

М. ПАБЕРИТ, А. ААВИКСААР

### КИНЕТИЧЕСКИЙ ЭФФЕКТ ВЫСАЛИВАНИЯ В ДЕАЦИЛИРОВАНИИ 3-(2-ФУРИЛ)АКРИЛОИЛХИМОТРИПСИНА

Недавно в нашей лаборатории показано [1, 2], что в реакции деацилирования циннамоил- и *n*-N,N,N-триметиламмоний-циннамоилхимотрипсина проявляется кинетический эффект высаливания: зависимость скорости реакции от молярных концентраций солей выражается уравнением

$$\lg k_3 = \lg k_3^0 + \Delta\chi_{h_3}c + \Delta B_{h_3}c^2, \quad (1)$$

где  $\Delta\chi$  и  $\Delta B$  обозначают разности в характеристиках высаливания исходного и активированного состояний реакции. Значения параметров кинетического эффекта высаливания под действием KCl для циннамоилхимотрипсина (Ц-ХТ) и *n*-N,N,N-триметиламмоний-циннамоилхимотрипсина (ТМАЦ-ХТ) различались при этом вплоть до обращения знака: в первом случае  $\Delta\chi_{h_3} > 0$  и  $\Delta B_{h_3} < 0$ , а во втором случае  $\Delta\chi_{h_3} < 0$  и  $\Delta B_{h_3} > 0$ . Так как эти ацилхимотрипсины принципиально отличаются друг от друга по взаимодействию привязанной к ферменту ацильной группы с гидрофобной полостью в его активном центре — в Ц-ХТ бензольное ядро остатка коричной кислоты заполняет гидрофобную полость, а в ТМАЦ-ХТ эта полость остается свободной [2], то было высказано предположение [1], что разница в значениях  $\Delta\chi_{h_3}$  может отражать взаимодействие лиганда с гидрофобной полостью химотрипсина.

Неизвестно, однако, насколько чувствителен кинетический эффект высаливания к различным изменениям в структуре ацильной группы, которые не меняют ее способности связываться в гидрофобной полости активного центра фермента. В целях выяснения этого вопроса в настоящей работе исследовалось влияние солей на скорость деацилирования 3-(2-фурил)акрилоилхимотрипсина (ФА-ХТ). В пользу связывания фурилакрилоильной группы в гидрофобной полости активного центра ФА-ХТ свидетельствуют данные рентгеноструктурного анализа сходного с ним 3-(3-индолил)акрилоилхимотрипсина [3], в котором индольный остаток в кристаллическом ацилферменте был найден в гидрофобной щели.

#### Экспериментальная часть

В работе использовали  $\alpha$ -химотрипсин фирмы «Reanal» (Венгрия). *n*-Нитрофениловый эфир 3-(2-фурил)акриловой кислоты синтезировали при помощи дициклогексилкарбодиимида [4], перекристаллизовывали из этанола; т.пл. 161°C; элементный анализ — рассчитано для C<sub>13</sub>H<sub>9</sub>NO<sub>5</sub>, %: С 60,24; Н 3,50; N 5,40; найдено, %: С 59,98; Н 3,66; N 5,30. NaCl и концентрированные растворы HCl и KOH — о.ч.; NaHCO<sub>3</sub>, KCl и Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> — х.ч. Растворы для кинетических измерений готовили из навески соли и растворов буферных компонентов [5] в би-

дистиллированной воде. Концентрированные растворы солей пропускали через стеклянный фильтр. С каждой солью готовили 4—5 растворов; промежуточные концентрации соли получали смешиванием этих растворов. рН растворов доводили до нужного значения добавлением концентрированных растворов КОН или HCl; рН проверяли также после проведения опытов.

Использовали рН-метр фирмы «Radiometer» (Дания) с каломельным и стеклянным электродами К 4040 и G 2040С соответственно. В показания рН-метра при высоких концентрациях солей вводили поправку по номограмме, приложенной фирмой.

Раствор  $\alpha$ -химотрипсина (150 мг/мл) готовили в 1 мМ HCl и центрифугировали через несколько дней (8000 об/мин, 30 мин) для удаления нерастворившихся примесей. Для получения ФА-ХТ к 1 мл раствора фермента добавляли 20 мг *n*-нитрофенилового эфира 3-(2-фурил)-акриловой кислоты и перемешивали смесь при 20° 12 ч в темноте (чтобы избежать перехода субстрата и ацилфермента в *цис*-форму). Нерастворившуюся часть субстрата отделяли центрифугированием (8000 об/мин, 30 мин), раствор ацилфермента пропускали через колонку (25×1 см) с сефадексом G-25, элюируя 0,1 мМ раствором HCl, и очищали дополнительно диализом против 0,1 мМ HCl (2 раза по 1 л).

Кинетику деацилирования измеряли на спектрофотометре «Beckman UV-5260» по исчезновению ацилфермента при 324 нм. Для этого в кювету вносили 2,70 мл буферного раствора, термостатировали в кюветной камере спектрофотометра, добавляли 0,05 мл раствора ацилфермента, перемешивали и регистрировали уменьшение оптической плотности во времени. Концентрация фермента в опытах была около 10<sup>-5</sup> М.

Полученные кривые псевдомономолекулярной реакции обрабатывали методом нелинейной регрессии с итерированием [6]. Исходное значение для  $k_1$  было найдено методом Рудакова в координатах  $\ln \dot{\Phi}$  от  $\tau$  [7]. Первый порядок реакции соблюдался до степеней гидролиза 90% и более.

### Результаты и их обсуждение

Данные по влиянию KCl, NaCl и Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> на скорость деацилирования ФА-ХТ (табл. 1) обрабатывали с помощью уравнения (1) в виде

$$\lg k_3 = \lg k_3^0 + \sum_{i=1}^3 \Delta \alpha_{h_3, i} c_i + \sum_{i=1}^3 \Delta B_{h_3, i} c_i^2 \quad (2)$$

где  $c_i$  — молярная концентрация  $i$ -й соли (коэффициент корреляции 0,994, стандартное отклонение 0,0093, 32 экспериментальные точки), и сравнивали с параметрами кинетического эффекта высаливания в деацилировании Ц-ХТ и N-ацетил-L-тирозилхимотрипсина (АТ-ХТ), у которого оксифенильное кольцо находится, по всей вероятности, также в гидрофобной полости активного центра фермента (табл. 2).

Оказалось, что значения  $\Delta \alpha_{h_3}$ , полученные с одной и той же солью для разных, но однотипных ацилферментов, совпадают в пределах точности измерения, в то время как при деацилировании ТМАЦ-ХТ, ацильная группа которого не взаимодействует с гидрофобной полостью, значение  $\Delta \alpha_{h_3}$  имеет противоположный знак. Можно заключить, что в значениях этого параметра проявляется взаимодействие ацильной группы с гидрофобной полостью в активном центре фермента и, следовательно, одинаковые коэффициенты кинетического эффекта высаливания

Влияние солей на константы скорости деацилирования 3-(2-фурил)акрилоилхимотрипсина при 25,0 °С и рН 9,80 \*

$c_{\text{соль}}$	$k \cdot 10^3, \text{с}^{-1}$	$c_{\text{соль}}$	$k \cdot 10^3, \text{с}^{-1}$
0	$2,58 \pm 0,01^{**}$		
		KCl	
0,191	$2,84 \pm 0,02$	1,98	$3,71 \pm 0,03$
0,382	$2,95 \pm 0,01$	2,34	$3,67 \pm 0,03$
0,680	$3,09 \pm 0,02$	2,70	$3,74 \pm 0,02$
0,978	$3,20 \pm 0,02$	3,06	$3,94 \pm 0,02$
1,28	$3,32 \pm 0,02$	3,41	$4,02 \pm 0,02$
1,63	$3,51 \pm 0,02$		
		NaCl	
0,245	$2,88 \pm 0,01$	2,44	$4,08 \pm 0,02$
0,490	$3,08 \pm 0,02$	2,92	$4,33 \pm 0,02$
0,735	$3,29 \pm 0,02$	3,41	$4,73 \pm 0,03$
1,14	$3,44 \pm 0,02$	4,00	$5,26 \pm 0,02$
1,55	$3,56 \pm 0,01$	4,58	$5,53 \pm 0,02$
1,95	$3,85 \pm 0,02$	5,17	$6,21 \pm 0,02$
		Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	
0,0951	$2,75 \pm 0,01$	0,786	$3,28 \pm 0,01$
0,198	$2,93 \pm 0,01$	0,979	$3,42 \pm 0,01$
0,393	$3,00 \pm 0,01$	1,17	$3,55 \pm 0,02$
0,589	$3,18 \pm 0,02$	1,36	$3,76 \pm 0,02$

\* Приведены средние значения 3—4 измерений со стандартными отклонениями; рН поддерживали 0,05 М карбонатным буфером [5].

\*\* В [8] для 3-(2-фурил)акрилоилхимотрипсина приведено значение  $k_3$ , равное  $2,4 \cdot 10^{-3} \text{с}^{-1}$  (25 °С, Na-вероналовый буфер,  $\mu=0,2$ ).

могут рассматриваться как доказательство идентичности механизма реакций в этом аспекте. Ранее подобное совпадение  $\Delta k_h$  имело место в щелочном гидролизе ацетилтиохолина и его незаряженного структурного аналога, 3,3-диметилбутилтиоацетата [12], у которых логично предположить сходство механизма реакции (параллельно исследовалось влияние трех солей).

Что касается рассматриваемых ацилферментов, то важно обратить внимание на существенные различия в скоростях их деацилирования:  $k_3$  для АТ-ХТ превышает  $k_3$  для ФА-ХТ почти в  $10^5$  раз, что в большей мере связано с наличием в N-ацетил-L-тирозильном остатке ациламидогруппы, определяющая роль которой в специфичности действия химотрипсина на субстраты хорошо известна (см. обзоры [13, 14]). Таким образом, параметр  $\Delta k_{k_3}$  может «игнорировать» весьма существенное варьирование структуры лиганда, которое вызывает значительное изменение константы скорости реакции. Так как в основе проявления кинетического эффекта высаливания лежат изменения в коэффициентах высаливания реагентов при образовании активированного комплекса (напр., вследствие изменения конформационно-сольватационных свойств активного центра фермента) и включение ациламидогруппы в лиганд не меняет  $\Delta k_{k_3}$ , то можно сделать вывод, что в этой реакции взаимодействие ациламидогруппы с ферментом в ходе образования активированного комплекса не меняется. Взаимодействие же ацильной части субстрата с гидрофобным карманом фермента вносит определенный

Параметры кинетического эффекта высаливания в деацилировании ацилхимотрипсинов, в которых лиганд связывается в гидрофобной полости активного центра фермента \*

Параметры уравнения (1)	Ацилфермент		
	3-(2-фурил) акрилоил-химотрипсин	циннамоил-химотрипсин [1]	N-ацетил-L-тирозил-химотрипсин **
$\lg k_3^0$	$-2,5626 \pm 0,0039$	$-1,8608 \pm 0,0053$	$2,283 \pm 0,014$
	KCl		
$\Delta k_{h_3}$	$0,0774 \pm 0,0073$	$0,0633 \pm 0,0090$	$0,056 \pm 0,014$
$\Delta B_{h_3}$	$-0,0089 \pm 0,0024$	$-0,0066 \pm 0,0028$	—
	NaCl		
$\Delta k_{h_3}$	$0,0778 \pm 0,0048$	$0,0816 \pm 0,0099$	
$\Delta B_{h_3}$	$-0,0022 \pm 0,0010$	$-0,0075 \pm 0,0031$	
	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>		
$\Delta k_{h_3}$	$0,0979 \pm 0,0058$	$0,1283 \pm 0,0243$	
$\Delta B_{h_3}$	—	$-0,0422 \pm 0,0192$	

\* Значения приведены со среднеквадратичными отклонениями. Прочерки означают, что параметр оказался незначимым по *F*-критерию [9].

\*\* Рассчитано из данных [10] по влиянию KCl на реакцию химотрипсина с этиловым эфиром N-ацетил-L-тирозина при pH 8,3; в [11] показано, что  $k_{нат}$  для этой реакции практически равна  $k_3$ . Определенное при pH 8,3 значение  $\Delta k_{нат}$ , по всей вероятности, несколько занижено (см. [1]) по сравнению с истинным  $\Delta k_{h_3}$ .

вклад в коэффициент  $\Delta k_{h_3}$  и, следовательно, это взаимодействие изменяется в ходе образования активированного комплекса, что и «видно» из раствора.

При рассмотрении значений  $\Delta B_{h_3}$  (табл. 2) следует учитывать, что их определение с требуемой точностью возможно только при условии, что измерения проводятся в достаточно широком интервале концентраций солей. С Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> это невозможно из-за выпадения белка в осадок. Исследование влияния KCl на деацилирование АТ-ХТ было проведено в [10] только в интервале концентрации соли от 0,01 до 2 М (5 точек), что исключает возможность определения  $\Delta B_{h_3}$  из этих данных. Различие в величинах  $\Delta B_{h_3}$  с NaCl для ФА-ХТ и Ц-ХТ несколько превышает среднеквадратичные отклонения, но оно не выходит за рамки доверительных интервалов. С KCl значения  $\Delta B_{h_3}$  для этих ацилферментов практически совпадают. Для сравнения можно привести значение  $\Delta B_{h_3}$  с KCl в случае ТМАЦ-ХТ, равное  $0,0112 \pm 0,0028$  [2], т. е. имеющее противоположный знак.

### Выводы

Показано, что значения параметра кинетического эффекта высаливания ( $\Delta k_{h_3}$ ) в деацилировании ФА-ХТ, Ц-ХТ и АТ-ХТ совпадают между собой и вплоть до обращения знака отличаются от  $\Delta k_{h_3}$  в деацилировании ТМАЦ-ХТ. Так как в случае первых трех ацилферментов гидрофобная полость активного центра химотрипсина заполнена лигандом, а в случае ТМАЦ-ХТ она остается свободной, то полученные данные подтверждают предположение, что взаимодействие ацильной группы с гидрофобной полостью в активном центре ацилфермента вносит опре-

деленный вклад в  $\Delta\mu_{H_2}$ . Условием «наблюдаемости» этого взаимодействия из раствора является изменение конформационно-сольватационных свойств активного центра фермента в ходе образования активированного комплекса в реакции деацилирования.

Авторы благодарны М. Панк за синтез субстрата.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. *Paberit, M., Peips, M., Aaviksaar, A.* Salting effects in cinnamoyl-chymotrypsin deacylation. — *Biochim. Biophys. Acta*, 1984, **789**, N 3, 257—265.
2. *Паберит М., Аавиксаар А.* Кинетическое проявление двух форм фермента в деацилировании *p*-N,N,N-триметиламмоний-циннамоилхмотрипсина. — *Изв. АН ЭССР. Хим.*, 1983, **32**, № 4, 273—280.
3. *Henderson, R.* Structure of crystalline chymotrypsin. IV. The structure of indoleacryloyl- $\alpha$ -chymotrypsin and its relevance to the hydrolytic mechanism of the enzyme. — *J. Mol. Biol.*, 1970, **54**, N 2, 341—354.
4. *Bodanszky, M., Vigneaud, V. du.* A method of synthesis of long peptide chains using a synthesis of oxytocin as an example. — *J. Amer. Chem. Soc.*, 1959, **81**, N 21, 5688—5691.
5. *Biochemists' Handbook.* London, 1961, 22—42.
6. *Wilkinson, G. N.* Statistical estimations in enzyme kinetics. — *Biochem. J.*, 1961, **80**, N 2, 324—332.
7. *Рудаков Е. С.* Дифференциальные методы расчета констант скоростей неосложненных химических реакций. — *Кинетика и катализ*, 1960, **1**, № 2, 177—187.
8. *Hamilton, S. E., Zerner, B.* Solvent effects on the deacylation of acyl-chymotrypsins: a critical comment on the charge-relay hypothesis. — *J. Amer. Chem. Soc.*, 1981, **103**, N 7, 1827—1831.
9. *Seydel, J. K., Schaper, K.-J.* Chemische Struktur und biologische Aktivität von Wirkstoffen. Weinheim, 1979, 247—248.
10. *Goldstein, L.* Microenvironmental effects on enzyme catalysis. A kinetic study of polyanionic and polycationic derivatives of chymotrypsin. — *Biochemistry*, 1972, **11**, N 22, 4072—4084.
11. *Berezin, I. V., Kazanskaya, N. F., Klyosov, A. A.* Determination of the individual rate constants of  $\alpha$ -chymotrypsin-catalyzed hydrolysis with the added nucleophilic agent, 1,4-butanediol. — *FEBS Lett.*, 1971, **15**, N 2, 121—124.
12. *Ярв Я. Л., Кесватера Т. А., Аавиксаар А. А.* Высаливание в межионных реакциях. — *Уч. зап. Тартуск. ун-та*, 384. Тр. по химии (химический анализ); X (2). Тарту, 1976, 104—117.
13. *Клёсов А. А., Березин И. В.* Ферментативный катализ. М., 1980, 131—137. 142—144.
14. *Антонов В. К.* Химия протеолиза. М., 1983, 144—146.

Институт химической и биологической физики  
Академии наук Эстонской ССР

Поступила в редакцию  
4/XII 1984

*M. PABERIT, A. AAVIKSAAR*

#### KINEETILINE SOOLAMISEFEKT 3-(2-FURUÜL)AKRÜLOÜÜLKÜMOTRÜPSIINI DEATSÜLATSIOONIL

Artiklis on uuritud KCl, NaCl ja Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> mõju 3-(2-furuül)akrüloüülkümotrüpsiini deatsülatiooni kineetikale 25°C ja pH 9,80 juures. On näidatud, et kineetilise soolamiseefekti parameetri  $\Delta\mu_{H_2}$  väärtused 3-(2-furuül)akrüloüülkümotrüpsiini, tsinnamoüülkümotrüpsiini ja N-atsetüül-L-türosüülkümotrüpsiini deatsülatatsioonil langevad omavahel kokku, samal ajal kui  $\Delta\mu_{H_2}$  *p*-N,N,N-trimetüülammoonium-tsinnamoüülkümotrüpsiini (TMAT-KT) deatsülatatsioonil on vastupidise märgiga. Kuna kolmes esimesena nimetatud atsüülfermendis ligand interakteerub kümotrüpsiini aktiivsentril hüdfoobse piluga, samal ajal kui TMAT-KT-s see pilu jääb vabaks, siis järeldub saadud andmetest, et atsüülrühma interaktsioon fermenti aktiivsentril hüdfoobse piluga annab kindla panuse  $\Delta\mu_{H_2}$ -sse. Selle interaktsiooni jälgitavus lahusest eeldab fermenti aktiivsentril konformatsioonilis-solvatatsiooniliste omaduste muutumist deatsülatatsioonireaktsiooni aktiveeritud kompleksi moodustumisel.

KINETIC SALTING EFFECT IN 3-(2-FURYL)ACRYLOYL-CHYMOTRYPSIN  
DEACYLATION

The influence of KCl, NaCl and Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> on the 3-(2-furyl)acryloyl-chymotrypsin deacylation kinetics at 25 °C and pH 9.80 has been studied. It is shown that the values of the kinetic salting effect parameter  $\Delta\alpha_{h_3}$  coincide for 3-(2-furyl)acryloyl-chymotrypsin, cinnamoyl-chymotrypsin and N-acetyl-L-tyrosyl-chymotrypsin and differ in sign from  $\Delta\alpha_{h_3}$  for *p*-N,N,N-trimethylammonium cinnamoyl-chymotrypsin (TMAC-CT). Since the acyl group in the first three acyl-enzymes interacts with the hydrophobic pocket in the chymotrypsin active site and in TMAC-CT the hydrophobic pocket remains unoccupied, it has been concluded that the interaction of the acyl group with the pocket in the enzyme active site makes a definite contribution to the  $\Delta\alpha_{h_3}$  value. The «visibility» of this interaction from the solution means that the formation of the transition state in deacylation reaction is accompanied by a change in the conformational and/or solvation properties of the enzyme active site.