как протеаз, так и амилазы. В дальнейших опытах мы установили оптимальную концентрацию субстрата для синтеза обоих энзимов. В качестве источника аминокислот мы пользовались как тотальным кислым гидролизатом казеина, обогощенным триптофаном, так и частичным энзиматическим гидролизатом казеина. Результаты приведены в табл. 1. В противоположность Хокину ([2]), который не нашел подавления синтеза амилазы в поджелудочной железе голубя при высокой концентрации субстрата, мы установили, что оптимальной концентрацией обоих использованных источников аминокислот является 0,2—0,3%. При более низкой и при более высокой концентрациях происходит более слабый синтез протеаз и амилазы.

Из этих опытов вытекает, что свободные аминокислоты являются достаточным источником образования этих энзимов. Дальнейшими опытами мы исключили возможность того, чтобы повышение активности протеаз и амилазы, наблюдаемое в течение инкубации, могло быть вызвано иными процессами, чем синтез белка энзима de novo, например превращением энзимогена в энзим или выделением энзима из структуры путем автолиза и т. д. Результаты сведены в табл. 2. Анаэробная среда и 2,4-динитрофенол ($2 \cdot 10^{-4}$ *M*) совершенно подавляют синтез протеаз и амилазы. То обстоятельство, что в обоих случаях, в которых нарушен энергетический обмен, не происходит повышения активности, свидетельствует в пользу того, что найденное повышение активности вызывается синтезом энзимов. Глюкоза не оказывает влияния ни на синтез протеаз, ни на синтез амилазы. Клетки обладают, повидимому, достаточными эндогенными источниками энергии для синтеза.

Синтез протеаз происходит и в отсутствие внешнего источника аминокислот. Этот эндогенный синтез составляет 10—30% максимального

синтеза при оптимальных условиях. Эндогенный синтез также совершенно подавляется анаэробной средой и 2,4-динитрофенолом. Таким образом, и в этом случае дело идет о настоящем синтезе белка. Являются ли источником аминокислот для этого эндогенного синтеза протеаз и амилазы свободные аминокислоты или белковый предшественник, нельзя решить на основании этих результатов. Некоторые наши опыты с подавлением эндогенного синтеза панкреатических энзимов при помощи веществ, аналогичных аминокислотам, говорят в пользу того, что таким источником являются вещества, с которыми эти аналоги

Таблица 1

Влияние концентрации гидролизата казеина на синтез протеаз и амилазы в поджелудочной железе мыши in vitro (Инкубация в кребсовской бикарбонатной среде, температура 40°, 5% CO_2+95% O_2)

Продолжит. инкубации (час.)	К среде прибавлено	Активность энзимов/мг свежей ткани			
		протеазы в един.	увелич. в %	амилаза в един.	увелич. в %
0	0,2% глюкозы	0,70	0	54	0
3	То же	0,81	16	59	9
3	То же +0,2% гидролизата казеина * .	1,13	61	68	26
3	То же +0,3% гидролизата казеина . . .	1,15	64	71	32
3	То же +0,4% гидролизата казеина . . .	1,06	51	65	20
3	То же +0,5% гидролизата казеина . . .	1,01	44	64	18
0	0,2% глюкозы	0,58	0	47	0
3	То же	0,71	22	59	25
3	То же +0,1% энз. гидролизата **	0,94	62	71	51
3	То же +0,2% энз. гидролизата	1,06	83	83	77
3	То же +0,4% энз. гидролизата	0,70	20	65	38
3	То же +0,8% энз. гидролизата	—	—	61	30

* Тотальный кислый гидролизат казеина, обогащенный 2% триптофана.

** Частичный энзиматический гидролизат казеина.

Таблица 2

Влияние некоторых факторов на синтез протеаз и амилазы. (Инкубация в кребсовской бикарбонатной среде, температура 40°, 5% CO_2+95% O_2)

Продолжит. инкубации (час.)	К среде прибавлено	Активность энзимов/мг свежей ткани			
		протеазы в един.	увелич. в %	амилаза в един.	увелич. в %
0	—	0,38	0	46	0
3	0,2% глюкозы + 0,2% гидролиз казеина в анаэробных условиях *	0,39	2	49	6
3	0,2% глюкозы + 0,2% гидролиз. казеинна + +2,4-динитрофенол $2 \cdot 10^{-4}$ *M*	0,38	0	47	2
3	—	0,48	26	57	24
3	0,2% глюкозы	0,53	39	65	41
3	0,2% глюкозы + 0,2% гидролиз. казеина без триптофана . . .	0,43	13	65	41
3	0,2% гидролиз. казеина без триптофана	0,42	10	58	18
3	0,2% глюкозы + 0,2% гидролиз. казеина	0,73	92	76	65
3	0,2% гидролиз. казеина	0,70	84	74	61

* 5% CO_2 + 95% N_2 в газообразной среде.

аминокислот конкурируют, т. е. свободные аминокислоты или же пептиды. Максимальный синтез панкреатических протеаз происходит только при наличии гидролизата казеина, обогащенного триптофаном. В среде, содержащей все необходимые аминокислоты, кроме триптофана, синтез протеаз и амилазы таков же, как и синтез эндогенный или еще ниже. В этом отношении наши опыты, при которых измерялся синтез белка при помощи их энзиматической активности, отличаются от опытов, определяющих синтез путем инкорпорации радиоактивных аминокислот. Аминокислоты инкорпорируются независимо друг от друга, синтез de novo требует наличия всех существенно важных аминокислот, так как это происходит при питании животных in vivo. Эти результаты говорят в пользу того, что и для панкреатических протеаз дело идет о действительном синтезе de novo, подобно тому, как это было доказано Хокином ([10]) в поджелудочной железе голубя для амилазы.

Наконец, мы занимались влиянием некоторых специфических ингибиторов протеосинтеза на синтез протеаз и амилазы in vitro. Результаты сведены в табл. 3. Азасерин (0-диазоацетилсерин), тормозящий рост опухолевых клеток ([11]), оказался сильным ингибитором протеосинтеза.

Мы предполагаем, что повреждение поджелудочной железы, вызываемое азасерином in vivo в больших количествах, объясняется подавлением протеосинтеза в поджелудочной железе. Из двух производных метионина, относительно которых можно было предполагать, что они будут подавлять синтез путем конкуренции с аминокислотами, ингибитором являлся только метионинсульфоксинин [12], в то время как *DL*-этионин [13] не оказывал на синтез никакого влияния даже в концентрации 500 μг на 1 мл. Этот факт является неожиданным, так как этионин вызывает in vivo такой же некроз поджелудочной железы, как и азасерин.

Таблица 3

Подавление протеосинтеза протеаз и амилазы в поджелудочной железе мыши in vitro, выраженное в % синтеза контрольных образцов

Ингибитор	Концентрация ингибиторов в мг/мл							
	500		50		5		0,5	
	П*	А**	П	А	П	А	П	А
L-азасерин ***	86	60	52	23	25	7	0	0
DL-метионинсульфоксимин ***	84	100	40	76	10	62	2	19
DL-этионин ***	0	0	0	0	0	0	0	0
D-хлорамфеникол	72	58	стим.	стим.	0	0	0	0
L-хлорамфеникол	23	27	8	0	0	0	0	0

* Протеазы. ** Амилаза. *** Приготовлено синтетическим отделением Химического института Чехословацкой Академии наук.

Найденный нами факт согласуется с результатами работы Фарбера и сотр. [14], которые нашли, что in vivo *DL*-этионин не влияет на активность панкреатических энзимов в течение первых 5—6 час. после введения в организм. Ввиду того что этионин не влияет на синтез энзимов в поджелудочной железе, весьма вероятно, что вызываемый им некроз этой железы зависит не от подавления протеосинтеза, но от иного механизма. *D*-хлорамфеникол, являющийся сильным ингибитором протеосинтеза у микроорганизмов [15], подавлял синтез энзимов в поджелудочной железе только в максимальной концентрации 500 μг/мл. Это действие, повидимому, не производится тем же механизмом, как подавление протеосинтеза у микроорганизмов, так как при этой же самой концентрации протеосинтез в поджелудочной железе подавляется и *L*-хлорамфениколом, который не действует на микробы. В некоторых опытах с *D*-хлорамфениколом наступала слабая стимуляция протеосинтеза при концентрации хлорамфеникола 20—50 μг/мл. Относительно того, вызывается ли различное влияние хлорамфеникола на протеосинтез в клетках бактерий и животных разной проницаемостью клеточных оболочек или различным механизмом, при помощи которого синтезируются белки, или же иными факторами, на основании этих опытов нельзя решить.

Своими опытами мы доказали, что в поджелудочной железе мыши in vitro происходит синтез протеаз и амилазы, установили условия, при которых этот синтез происходит, и изучили влияние некоторых ингибиторов протеосинтеза на этот синтез.

Поступило
28 VI 1955

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

[1] M. M. Daly, A. E. Mirsky, J. Gen. Physiol., 36, 243 (1953). [2] L. E. Hokin, Biochem. J., 48, 320 (1951). [3] R. Schucher, L. E. Hokin, J. Biol. Chem., 210, 551 (1954). [4] J. F. Fernandes, L. C. U. Junqueira, Arch. Biochem., 55, 54 (1955). [5] Р. Б. Хесин, Биохимия, 18, 462 (1953). [6] A. Ullman, F. B. Straub, Acta Physiol. Acad. Sci. Hung., 6, 377 (1954). [7] G. Ch. Hirsch, Z. Zellforsch., 15, 36 (1932). [8] K. Slavik, R. Smetana, Chem. Listy, 46, 649 (1952). [9] B. W. Smith, J. M. Roe, J. Biol. Chem., 179, 53 (1949). [10] L. E. Hokin, Biochem. J., 50, 216 (1952). [11] S. S. Sternberg, F. S. Philips, D. A. Clarke, Federation Proc., 13, 444 (1954). [12] B. M. Braganza, P. Faulkner, J. H. Quastel, Biochim. et Biophys. Acta, 10, 83 (1953). [13] M. V. Simpson, E. Farber, H. Tarver, J. Biol. Chem., 182, 81 (1950). [14] E. Farber, H. Sidransky, E. D. Kilbourne, Federation Proc., 13, 428 (1954). [15] E. F. Gale, Advanc. Protein Chem., 8, 285 (1953).