

УДК 577.152.344.02

М. ПАБЕРИТ

ОСОБЕННОСТИ ПРОЯВЛЕНИЯ КИНЕТИЧЕСКОГО ЭФФЕКТА ВЫСАЛИВАНИЯ ПРИ ДЕАЦИЛИРОВАНИИ *n*-N, N, N-ТРИМЕ- ТИЛАММОНИЙ-транс-ЦИННАМОИЛХИМОТРИПСИНА

(Представил Э. Липпмаа)

В нашей лаборатории показано [1], что соли влияют одинаково на деацилирование разных ацилхимотрипсинов, ацильная группа которых размещена в центре гидрофобного связывания (гидрофобной щели). Их влияние объясняется кинетическим эффектом высаливания [2] и описывается уравнением

$$\lg k_3 = \lg k_3^0 + \Delta\kappa_{k_3}c + \Delta B_{k_3}c^2, \quad (1)$$

где k_3 — константа скорости деацилирования, c — молярная концентрация соли, а $\Delta\kappa$ и ΔB обозначают разности в характеристиках высаливания (всаливания) исходного и активированного состояний реакций (независимо от знака $\Delta\kappa$ будем называть этот эффект кинетическим эффектом высаливания; параметры уравнения (1), являясь разностями двух величин, не позволяют судить, происходит ли при добавлении солей высаливание или всаливание этих состояний).

В случае *n*-N, N, N-триметиламмоний-транс-циннамоилхимотрипсина (ТМАЦ-ХТ), где ацильная группа расположена вне гидрофобной щели [3], было показано, что зависимость его константы скорости деацилирования от концентрации KCl в интервале 1,2—3,5 М также описывается уравнением (1) [3], при этом значения $\Delta\kappa$ и ΔB сильно отличались от соответствующих значений для ацилхимотрипсинов, ацильные группы которых размещены в гидрофобной щели [1, 2]. Для получения более детального представления о проявлении кинетического эффекта высаливания в деацилировании ТМАЦ-ХТ было предпринято исследование влияния различных солей на эту реакцию.

Экспериментальная часть

Реактивы, приготовление растворов, методика кинетических экспериментов и обработка данных описаны в [1–3].

Результаты и их обсуждение

При добавлении солей константа скорости деацилирования ТМАЦ-ХТ (табл. 1 и [3]) уменьшается (рисунок). Поскольку ацильная группа в ТМАЦ-ХТ несет положительный заряд, то возникает вопрос, не вызвано ли такое влияние солей происходящим при повышении ионной силы раствора тушением электростатических взаимодействий между этим зарядом и каким-нибудь отрицательным зарядом в ферменте [5]. Известно, однако, что при введении индола или ацетонитрила в гидрофобную щель ТМАЦ-ХТ зависимость $\lg k_3$ от концентрации соли становится

Таблица 1

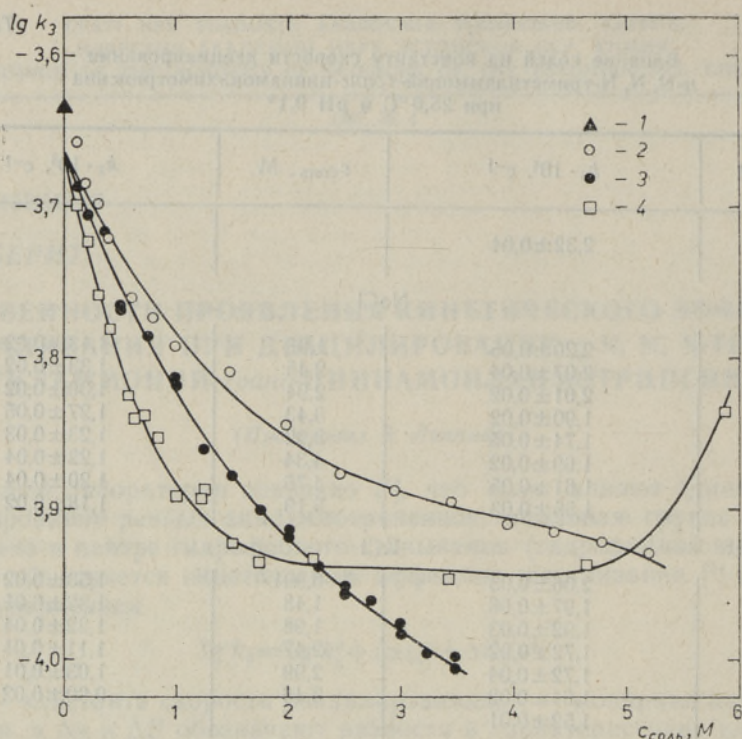
Влияние солей на константу скорости деацилирования
p-N, N, N-триметиламмоний-транс-циннамоилхимо-трипсина
 при 25,0 °C и pH 9,1*

$c_{\text{соль}}, \text{M}$	$k_3 \cdot 10^4, \text{с}^{-1}$	$c_{\text{соль}}, \text{M}$	$k_3 \cdot 10^4, \text{с}^{-1}$
0	$2,32 \pm 0,04$		
NaCl			
0,102	$2,20 \pm 0,05$	1,96	$1,43 \pm 0,02$
0,189	$2,07 \pm 0,04$	2,45	$1,33 \pm 0,02$
0,290	$2,01 \pm 0,02$	2,94	$1,30 \pm 0,02$
0,392	$1,90 \pm 0,02$	3,43	$1,27 \pm 0,05$
0,588	$1,74 \pm 0,05$	3,92	$1,23 \pm 0,03$
0,785	$1,69 \pm 0,02$	4,34	$1,22 \pm 0,04$
0,981	$1,61 \pm 0,05$	4,76	$1,20 \pm 0,04$
1,47	$1,55 \pm 0,03$	5,19	$1,18 \pm 0,02$
KCl			
0,099	$2,06 \pm 0,03$	0,991	$1,53 \pm 0,02$
0,198	$1,97 \pm 0,06$	1,48	$1,32 \pm 0,01$
0,346	$1,92 \pm 0,03$	1,98	$1,22 \pm 0,04$
0,495	$1,72 \pm 0,02$	2,47	$1,11 \pm 0,01$
0,496	$1,72 \pm 0,04$	2,99	$1,03 \pm 0,01$
0,742	$1,64 \pm 0,02$	3,46	$0,99 \pm 0,02$
0,989	$1,52 \pm 0,01$		
CsCl			
0,102	$2,00 \pm 0,01$	1,20	$1,29 \pm 0,04$
0,197	$1,89 \pm 0,02$	1,24	$1,29 \pm 0,01$
0,292	$1,75 \pm 0,01$	1,47	$1,20 \pm 0,01$
0,394	$1,64 \pm 0,01$	1,71	$1,16 \pm 0,01$
0,546	$1,50 \pm 0,01$	2,19	$1,18 \pm 0,02$
0,601	$1,44 \pm 0,04$	3,40	$1,14 \pm 0,03$
0,688	$1,43 \pm 0,02$	4,63	$1,16 \pm 0,01$
0,830	$1,42 \pm 0,02$	5,85	$1,47 \pm 0,06$
0,983	$1,30 \pm 0,03$		

* Приведены взвешенные средние 3—4 измерений вместе со среднеквадратичной ошибкой; pH поддерживали 0,05 М карбонатным буфером [4].

похожей на солевую зависимость константы скорости таких ацилхимо-трипсинов, ацильные группы которых не заряжены [6]. Поскольку такая модификация не должна затрагивать взаимодействий между зарядами, то мы сделали вывод, что влияние солей на деацилирование ТМАЦ-ХТ не может происходить от тушения электростатических взаимодействий.

Каждая из трех солей влияет на скорость реакции по-своему (рисунок). В области низких концентраций их влияние усиливается в ряду $\text{NaCl} < \text{KCl} < \text{CsCl}$, в таком же ряду находятся эти соли по своему влиянию на деацилирование циннамоилхимо-трипсина [2]. Это согласуется с предположением, что, как и в случае циннамоилхимо-трипсина [2] и 3-(2-фурил) акрилоилхимо-трипсина [1], влияние солей на деацилирование ТМАЦ-ХТ вызвано кинетическим эффектом высаливания. В отличие от случая циннамоилхимо-трипсина [2], однако, кривая влияния CsCl на деацилирование ТМАЦ-ХТ не является параболой: за быстрым уменьшением $\lg k_3$ при концентрациях ниже 1,5 М (рисунок) должно было бы, по уравнению (1), следовать такое же быстрое увеличение $\lg k_3$ при дальнейшем росте концентрации CsCl. Вместо этого константа k_3 остается практически постоянной в интервале концентраций CsCl от 1,7 до 4,6 М и лишь при наивысшей концентрации соли она несколько увеличивается.



Зависимость константы скорости деацилирования ТМАЦ-ХТ от концентрации добавленной в буферный раствор соли: 1 — без соли; 2 — NaCl; 3 — KCl; 4 — CsCl. Условия опытов см. в табл. 1. Проведенные через точки кривые рассчитаны по уравнению (2) с использованием значений параметров из табл. 2.

При выводе параболического уравнения (1) использовали только линейный и квадратичный члены степенного ряда в зависимости логарифма коэффициента активности неэлектролита от концентрации соли [2]; в концентрированных растворах, однако, более высокие члены могут тоже оказаться значимыми [7-9]. Это может привести к появлению в зависимости $\lg k$ от концентрации соли соответствующих дополнительных членов. Проверка значимости таких членов по критерию $F_{0,05}$ [10] показала, что описание данных на рисунке следует проводить на основании уравнения

$$\lg k_3 = \lg k_3^0 + \sum_{i=1}^3 \Delta \alpha_{k_3, i} c_i + \sum_{i=1}^3 \Delta B_{k_3, i} c_i^2 + \sum_{i=1}^3 \Delta C_{k_3, i} c_i^3 + \Delta D_{k_3, \text{CsCl}} c_{\text{CsCl}}^4 \quad (2)$$

где c_i — молярная концентрация i -й соли; множители третьей и четвертой степеней концентрации соли ΔC и ΔD выписаны по аналогии с множителями $\Delta \alpha$ и ΔB (см. [2]). Найденные методом наименьших квадратов значения параметров уравнения (2) приведены в табл. 2.

Из рисунка видно, что уравнение (2) с параметрами табл. 2 хорошо описывает влияние этих солей на константу скорости деацилирования ТМАЦ-ХТ в широком интервале варьирования концентрации соли. Больше других отклоняется от проведенных линий константа, измеренная в буфере без добавления соли. Поскольку отклонение начальных точек (хотя и не вверх, а вниз от проведенных парабол) наблюдалось и при исследовании солевых зависимостей деацилирования циннамоилхи-

Параметры кинетического эффекта высаливания при деацилировании ацилхимотрипсинов

Параметр уравнения (2)	ТМАЦ-ХТ*	Ацилхимотрипсины, у которых ацильная группа размещена в гидрофобной щели **	Вклад от взаимодействия ацильной группы с гидрофобной щелью***
$\lg k^{\circ}_3$	$-3,663 \pm 0,004$		
		NaCl	
$\Delta \kappa_{k_3}$	$-0,155 \pm 0,010$	$0,079 \pm 0,005$	$0,23 \pm 0,02$
ΔB_{k_3}	$0,036 \pm 0,005$	$-0,003 \pm 0,001$	$-0,039 \pm 0,006$
ΔC_{k_3}	$-0,0030 \pm 0,0007$	—	$0,0030 \pm 0,0007$
		KCl	
$\Delta \kappa_{k_3}$	$-0,204 \pm 0,013$	$0,070 \pm 0,006$	$0,27 \pm 0,02$
ΔB_{k_3}	$0,047 \pm 0,009$	$-0,008 \pm 0,002$	$-0,055 \pm 0,011$
ΔC_{k_3}	$-0,0048 \pm 0,0018$	—	$0,0048 \pm 0,0018$
		CsCl	
$\Delta \kappa_{k_3}$	$-0,363 \pm 0,015$	$0,033 \pm 0,005$	$0,40 \pm 0,02$
ΔB_{k_3}	$0,177 \pm 0,014$	$-0,005 \pm 0,001$	$-0,182 \pm 0,015$
ΔC_{k_3}	$-0,0378 \pm 0,0039$	—	$0,0378 \pm 0,0039$
ΔD_{k_3}	$0,0029 \pm 0,0004$	—	$-0,0029 \pm 0,0004$

* $n=56$, $r=0,9965$, $s=0,0081$. Значения параметров приведены со среднеквадратичными отклонениями. Влияние на эту реакцию KCl в интервале концентраций 1,2—3,5 М было описано [3] при помощи уравнения (1) с параметрами $\lg k^{\circ}_3 = -3,733 \pm 0,015$, $\Delta \kappa_{k_3} = -0,116 \pm 0,013$ и $\Delta B_{k_3} = 0,0112 \pm 0,0028$. Уравнение (2) с параметрами, приведенными в таблице, описывает влияние KCl в интервале концентраций 0,1—3,5 М; значения параметров в этой таблице основываются также на большем количестве данных.

** Приведены взвешенные средние \pm ошибки взвешенной средней опубликованных параметров, описывающих влияние NaCl на деацилирование 3-(2-фурил)акилоилхимотрипсина [1] и циннамоилхимотрипсина [2] и влияние KCl на деацилирование тех же ацилферментов и N-ацетил-L-тирозилхимотрипсина [1]. Для CsCl приведены значения параметров, характеризующие его влияние на деацилирование циннамоилхимотрипсина [2]. Прочерки обозначают параметры, незначимые по F-критерию [10].

*** Получен вычитанием значения параметра для ТМАЦ-ХТ из значения соответствующего параметра для ацилферментов, у которых ацильная группа размещена в гидрофобной щели.

мтрипсина [2] и 3-(2-фурил)акилоилхимотрипсина [1], то был сделан вывод, что это отклонение носит систематический характер и вызвано, видимо, каким-нибудь побочным эффектом; поэтому начальная точка была опущена при обработке данных по уравнению (2).

Из табл. 2 видно, что параметры $\Delta \kappa_{k_3}$ при деацилировании ТМАЦ-ХТ отрицательны. По абсолютному значению они весьма велики, но это не приводит к значительному замедлению реакции в присутствии соли, так как параметры ΔB_{k_3} положительны и тоже велики — это заметно при сравнении их с соответствующими значениями для ацилферментов, у которых ацильная группа размещена в гидрофобной щели (табл. 2). Относительно высокие абсолютные значения множителей в уравнении (2) отличают ТМАЦ-ХТ от этих ацилферментов.

Абсолютные значения параметров уравнения (2) растут в ряду $\text{NaCl} < \text{KCl} < \text{CsCl}$. Это хорошо видно при сравнении значений $\Delta \kappa_{k_3}$. Значения ΔB_{k_3} и особенно ΔC_{k_3} с NaCl и KCl практически неразличимы (интервалы их среднеквадратичных отклонений перекрываются), но

абсолютные значения ΔB_{k_3} и ΔC_{k_3} с CsCl существенно превышают соответствующие значения с NaCl и KCl, причем отношение параметра с CsCl к параметру с NaCl для Δk равно $2,3 \pm 0,3$, для ΔB — 5 ± 1 и для ΔC — 13 ± 4 . Наличие такой тенденции объясняет, по-видимому, почему влияние NaCl при концентрациях выше 5 М описывается без привлечения параметра ΔD . Увеличение значимости высших членов степенного ряда в зависимости $\lg k_3$ от концентрации соли при переходе от NaCl через KCl к CsCl наблюдается и в случае ацилхимотрипсинов, у которых ацильная группа размещена в гидрофобной щели (табл. 2): абсолютное значение соотношения $\Delta B/\Delta k$ для NaCl составляет $0,04 \pm 0,02$, для KCl — $0,11 \pm 0,04$ и для CsCl — $0,15 \pm 0,06$. Если появление высших членов в степенном ряду зависимости коэффициента активности неэлектролита от концентраций других растворенных веществ обусловлено взаимодействиями в парах, тройках и т. д. частиц растворенных веществ [1], то полученный результат — увеличение значимости таких членов в том же порядке, в каком увеличиваются размеры катиона соли, — кажется весьма естественным.

Из табл. 2 видно, что значения параметров кинетического эффекта высаливания при деацилировании ацилхимотрипсинов, у которых ацильная группа размещена в гидрофобной щели, сильно отличаются от соответствующих значений для ТМАЦ-ХТ. Изменение значений параметров кинетического эффекта высаливания при введении ацильной группы в гидрофобную щель можно рассматривать как внесение в эти параметры определенных вкладов, отражающих взаимодействие между гидрофобной щелью и лигандом [1]. Доказательством правомочности такого подхода является факт, что такое же изменение кинетического эффекта высаливания при деацилировании ТМАЦ-ХТ наблюдается при введении в его гидрофобную щель постороннего лиганда-эффектора (индола или ацетонитрила) [6]. Эти вклады были вычислены на основании данных табл. 2. Они отличаются по знаку от значений параметров кинетического эффекта высаливания при деацилировании ТМАЦ-ХТ, по абсолютной величине они с ними или сравнимы, или несколько превосходят их, так что при введении ацильной группы в гидрофобную щель параметры кинетического эффекта высаливания или становятся равными нулю, или меняют знак (табл. 2).

Выводы

Влияние исследованных солей на деацилирование ТМАЦ-ХТ объясняется кинетическим эффектом высаливания. Зависимость $\lg k_3$ от молярной концентрации соли описывается степенным рядом, включающим первую, вторую и третью степени, а в случае CsCl — и четвертую степень концентрации соли. Абсолютные значения коэффициентов степенного ряда растут в порядке $\text{NaCl} < \text{KCl} < \text{CsCl}$, в таком же порядке растет и значимость высших членов степенного ряда. Из сравнения параметров кинетического эффекта высаливания при деацилировании ТМАЦ-ХТ, в котором гидрофобная щель свободна, и ацилхимотрипсинов, у которых в гидрофобной щели размещена ацильная группа, получены вклады в значения параметров, отражающие взаимодействие ацильной группы с гидрофобной щелью.

ЛИТЕРАТУРА

1. Паберит М., Аавиксаар А. Кинетический эффект высаливания в деацилировании 3-(2-фурил)акрилоилхимотрипсина. — Изв. АН ЭССР. Хим., 1985, 34, № 2, 114—119.
2. Paberit, M., Peips, M., Aaviksaar, A. Salting effects in cinnamoyl-chymotrypsin deacylation. — Biochim. Biophys. Acta, 1984, 789, N 3, 257—265.

3. Паберит М., Аавиксаар А. Кинетическое проявление двух форм фермента в деацилировании *p*-N,N,N-триметиламмоний-циннамоилхимоотрипсина. — Изв. АН ЭССР. Хим., 1983, 32, № 4, 273—280.
4. Biochemists' Handbook. London, 1961, 22—42.
5. Узбб Л. Ингибиторы ферментов и метаболизма. М., 1966, 765—768.
6. Паберит М. Ю., Пейнс М. М., Аавиксаар А. А. Солевая зависимость прототипирования реакции деацилирования *p*-N,N,N-триметиламмоний-*транс*-циннамоилхимоотрипсина. — Реакц. способн. орг. соед., 1986, 23, № 1 (81), 57—62.
7. Robinson, R. A., Stokes, R. H. Activity coefficients of mannitol and potassium chloride in mixed aqueous solutions at 25°. — J. Phys. Chem., 1962, 66, N 3, 506—507.
8. Bower, V. E., Robinson, R. A. The thermodynamics of the ternary system: urea-sodium chloride-water at 25°. — J. Phys. Chem., 1963, 67, N 7, 1524—1527.
9. Wen, W.-Y., Chen, C.-M. Activity coefficients for two ternary systems: water-urea-tetramethylammonium bromide and water-urea-tetrabutylammonium bromide at 25°. — J. Phys. Chem., 1969, 73, N 9, 2895—2901.
10. Seydel, J. K., Schaper, K.-J. Chemische Struktur und biologische Aktivität von Wirkstoffen. Weinheim, 1979, 247—248.
11. Scatchard, G., Prentiss, S. S. Freezing points of aqueous solutions. VII. Ethyl alcohol, glycine and their mixtures. — J. Amer. Chem. Soc., 1934, 56, N 7, 1486—1492.

Институт химической и
биологической физики
Академии наук Эстонской ССР

Поступила в редакцию
20/VI 1986

M. PABERIT

KINEETILISE SOOLAMISEFEKTI AVALDUMISE ISEÄRASUSED *p*-N,N,N-TRIMETÜÜLAMMOONIUM-*trans*-TSINNAMOÜLKÜMOTRÜPSIINI DEATSÜLATSIOONIL

Artiklis on uuritud NaCl (kuni kontsentratsioonini 5,2 M), KCl (kuni 3,5 M) ja CsCl (kuni 5,9 M) mõju *p*-N,N,N-trimetüülammooniium-*trans*-tsinnamoüülkümotrüpsiini (TMAT-KT) deatsülatatsioonile 25°C ja pH 9,1 juures. On näidatud, et soolade mõju seletub kineetilise soolamiseefektiga. Reaktsiooni kiiruskonstandi logaritmi $\log k_3$ sõltuvus soola molaarsest kontsentratsioonist kirjeldub astmereaga, mis sisaldab soola kontsentratsiooni esimest, teist ja kolmandat, CsCl puhul aga ka veel neljandat astet. Astmerea kordajate absoluutväärtused kasvavad soolade reas $\text{NaCl} < \text{KCl} < \text{CsCl}$, samas reas kasvab ka astmerea kõrgemate liikmete olulisus. TMAT-KT, mille hüdrofoobse sidumise tsenter on vaba, ja selliste atsüülkümotrüpsiinide, mille hüdrofoobse sidumise tsentris paikneb atsüülrühm, deatsülatatsiooni soolasõltuvuste võrdlusest leiti atsüülrühma ja hüdrofoobse sidumise tsentri vahelist interaktsiooni kajastavad panused kineetilise soolamiseefekti parameetrite väärtustesse.

M. PABERIT

SPECIFIC FEATURES IN THE MANIFESTATION OF THE KINETIC SALTING EFFECT IN THE *p*-N,N,N-TRIMETHYLAMMONIUM *trans*-CINNAMOYLCHYMOTRYPSIN DEACYLATION

The influence of NaCl (in concentrations up to 5.2 M), KCl (up to 3.5 M), and CsCl (up to 5.9 M) on the *p*-N,N,N-trimethylammonium *trans*-cinnamoylchymotrypsin (TMAT-KT) deacylation at 25°C and pH 9.1 has been studied. It is shown that the influence of the salts is caused by the kinetic salting effect. The rate constant logarithm, $\log k_3$, can be represented by a power series in salt concentration. The series includes the first, second and third powers, with CsCl also the fourth power in salt concentration. The absolute values of the coefficients in the power series increase in the order of salts $\text{NaCl} < \text{KCl} < \text{CsCl}$, the importance of the higher terms grows in the same order. From the comparison of salt influence on the deacylation of TMAT-KT, in which the hydrophobic binding site is free, and of acylchymotrypsins, in which the acyl group lies in the hydrophobic binding site, the contributions made by the interaction of the acyl group with the hydrophobic binding site to the values of the kinetic salting effect parameters have been found.