

LÜHTEATEID * КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ SHORT COMMUNICATIONS

EESTI NSV TEADUSTE AKADEEMIA TOIMETISED. KEEMIA
ИЗВЕСТИЯ АКАДЕМИИ НАУК ЭСТОНСКОЙ ССР. ХИМИЯ
PROCEEDINGS OF THE ACADEMY OF SCIENCES OF THE ESTONIAN SSR. CHEMISTRY

1987, 36, 3

УДК 577.156

В. ТЫГУ, Т. КЕСВАТЕРА, А. ААВИКСААР

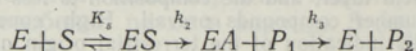
О ВЛИЯНИИ НЕОРГАНИЧЕСКИХ СОЛЕЙ НА РЕАКЦИЮ ТРИПСИНА С КАТИОННЫМИ СУБСТРАТАМИ

V. TOUGU, T. KESVATERA, A. AAVIKSAAR. ANORGAANILISTE SOOLADE MOJUST TRÜPSIINI
REAKTSIOONILE KATIOONSETE SUBSTRAATIDEGA

V. TOUGU, T. KESVATERA, A. AAVIKSAAR. ON THE INFLUENCE OF INORGANIC SALTS
UPON THE REACTION OF TRYPSIN WITH CATIONIC SUBSTRATES

Высокую активность трипсина (КФ 3.4.21.4) по отношению к его специфическим катионным субстратам — производным лизина и аргинина, по сравнению с их неионными аналогами, в литературе (для обзора см. [1]) объясняют взаимодействием катионной боковой цепи аминокислоты специфического субстрата с отрицательно заряженной карбоксильной группой Асп-189 на «дне» гидрофобной полости в активном центре фермента [2-4]. Согласно теории межionных реакций [5], тогда в ацилировании активного центра трипсина под действием специфических катионных субстратов можно ожидать проявления первичного солевого эффекта.

С целью экспериментальной проверки этого предположения в настоящей работе было изучено влияние различных неорганических солей, KCl , KNO_3 , $NaNO_3$, $CsCl$, $LiCl$, NH_4Cl , $CaCl_2$ и $MgCl_2$, на кинетику гидролиза п-нитроанилида N-бензоил-D,L-аргинина (БАПНА) под действием бычьего трипсина. Специальными опытами было установлено, что соли в этой реакции оказывают влияние только на стадию нековалентного связывания субстрата в активном центре фермента. Это позволило изучить действие солей на константу K_s , используя бимолекулярные константы скорости гидролиза, $k_{11} = k_2/K_s$, определяемые из кинетических кривых первого порядка для реакции

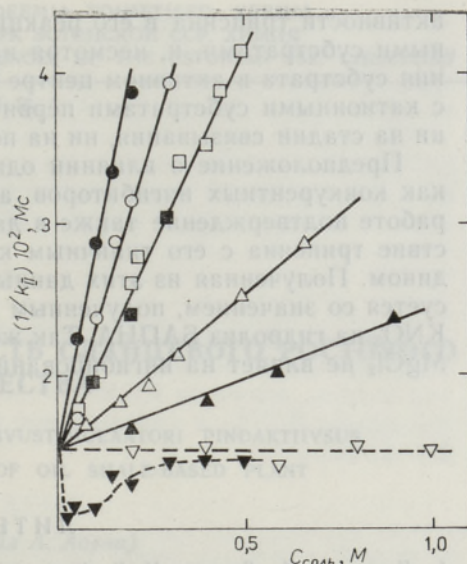


в условиях $[S] \ll K_s$, когда $\frac{dP_1}{dt} = \frac{k_2[E]_0}{K_s}[S]$. Кинетика триптического

гидролиза БАПНА регистрировалась при $\lambda = 405$ нм на спектрофотометре «Векман UV 5260» (США) при температуре $25^\circ C$ и рН 8,3 в 0,05 М растворе *трис*-HCl.

Результаты работы показывают (см. рисунок), что наблюдаемые эффекты не могут быть объяснены влиянием на скорость реакции ионной силы: $MgCl_2$ до одномолярной концентрации не влияет на величину k_{11} ,

Влияние солей на гидролиз п-нитроанилида N-бензоил-D,L-аргинина под действием трипсина при температуре 25 °C и pH 8,3 в 0,05 М *трис*-HCl буферном растворе. ● — CsCl, ○ — NH₄Cl, □ — KCl, ■ — KNO₃, △ — NaNO₃, ▲ — LiCl, ▽ — MgCl₂, ▲ — CaCl₂.



CaCl₂ при низких концентрациях несколько увеличивает скорость гидролиза, но затем его влияние также приближается к нулю, в то время как эффект всех использованных 1,1-электролитов удовлетворительно описывается конкурентным ингибированием гидролиза БАПНА катионами солей согласно уравнению $\frac{1}{k_{II}} = \frac{1}{k_{II}^0} + \frac{1}{k_{II}^0 K_i} [Me^+]$ (конкурентный ха-

рактер ингибирующего эффекта одновалентных катионов в триптическом гидролизе был выяснен в нашей лаборатории также в случае другого субстрата, где $k_2 \ll k_3$, — метилового эфира N-карбобензоксиг-L-аргинина).

Аналогичное предложенному уравнению выражение $\frac{[E]_0}{k} = A + B[I]$,

где k — константа скорости первого порядка, $[I]$ обозначает концентрацию соли, рассматриваемой как обратимый ингибитор фермента, а A и B являются неконкретизированными константами, было использовано в [6] для описания влияния NH₄Cl на триптический гидролиз бензоил-аргининамида.

Прямые через экспериментальные точки по зависимости $\frac{1}{k_{II}} \equiv \frac{K_s}{k_2}$

от $C_{\text{соль}}$ для 1,1-электролитов на рисунке проведены, исходя из значений $k_{II}^0 = 66,9 \pm 0,6 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$, $K_{i, \text{Cs}^+} = 0,118 \pm 0,007 \text{ M}$ (CsCl), $K_{i, \text{NH}_4^+} = 0,18 \pm 0,01 \text{ M}$ (NH₄Cl), $K_{i, \text{K}^+} = 0,28 \pm 0,01 \text{ M}$ (KCl и KNO₃), $K_{i, \text{Na}^+} = 0,72 \pm 0,05 \text{ M}$ (NaNO₃) и $K_{i, \text{Li}^+} = 1,5 \pm 0,2 \text{ M}$ (LiCl), полученных в результате статистической обработки данных методом последовательных приближений [7] на основе рабочего уравнения

$$\lg k_{II} = \lg k_{II}^0 - \lg \left(1 + \sum_{j=1}^5 \frac{[Me^+]_j}{K_{i,j}} \right),$$

где $[Me^+]_j$ является концентрацией j -го катиона ($n=30$, $r=0,991$, $s=0,0184$).

Таким образом, из представленных данных вытекает, что неорганические катионы являются конкурентными обратимыми ингибиторами

активности трипсина в его реакциях со специфическими аминокислотными субстратами, и, несмотря на анионный характер центра связывания субстрата в активном центре этого фермента, в его взаимодействии с катионными субстратами первичный солевой эффект не проявляется ни на стадии связывания, ни на последующей стадии ацилирования.

Предположение о влиянии одновалентных неорганических катионов как конкурентных ингибиторов активности трипсина нашло в нашей работе подтверждение также в данных по влиянию KCl на взаимодействие трипсина с его типичным конкурентным ингибитором — бензамидином. Полученная из этих данных величина $K_{i, K^+} = 0,28$ хорошо согласуется со значением, полученным из анализа данных по влиянию KCl и KNO_3 на гидролиз БАПНА. Так же, как и в случае субстратной реакции, $MgCl_2$ не влияет на ингибирование трипсина бензамидином.

ЛИТЕРАТУРА

1. Клесов А. А., Березин И. В. Ферментативный катализ, I. М., 1980, 165—177.
2. Blow, D. M., Steitz, T. A. X-Ray diffraction studies of enzymes. — *Ann. Rev. Biochem.*, 1970, 39, 63—100.
3. Krieger, M., Kay, L. M., Stroud, R. M. Structure and specific binding of trypsin: comparison of inhibited derivatives and a model for substrate binding. — *J. Mol. Biol.*, 1974, 83, 209—230.
4. Marquart, M., Walter, J., Deisenhofer, J., Bode, W., Huber, R. The geometry of the reactive site and of the peptide groups in trypsin, trypsinogen and its complexes with inhibitors. — *Acta crystallogr.*, 1983, B39, 480—490.
5. Гаммет Л. Основы физической органической химии. М., 1972, 240—281.
6. Forrest, W. W., Gutfreund, H., Sturtevant, J. M. The effect of ionic strength on the heat of hydrolysis of benzoyl-L-arginine amide. — *J. Amer. Chem. Soc.*, 1956, 78, 1349—1352.
7. Wilkinson, G. N. Statistical estimations in enzyme kinetics. — *Biochem. J.*, 1961, 80, 324—332.

Институт химической и биологической физики
Академии наук Эстонской ССР

Поступила в редакцию
13/II 1987