



УДК 577.15.02.025
© 1991 г.

Ю. И. Хургин, Е. Ю. Максарева

ИЗУЧЕНИЕ ТВЕРДОФАЗНЫХ ФЕРМЕНТАТИВНЫХ РЕАКЦИЙ III. * НЕОБРАТИМАЯ ИНАКТИВАЦИЯ α -ХИМОТРИПСИНА БЕНЗИЛСУЛЬФОНИЛФТОРИДОМ

Институт органической химии им. Н. Д. Зелинского АН СССР, Москва

В твердой смеси α -химотрипсина ** и его ингибитора — бензилсульфонилфторида (PMSF) в отсутствие растворителя происходит необратимая инактивация ферментативной активности, если степень гидратации белка (H) превышает критическое значение $H_{кр} = 127$ моль H_2O /моль E, которое близко к соответствующей величине для твердофазного гидролиза *n*-нитроанилида *N*-сукцинил-*L*-фенилаланина (SPPNA). Форма изотермы твердофазной инактивации химотрипсина подтверждает наличие фазового перехода в молекуле фермента при $H_{кр}$ и показывает, что основная масса (~75%) химотрипсина в твердой фазе активна, но неоднородна по отношению к величине гидратации, необходимой для включения каталитической активности.

Реализация белками их физиологической функции, в том числе и ферментативной, обычно происходит в жидкой фазе в присутствии большого избытка воды. В ферментативных реакциях гидролиза, катализируемых сериновыми и тирозиновыми протеиназами, вода необходима как субстрат на стадии гидролиза ацилферментного соединения (деацилирования). На остальных стадиях ферментативной реакции (связывание субстрата, десорбция продуктов реакции, ацилирование нуклеофильной группы активного центра) влияние воды может быть лишь косвенным и проявляться в процессах формирования функционально активной конформации белка и индукции внутримолекулярной динамики. С этим положением согласуются полученные нами ранее данные о твердофазных ферментативных реакциях, катализируемых химотрипсином в отсутствие воды как растворителя [1, 2]. Например, твердофазный гидролиз циннамонилхимотрипсина требует определенной степени гидратации (H), которая должна быть не ниже некоторой величины $H_{кр}$ [2], существенно меньшей, чем максимальная величина гидратации химотрипсина, как в атмосфере насыщенных паров воды, так и в водном растворе ($H_{макс} \cong 500$ моль H_2O /моль E) [3]. В данной реакции вода выступает в качестве субстрата, и поэтому наличие косвенных эффектов гидратации должно быть подтверждено независимо.

Было показано, что катализируемый химотрипсином гидролиз низкомолекулярного субстрата — *n*-нитроанилида *N*-сукцинил-*L*-фенилаланина (SPPNA) — также происходит в твердой фазе при достаточной степени гидратации белка ($H_{кр} = 142$ моль H_2O /моль белка) [1]. За реакцией следили по выделению продукта первой химической стадии ферментативной реакции (*n*-нитроанилина), протекающей без участия воды как субстрата. В этом случае непосредственно проявились косвенные эффекты воды на стадии ацилирования. Позднее была обнаружена способность молекулы химотрипсина осуществлять в твердой фазе большое число оборотов [4], так что рассмотренные косвенные эффекты гидратации могли проявляться многократно. Однако оставалось неясным, какая часть пре-

* Сообщение II см. [1].

** Далее химотрипсин — α -химотрипсин. Сокращения: PMSF — бензилсульфонилфторид, SPPNA — *n*-нитроанилид *N*-сукцинил-*L*-фенилаланина, DMSO — диметилсульфоксид.

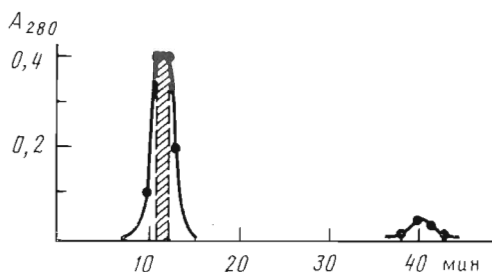


Рис. 1. Разделение продуктов реакции PMSF с химотрипсином на сефадексе LH-20 в DMSO. Заштрихована выделяемая фракция фермента

парата фермента принимала участие в твердофазной реакции и не проходила ли наблюдаемая твердофазная реакция многократно в отдельных малых объемах образца с повышенным содержанием воды.

В настоящей работе для выявления деталей косвенного влияния гидратации на активность фермента в маловодных условиях нами изучена твердофазная реакция химической модификации химотрипсина под действием PMSF. Этот широко распространенный ингибитор сериновых протеиназ необратимо инактивирует химотрипсин в водной среде путем сульфонирования β -гидроксигруппы остатка Ser¹⁹⁵ активного центра фермента, что в известном смысле моделирует стадию ацилирования фермента. Реакция химотрипсина с PMSF в растворе проходит относительно медленно [5], так что за время (≤ 5 мин), необходимое для приготовления смеси фермент — ингибитор и ее замораживания перед лиофилизацией, не наблюдается заметной инактивации (более чем на 1—2%) фермента. Для лиофилизации использовали растворы с молярным соотношением химотрипсина и PMSF 1 : 2 при pH 7,8. В ходе опытов лиофилизованные препараты выдерживали при разных значениях относительного давления паров воды p/p_s не менее 170 ч. Этого времени было достаточно для достижения предельного выхода инактивации, увеличение времени выдерживания вдвое не вызывало изменений в системе. За глубиной реакции следили по остаточной активности фермента, измеряемой по методу Шверта и Такенака [6].

Нами была предложена методика анализа, в ходе которого не происходит дополнительной инактивации химотрипсина по сравнению с той, которая достигается в твердой фазе. Для разработки такой методики мы воспользовались растворимостью химотрипсина, PMSF и продуктов реакции в DMSO и тем, что в этой среде не происходит ни химической модификации фермента ингибитором, ни реакций, катализируемых химотрипсином. Для определения остаточной активности химотрипсина непрореагировавший PMSF отделяли с помощью гель-хроматографии на сефадексе LH-20 в DMSO. Типичный график разделения смеси приведен на рис. 1. Методом ВЭЖХ было показано отсутствие бензисульфокислоты в продуктах твердофазной инактивации фермента, что свидетельствует об устойчивости бензисульфонилхимотрипсина в ходе эксперимента. Для устранения возможного влияния солей [1] на процесс инактивации был использован летучий буфер (NH_4HCO_3), компоненты которого полностью удалялись в ходе лиофилизации.

На рис. 2 (кривая 1) показана зависимость степени стационарной твердофазной инактивации $I = (A_0 - A)/A_0$ (A_0 — исходная, а A — остаточная активность фермента) от p/p_s . Рассмотрение представленных данных позволяет выявить основные особенности реакции химотрипсина с PMSF: 1) при давлении паров воды $p/p_s \leq 0,4$ препарат фермента стабилен, инактивация не наступает даже при очень длительном (до 500 ч) выдерживании реакционной смеси; 2) необратимое падение активности препарата вследствие модификации активного центра фермента происходит только при $p/p_s > 0,4$, причем степень инактивации резко возрастает с ростом p/p_s ; экстраполяция линейного участка изотермы к оси абсцисс ($I = 0$) дает значение критической точки $(p/p_s)_{кр} = 0,44$ ($r = 0,94$, $\sigma = 0,03$);

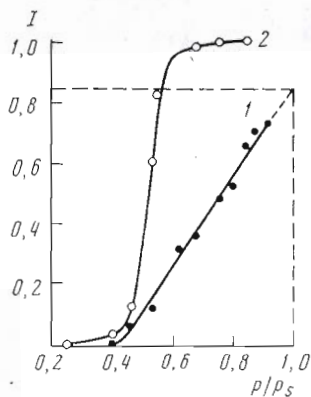


Рис. 2

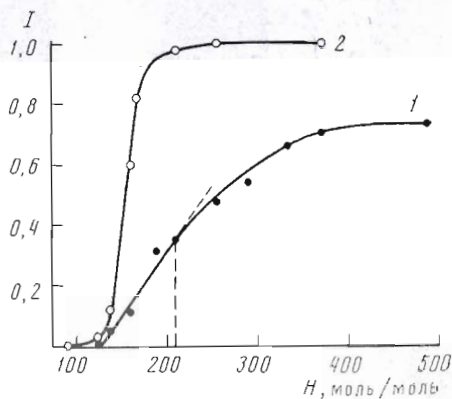


Рис. 3

Рис. 2. Зависимость предельного выхода (в отн. ед.) твердофазных реакций химотрипсина от относительного давления паров воды p/p_s : 1 — инактивация бензилсульфонилфторидом, 2 — гидролиз *n*-нитроанилида *N*-сукцинил-*L*-фенилаланина

Рис. 3. Зависимость предельного выхода (в отн. ед.) твердофазных реакций химотрипсина от степени гидратации белка H (моль/моль): 1 — инактивация бензилсульфонилфторидом, 2 — гидролиз *n*-нитроанилида *N*-сукцинил-*L*-фенилаланина

3) наибольшее экспериментальное значение степени инактивации $I = 0,73$ получено при $p/p_s = 0,92$, экстраполяция линейного участка изотермы инактивации к значению $p/p_s = 1,0$ дает максимально ожидаемую степень инактивации $I_{\text{макс}} = 0,85$.

Из полученных данных следует, что, как и для реакции твердофазного гидролиза SPPNA [1], для осуществления реакции инактивации химотрипсина в твердой фазе в отсутствие воды как растворителя необходима определенная степень гидратации белка. Рост предельной степени инактивации химотрипсина с увеличением давления паров воды над препаратом показывает, что при достижении заданного значения p/p_s происходит включение активности только определенной фракции молекул фермента, которые еще оставались неактивными при более низких значениях p/p_s . Последовательное увеличение числа активных молекул фермента (рис. 2) происходит вплоть до самых больших значений p/p_s . Следовательно, в лиофилизированном препарате химотрипсина имеется практически постоянное распределение молекул фермента по степени «подготовленности» к проявлению каталитической активности в зависимости от гидратации. Мгновенное распределение такого типа, вероятно, имеет место и в растворе [7], однако время жизни каждого из состояний в жидкой фазе по сравнению с маловодными условиями очень мало.

В реакции сульфонилирования гидроксильной группы остатка Ser¹⁹⁵ активного центра фермента не требуется участия воды. Поэтому характер зависимости $I(p/p_s)$ должен определяться только косвенными эффектами гидратации: воздействием на формирование каталитически активной структуры белка, ее динамику, а также на скорость диффузии ингибитора к активному центру фермента. Практическое совпадение значений $(p/p_s)_{\text{кр}}$ для реакций с двумя различными лигандами (для твердофазного гидролиза SPPNA $(p/p_s)_{\text{кр}} = 0,48$ [1], рис. 2, 2) показывает, что гидратация в первую очередь влияет на состояние равновесной структуры белка.

Следует отметить, что наклон изотермы ингибирования химотрипсина оказался по крайней мере в 4 раза меньшим, чем наклон изотермы гидролиза SPPNA (рис. 2, 1, 2). Существенно меньшая эффективность химотрипсина в реакции ингибирования по сравнению с реакцией гидролиза SPPNA обусловлена, вероятно, тем, что в первом случае процесс прекращается на середине первого оборота, а во втором активный центр фермента способен совершать большое число оборотов. В результате необратимой инактивации происходит истощение потенциально активного химотрипсина, что приводит к увеличению времени пробега молекул ингибитора к ак-

тивными центрами фермента. В то же время молекулы химотрипсина, активированные при $p/p_s \leq 0,7$, за счет большого числа оборотов проводят полное превращение субстрата.

Полученное экстраполяцией линейного участка изотермы значение $I_{\max} = 0,85$ свидетельствует о том, что в твердой фазе потенциально активна основная масса препарата химотрипсина, а не только его малая часть. Однако $\sim 15\%$ фермента остаются немодифицированными и после длительного выдерживания в почти насыщенных парах воды. Наличие этой фракции можно объяснить таким образом: известно, что даже в растворе в области максимальной активности химотрипсина (рН 7,8) не все молекулы фермента реакционноспособны, при этом мгновенное количество неактивного материала составляет 10—15% за счет протонизации остатка His³⁷ или депротонизации α -аминогруппы Ile¹⁶ [7]. Можно предположить, что распределение между активной и неактивной фракциями существенно не меняется при лиофилизации. Этому предположению соответствуют результаты определения I_{\max} для препаратов, полученных из растворов с более низким рН. Так, I_{\max} для химотрипсина, лиофилизованного из раствора с рН 6, снижается до 37%, так же, как почти вдвое снижается содержание активных молекул фермента в растворе при изменении рН от 8,0 до 6,0. Наряду с этим в твердой фазе может в некоторой степени происходить реактивация ингибированного химотрипсина. Однако реактивация становится заметной только при существенно большем времени проведения опыта.

На рис. 3 (кривая 1) приведена зависимость глубины инактивации химотрипсина от количества связанной воды, построенная на основании изотермы гидратации $H(p/p_s)$ [3] и данных рис. 2. Анализ изотермы гидратации с помощью уравнения Брунауэра — Эммета — Теллера (БЭТ) [3] позволил определить число первичных центров гидратации. Было показано, что из 500 молекул воды, образующих полную гидратную оболочку молекулы химотрипсина, 72 молекулы связаны наиболее прочно. Как видно из рис. 3, твердофазная инактивация фермента происходит в том случае, если степень гидратации превышает 127 молекул воды на молекулу белка, т. е. при почти двукратном заполнении центров гидратации ($\sim 1,8$). Эта точка также близка к критической точке гидратации для гидролиза SPPNA (рис. 3, 2) [1]. Далее, при изменении степени гидратации от 127 до 200 моль/моль увеличение выхода инактивации практически пропорционально увеличению степени гидратации. Систематические отклонения от прямой наблюдаются при гидратации более 200 моль/моль, т. е. при более чем 3-кратном заполнении центров гидратации молекулами воды. Как было установлено ранее, в состояниях, соответствующих 1,85 и 2,8 молекул воды на один центр гидратации в молекуле химотрипсина, происходит изменение характера заполнения центров связывания воды: начинается образование водных мостиков между локальными гидратированными центрами гидратации в первом случае и объединение локальных цепей в единую «кружевную структуру» гидратной оболочки во втором [8].

Из полученных данных видно, что появление реакционной способности активного центра химотрипсина в твердой фазе происходит за счет косвенного влияния адсорбции молекул воды на поверхности глобулы. Переход из неактивного в активное состояние осуществляется в узком интервале давления паров воды над белком. При этом по мере увеличения степени гидратации белка усиливается обмен молекулами воды между газовой фазой и поверхностью и начинается функционирование важных для каталитической активности внутриглобулярных степеней свободы. В целом это дает нам основание полагать, что функционирование молекулы химотрипсина в разных фазовых состояниях проходит через одинаковые физические и химические стадии, однако соотношение скоростей различных стадий в растворе и твердой фазе может сильно различаться.

Экспериментальная часть

Использовали α -химотрипсин с активностью 9000 ед. (по гидролизу этилового эфира *N*-ацетил-*L*-тирозина (АТЭЕ) — Reanal, Венгрия), бензилсульфонилфторид (PMSF, Serva). Концентрацию белка ($C_{\text{ХТ}}$, мг/мл) определяли спектрофотометрически, используя значение $E_{230}^{1\%} = 20,0$.

Активность α -химотрипсина (A) измеряли методом Шверта — Таке-нака [6] по скорости гидролиза АТЭЕ по формуле

$$A = 5000 \cdot \Delta A_{237} / \Delta t \cdot C,$$

где t — время гидролиза (мин), C — концентрация химотрипсина (мг/мл).

Приготовление смеси фермент-ингибитор. К 20 мл раствора химотрипсина (1 мг/мл) в свежеприготовленном 0,01 М NH_4HCO_3 буфере, рН 7,8, добавляли 0,4 мл 0,004 М раствора PMSF в ацетоне. Не позднее чем через 2—3 мин раствор замораживали при -40°C и лиофилизовали 4—5 ч. Полноту удаления буферной соли контролировали равенством отношения $A_{280}/C_{\text{ХТ}}$ для препаратов фермента, одновременно лиофилизированных из водного и буферного раствора ($C_{\text{ХТ}}$ в данном случае рассчитывали по навеске).

Необратимое ингибирование химотрипсина и определение его остаточной активности. Реакцию проводили в герметичных сосудах при заданных значениях p/p_s , устанавливаемых с помощью гигростатирующих водных растворов H_2SO_4 . По окончании опыта твердую реакционную смесь растворяли в безводном DMSO. Непрореагировавший PMSF отделяли на колонке ($1,6 \times 9$ см) с сефадексом LH-20, уравновешенной DMSO. Скорость элюции 0,6 мл/мин. Собирали фракцию с временем выхода 11—12,5 мин, имевшую максимальное поглощение при 280 нм, 0,2 мл белковой фракции добавляли 0,001 н. HCl до 6 мл. При этом активность неингибированного химотрипсина восстанавливалась за 30 мин. Проводили измерение остаточной активности. Было показано, что 3—4% DMSO не влияют на активность фермента в водном растворе. По полученным данным строили изотерму инактивации химотрипсина.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Хургин Ю. И., Медведова Н. В., Росляков В. Я. // Биофизика. 1977. Т. 22. № 6. С. 1010—1014.
2. Росляков В. Я., Хургин Ю. И. // Биохимия. 1972. Т. 37. № 3. С. 493—497.
3. Хургин Ю. И., Росляков В. Я., Клячко-Гураич А. Л., Бруева Т. Р. // Биохимия. 1972. Т. 37. № 3. С. 485—492.
4. Медведова Н. В., Хургин Ю. И. // Изв. АН СССР. Сер. хим. 1977. № 5. С. 1205.
5. Fahrney D. E., Gold A. M. // J. Amer. Chem. Soc. 1963. V. 85. P. 997—1000.
6. Schwert G. W., Takenaka Y. // Biochim. et biophys. acta. 1955. V. 16. P. 570.
7. Fersht A. R., Requena Y. // J. Mol. Biol. 1971. V. 60. P. 279—290.
8. Хургин Ю. И., Никитина А. И., Тимофеева Ю. Ф. // Биофизика. 1980. Т. 25. № 3. С. 563—564.

Поступила в редакцию
3.IV.1990

Yu. I. KHURGIN, E. Yu. MAKSAREVA

STUDY OF THE SOLID-STATE ENZYME REACTIONS. 3. IRREVERSIBLE INACTIVATION OF α -CHYMOTRYPSIN BY BENZYL SULFONYL FLUORIDE

N. D. Zelinsky Institute of Organic Chemistry, Academy of Sciences of the USSR, Moscow

In solvent-free solid mixture of α -chymotrypsin and benzylsulfonyl fluoride (PMSF) the irreversible inactivation of the enzyme's activity takes place when hydration (H) of the protein molecule exceeds a certain critical value $H_{\text{crit}} = 127$ moles of H_2O per mole of α -chymotrypsin. This value is approximately equal to the H_{crit} obtained for the solid-state chymotrypsin-catalysed hydrolysis of a substrate, *N*-succinyl-*L*-phenylalanine *p*-nitroanilide. The shape of the inactivation isotherme confirms the phase transition at H_{crit} and demonstrates that the main mass of the protein (up to 75%) is activable, but heterogeneous with respect to the hydration level necessary for switching on the catalytic activity of α -chymotrypsin.