



УДК 577.152.34*211'102/104

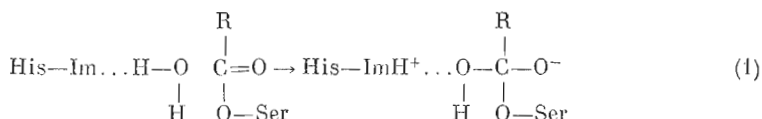
КОНФОРМАЦИОННО-АДИАБАТИЧЕСКИЙ ПРОЦЕСС ДЕЗАЦИЛИРОВАНИЯ N-АЦЕТИЛ-L-ТИРОЗИЛ- α-ХИМОТРИПСИНА

Хоштария Д. Э., Гогоадзе Н. Г.

*Институт неорганической химии и электрохимии
Академии наук ГССР, Тбилиси*

Изучено влияние вязкости раствора на кинетические параметры реакции гидролиза этилового эфира N-ацетил-L-тирозина α-химотрипсином в растворах сахарозы (концентрации 0–50 вес.%) при 25° С. В широкой области значений вязкости (1–15 мПа·с) константа скорости реакции k_{cat} практически не меняется. Кажущаяся константа Михаэлиса K_m обнаруживает минимум при $\eta \sim 3$ мПа·с. Сделано заключение о конформационно-адиабатическом характере лимитирующей скорости реакции стадии — дезацилирования N-ацетил-L-тирозил-α-химотрипсина. Полученные результаты сопоставлены с аналогичными данными, имеющимися в литературе.

Скорость реакции гидролиза специфического сложноефирного субстрата, этилового эфира N-ацетил-L-тирозина (Ac-Tyr-OEt), α-химотрипсином (КФ 3.4.21.1) лимитируется первой ступенью стадии дезацилирования — процессом образования тетраэдрического аддукта, сопровождающимся переносом заряда от имидазольной группы His-57 на карбонильный кислород субстрата, ацилировавшего Ser-195 [1]:



Данный процесс, протекающий в одном химическом акте, можно представить как движение реакционной системы вдоль ряда координат реакции [2]. Роль координат реакции, связанных с элементарными химическими превращениями: переносом протона [3, 4] и нуклеофильным присоединением к карбонильной группе [2, 5, 6] — была рассмотрена ранее. Значительный интерес представляет также выявление роли конформационной динамики белковой макромолекулы (т. е. роли конформационной координаты реакции) в ферментативном процессе (1).

Общий теоретический подход для анализа изменения конформационных состояний в биохимических процессах был предложен Догонадзе, Кузнецовым и Ульstrupом [7, 8] на базе фундаментальной теории элементарного акта химических реакций. Процессы, скорость которых непосредственно определяется движением вдоль конформационной координаты, были названы конформационно-неадиабатическими, а процессы, где скорость определяется химическими превращениями, — конформационно-адиабатическими. Согласно данным [7, 8], надежным критерием адиабатичности по отношению к конформационным изменениям для ферментативного процесса является наличие существенного первичного кинетического изотопного эффекта. Известно, что для рассматриваемого процесса характерен первичный кинетический изотопный эффект водорода ~ 3 [1, 3]*. В пользу конформационно-адиабатического механизма процесса (1) свидетельствуют также имеющиеся структурные данные. Так, согласно результатам рентгеноструктурного анализа α-химотрипсина и его

* Наличие первичного кинетического изотопного эффекта водорода свидетельствует о неадиабатичности процесса по отношению к переносу протона [7, 8].

комплексов с субстратоподобными ингибиторами [9], структурные изменения фермент-субстратного комплекса (ФСК), сопровождающие химические превращения, малы и имеют локальный характер. А из результатов теоретического конформационного анализа комплексов α -химотрипсина со специфическими сложноэфирными субстратами следует, что эти структурные изменения протекают легко и не связаны с преодолением ощутимых конформационных энергетических барьеров [10]. Полагаем, что сделанное выше предположение о характере процесса (1) требует подтверждения и другими методами исследования.

Полезную информацию о роли конформационной динамики белковой макромолекулы в ходе элементарного биохимического превращения может дать изучение влияния изменения вязкости среды на кинетические параметры реакции. Ранее для процессов с участием карбоксипептидазы (для лимитирующей скорости стадии [11]) и миоглобина (для ряда элементарных стадий [12]) была обнаружена существенная зависимость констант скоростей от вязкости раствора. Эти результаты были интерпретированы как свидетельство зависимости протекания элементарных процессов от конформационной перестройки белково-водного окружения реакционных центров. С учетом наличия для этих белков структурных данных о значительных функциональных конформационных изменениях [13, 14] соответствующие процессы с их участием можно отнести к конформационно-неадиабатическим.

В настоящей работе при помощи метода изменения вязкости среды в системе α -химотрипсина — Ac-Tyr-OEt (в кинетическом режиме) исследована роль конформационной динамики белка в лимитирующем скорости гидролиза Ac-Tyr-OEt процессе (1) и путем сопоставления полученных данных с аналогичными литературными данными [11, 12] сделана попытка их обобщения на феноменологическом уровне на основе представлений, развитых в работах [7, 8].

Вязкость среды варьировали использованием 20, 30, 35, 40, 43, 45 и 50%-ных (по весу) водных растворов сахарозы. На рис. 1 изображена зависимость константы скорости реакции гидролиза Ac-Tyr-OEt α -химотрипсина (k_{cat}) от вязкости раствора. Соответствующие значения вязкости взяты из работы [15] (влиянием малых добавок KCl, ацетонитрила, а также реагирующих веществ пренебрегали). Из рис. 1 видно, что в весьма широкой области значений вязкости среды величина параметра k_{cat} практически не меняется. Величина кажущейся константы Михаэлиса K_m при повышении вязкости сначала довольно резко уменьшается, а затем медленно возрастает, обнаруживая минимум при $\eta \sim 3$ мПа·с (рис. 2).

Отметим, что растворы сахарозы, являясь одними из самых вязких жидкостей, в то же время не оказывают побочного влияния на исследуемую реакцию. Конкуренция молекул сахарозы с молекулами воды в качестве нуклеофильных агентов в процессе (1) непременно привела бы к уменьшению измеряемой скорости гидролиза, пропорциональному концентрации сахарозы [16]. Отсутствие такой конкуренции можно объяснить стерическим эффектом объемистой молекулы сахарозы. К тому же эта молекула отличается довольно высокой полярностью, тогда как для эффективно действующих нуклеофилов относительно больших размеров необходимо наличие гидрофобного участка связывания [4, 16]. Изменение полярных свойств среды при добавлении больших количеств сахарозы не должно влиять на энергию активации реакции, поскольку для процесса типа (1) она определяется главным образом энергией сближения молекулы воды к карбонильной группе и в меньшей степени — энергией реорганизации среды [2, 5]. Уменьшение концентрации воды в растворах сахарозы не влияет также на константу скорости. Действительно, если для константы связывания воды в активном центре α -химотрипсина принять величину $K_{H_2O} \sim 1$ М, то даже в 50%-ном растворе имеем $[H_2O] \gg K_{H_2O}$, т. е. имеет место насыщение по H_2O .

Теперь рассмотрим поведение константы K_m . Как было показано ранее [3, 4], ее изменения в первую очередь (особенно при неизменной

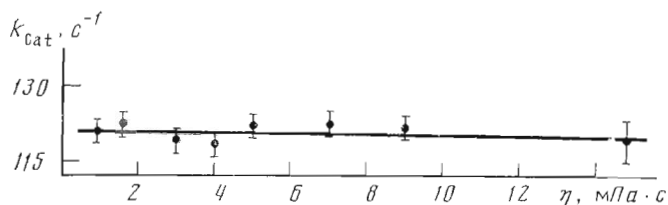


Рис. 1. Зависимость константы k_{cat} реакции гидролиза Ас-Тур-ОЕт α -химотрипсина от вязкости раствора

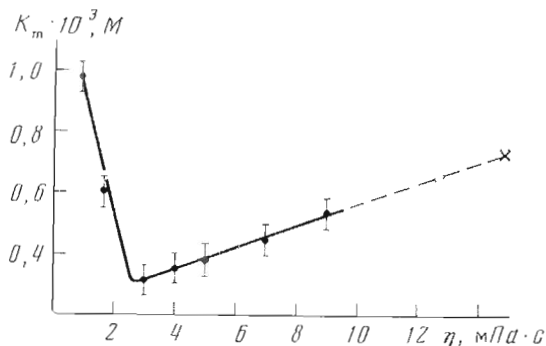


Рис. 2. Зависимость K_m реакции гидролиза Ас-Тур-ОЕт α -химотрипсина от вязкости раствора

k_{cat}) связаны с изменениями константы диссоциации ФСК K_s , которые могут быть обусловлены в основном следующими факторами. Во-первых, при добавлении полярных молекул сахарозы должно усилиться гидрофобное взаимодействие соответствующих фрагментов фермента и субстрата, что приводит к уменьшению K_s и соответственно K_m . Во-вторых, при увеличении концентрации сахарозы ее объемистые молекулы в результате взаимодействия с заряженными поверхностными группами фермента могут расположиться в районе места сорбции субстрата, что должно вызывать ухудшение связывания и увеличение K_s и K_m . Появление минимума на графике зависимости K_m от η можно объяснить наложением этих двух факторов.

Таким образом, результат данной работы, а именно отсутствие специфической зависимости константы скорости исследованной реакции от вязкости среды, согласуется со структурными данными и данными по кинетическим изотопным эффектам и свидетельствует в пользу конформационно-адиабатического механизма стадии дезацилирования N-ацетил-L-тирозил- α -химотрипсина. В то же время недавно в работе [17] в рамках модифицированной экстракционной модели ферментативного катализа было сделано заключение о существенном влиянии конформационно-сольватационных эффектов на энергию активации стадий ацилирования и дезацилирования данной реакции. Можно было думать, что два феноменологических подхода приводят к противоположным выводам, однако противоречие устраняется при более подробном рассмотрении конформационной динамики. Согласно Догондзе и др. [7, 8], конформационное состояние ФСК можно представить потенциальной поверхностью типа, изображенного на рис. 3, где Q — обобщенная конформационная координата. Третьичная структура комплекса, флуктуируя, совершает квазидиффузионное движение вдоль Q , которое может привести к переходу в другое конформационное состояние (рис. 4; см. также [18, 19]). Адиабатичность по отношению к конформационным изменениям означает, что характерное время движения реакционной системы вдоль конформационной координаты много меньше характерного времени движения вдоль химических координат реакции. Флуктуационные изменения конформационного состояния ФСК, происходящие в рамках глобальной конформации около равновесного положения Q_0 (рис. 3), «мягко» следуют за химическим про-

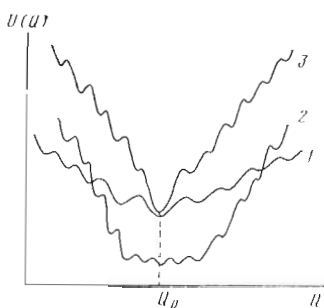


Рис. 3

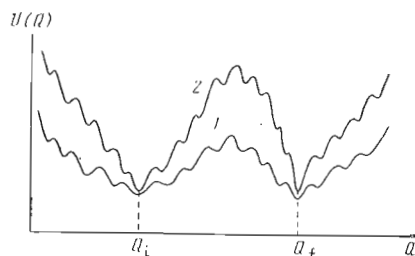


Рис. 4

Рис. 3. Схематическое изображение потенциальной поверхности ФСК в пределах одной глобальной конформации: в стандартном (1) и стабилизированном (2, 3) состояниях (см. текст)

Рис. 4. Схематическое изображение потенциальной поверхности крупномасштабного конформационного перехода ФСК: в стандартных условиях (1) и при повышенной вязкости среды (2). Q_i , Q_f — равновесные значения Q в начальном и конечном состояниях процесса

цессом, обеспечивая флуктуационное подготавливание энергетического барьера собственно химического превращения. Другими словами, в рассматриваемом случае конформационные изменения хотя и происходят в лимитирующей скорости стадии и существенным образом определяют свободную энергию активации (энтальпию и энтропию активации), однако их характерные времена в константу скорости процесса не входят. Отсюда и нечувствительность k_{cat} к изменениям этих времен при повышении вязкости среды (подробнее см. [20]).

Можно было бы попытаться объяснить постоянство k_{cat} в нашем эксперименте той же причиной, которая рассматривалась при исследовании влияния различных ионов [21, 22], — недоступностью активного центра ацилхимотрипсина для молекул сахарозы. Однако следует учесть, что белок и окружающая его среда составляют единую флуктуирующую систему и увеличительные вязкости раствора, ограничение в нем поступательной и ориентационной диффузии непременно должно отразиться на подвижности различных групп и фрагментов белковой молекулы, даже существенно удаленных от поверхности глобулы [11, 12]. Таким образом, вопрос о кинетическом проявлении изменения конформационной подвижности фермента является достаточно общим и требует специального рассмотрения. С учетом вышеизложенного метод изменения вязкости среды можно рекомендовать как тест для выявления роли конформационной динамики белка в относительно мало изученных биохимических процессах.

Используя представление о потенциальных конформационных поверхностях, можно проиллюстрировать наблюдавшиеся ранее эффекты стабилизации активной конформации фермент-субстратного комплекса α -химотрипсина при иммобилизации и повышении ионной силы раствора [23—25]. В первом случае стабилизация приводит к некоторому искажению потенциальной поверхности (рис. 3, поверхность 2) по сравнению с исходным состоянием (поверхность 1), что сопровождается уменьшением каталитической константы (за счет статистического фактора — энтропии активации) и ухудшением связывания. Во втором случае (поверхность 3) стабилизация приводит к противоположному результату, по-видимому, благодаря ограничению нефункциональных флуктуаций. Отметим, что в случае конформационно-неадиабатического процесса, как это следует из рис. 4 (поверхность 2), стабилизация фермента любым способом привела бы к уменьшению константы скорости в основном за счет увеличения энергии активации конформационного перехода. Из рис. 4 также видно, что влияние повышенной вязкости среды на конформационно-неадиабатический процесс можно рассматривать фактически как стабилизирующее влияние, имеющее неспецифический, общий для процессов данного типа, характер.

Экспериментальная часть

В работе использовали α -химотрипсин, 3 раза перекристаллизованный (Sigma, США; относительная активность, оцененная по константе скорости, составляла $\sim 60\%$); Ас-Тур-ОEt (Reanal, ВНР); КОН (Chemapol, ЧССР); сахарозу, ос. ч.; KCl, ч.д.а.; ацетонитрил, х.ч., перегнаный (Союзреактив, СССР).

Кинетические измерения проводили на автоматической титрационной установке RTS-822 (Radiometer, Дания) в режиме рН-стагирования (рН 8,5; 25°C). Методика кинетических измерений описана нами ранее [3]. Состав рабочего раствора (5 мл) в ячейке: дистиллированная вода, сахароза (0–50 вес. %), 0,1 М KCl, ацетонитрил (2,0 об. %), Ас-Тур-ОEt (0,5–50 мМ), 10^{-7} М α -химотрипсин.

Значения кинетических параметров k_{cat} и K_m определяли графически по методу Лайнуивера — Берка [1] для 3–4 значений концентраций субстрата. Экспериментальные точки на рис. 1, 2 представляют средние значения, полученные из 2–5 серий экспериментов. Показана также величина разброса точек (в среднем $\sim 5\%$ для k_{cat} и $\sim 15\%$ для K_m).

При концентрациях сахарозы свыше 45 вес. % не удается аккуратно замерить скорости реакции, особенно при низких и высоких концентрациях субстрата, по-видимому, из-за повышенной буферной емкости растворов. При концентрации сахарозы 50% величину K_m оценили путем экстраполяции до значения $\eta = 14,8$ мПа·с и, определив скорость гидролиза при концентрации субстрата 25 мМ, получили соответствующее значение k_{cat} с несколько большим разбросом (рис. 1, 2).

Авторы выражают благодарность чл.-кор. АН ГССР Р. Р. Догонадзе (Институт неорганической химии и электрохимии АН ГССР) и д-ру хим. н. Л. И. Кришталлику (Институт электрохимии АН СССР, Москва) за интерес к работе и ценные предложения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Антонов В. К. Химия протеолиза. М.: Наука, 1983, с. 113–273.
2. Хоштария Д. Э., Кришталлик Л. И. Изв. АН СССР. Сер. хим., 1984, № 8, с. 1727–1734.
3. Хоштария Д. Э., Тополев В. В., Кришталлик Л. И. Биоорган. химия, 1978, т. 4, № 10, с. 1341–1351.
4. Хоштария Д. Э. Биоорган. химия, 1978, т. 4, № 12, с. 1673–1677.
5. Хоштария Д. Э. Биофизика, 1984, т. 29, № 5, с. 740–743.
6. Khoshtariya D. E. 4-th International symposium on homogeneous catalysis (Abstracts). V. 2. Leningrad, 1984, p. 47–48.
7. Dogonadze R. R., Kaznetsov A. M., Ulstrup J. J. Theor. Biol., 1977, v. 69, № 2, p. 239–263.
8. Догонадзе Р. Р., Кузнецова А. М. Итоги науки и техники. Кинетика и катализ. Т. 5. М.: ВИНТИ, 1978, с. 189–214.
9. Blow D. M. Accounts Chem. Res., 1976, v. 9, № 2, p. 145–152.
10. Попов Е. М. Молекулярн. биология, 1977, т. 11, № 1, с. 5–41.
11. Gavish B., Verber M. M. Biochemistry, 1979, v. 18, № 7, p. 1269–1275.
12. Beece D., Eisenstein L., Frauenfelder H., Good D., Marden M. C., Reinisch L., Reynolds A. H., Sorensen M. C., You K. T. Biochemistry, 1980, v. 19, № 23, p. 5147–5157.
13. Johansen J. T., Klyosov A. A., Vallec B. L. Biochemistry, 1976, v. 15, № 2, p. 296–303.
14. Alberding N., Cahn S. S., Eisenstein L., Frauenfelder H., Good D., Gunsalus I. C., Nordlund T. M., Perutz M. F., Reynolds A. H., Sorensen L. B. Biochemistry, 1978, v. 17, № 1, p. 43–51.
15. Справочник химика. Т. 3. М.: Химия, 1984, с. 725.
16. Березин И. В., Газанская Н. Ф., Класов А. А. Биохимия, 1971, т. 36, № 1, с. 108–117.
17. Dorovska-Taran V., Momtcheva R., Gulubova N., Martinek K. Biochim. et biophys. acta, 1982, v. 702, № 1, p. 37–53.
18. Careri G., Fasella P., Gratton E. CRC Crit. Rev. Biochem., 1975, v. 3, № 1, p. 141–164.
19. Gurd F. R. N., Rothgeb T. M. Adv. Protein Chem., 1979, v. 33, № 1, p. 73–91.
20. Хоштария Д. Э. Биофизика, 1986, т. 31, № 1.
21. Мартинек К., Вилль Х., Стрельцова Э. А., Березин И. В. Молекулярн. биология, 1969, т. 3, № 4, с. 554–565.

22. Мартинек К., Яцимирский А. К., Березин И. В. Молекулярн. биология, 1971, т. 5, № 1, с. 96—109.
23. Хосhtarия Д. Э., Тополев В. В., Кришталик Л. П., Рейзер И. Л., Торчилин В. П. Биоорган. химия, 1979, т. 5, № 8, с. 1243—1247.
24. Хосhtarия Д. Э., Тополев В. В. Биоорган. химия, 1980, т. 6, № 3, с. 455—460.
25. Хосhtarия Д. Э., Тополев В. В. Конформационные изменения биополимеров в растворах (тезисы 5-го совещания). Тбилиси, 1980, с. 83.

Поступила в редакцию

2.I.1985

После доработки

10.VI.1985

CONFORMATIONALLY-ADIABATIC PROCESS OF DEACYLATION OF N-ACETYL-L-TYROSILE- α -CHYMOTRYPSIN

KHOSHTARIYA D. E., GOGUADZE N. G.

*Institute of Inorganic Chemistry and Electrochemistry, Academy
of Sciences of the Georgian SSR, Tbilisi*

In aqueous solutions of sucrose of various concentrations (0–50% w/w) the influence of solvent viscosity on kinetic parameters of α -chymotrypsin-catalyzed hydrolysis of the ethyl ester of N-acetyl-L-tyrosine has been studied at 25°C. In a wide range of viscosities (1–15 mPa·s) the catalytic constant k_{cat} of the reaction is not changed. The dependence of the apparent Michaelis constant K_M has the minima at $\eta \sim 3$ mPa·s. On the basis of theoretical approach developed by Dogonadze et al. it was concluded that the rate-limiting step, deacylation of N-acetyl-L-tyrosile- α -chymotrypsin, has a conformationally-adiabatic nature. The results obtained are compared with earlier data.