



УДК 577.15.2.344.02

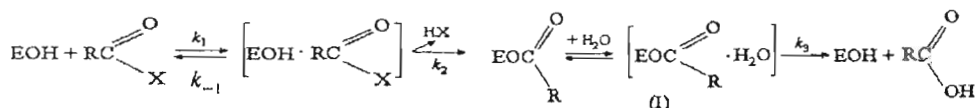
© 1993 Ю. И. Хургин, Е. Ю. Максарева

## ТВЕРДОФАЗНЫЕ ФЕРМЕНТАТИВНЫЕ РЕАКЦИИ IV \*. ГИДРОЛИЗ $\beta$ -ИНДОЛИЛАКРИЛОИЛ- $\alpha$ -ХИМОТРИПСИНА

Институт органической химии им. Н. Д. Зелинского РАН, Москва

Изучена гидролитическая устойчивость  $\beta$ -индолилакрилоил- $\alpha$ -химотрипсина \*\* в твердой фазе в отсутствие растворителя в зависимости от степени гидратации препарата. Показано, что стабильный в растворе при pH 5,0  $\beta$ -индолилакрилоилхимотрипсин не гидролизуется и в твердой фазе при условии, что степень его гидратации не превышает критического значения  $H_{кр} = 135$  моль  $H_2O$ /моль белка. Однако при степени гидратации выше  $H_{кр}$  происходит реакция гидролиза ацилфермента, протекающая по ферментативному механизму, поскольку полученное для нее значение  $H_{кр}$  и времена достижения предельного выхода ( $\sim 120$  ч) при  $H > H_{кр}$  практически совпадают с соответствующими величинами для типичных ферментативных реакций химотрипсина в твердой фазе (ацилирование, многооборотный гидролиз SPPNA). При больших временах (до 600 ч) в отличие от последних реакций идет параллельное медленное дезацилирование  $\beta$ -индолилакрилоилхимотрипсина и при гидратации ниже  $H_{кр}$ , которое, вероятно, протекает по неферментативному механизму общесосновного катализа с участием двух молекул воды, причем одна из них является нуклеофильным реагентом, вторая — переносчиком протона на  $\beta$ -атом кислорода остатка Ser<sup>193</sup>.

Катализ реакции гидролиза производных карбоновых кислот RCOX (X = NR', OR'') сериновыми протеиназами протекает через образование ацилферментного интермедиата. Последующее расщепление сложноэфирной связи в этом соединении происходит с участием молекулы воды, которая выступает в качестве второго субстрата катализируемой реакции путем образования комплекса (I):



Поэтому изменение содержания воды в реакционной среде непосредственно влияет на скорость ферментативной реакции. Однако не меньшее влияние на эффективность катализа может оказывать взаимодействие воды со всей поверхностью белковой глобулы. Гидратация молекулы белка — один из главных факторов формирования его пространственного строения в целом, и в частности структуры активного центра.

Одним из экспериментальных подходов к изучению роли гидратации в механизме ферментативного катализа является использование системы фермент —

\* Сообщение III см. [1].

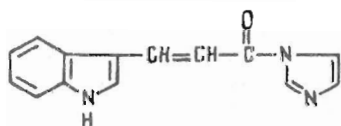
\*\* Далее химотрипсин —  $\alpha$ -химотрипсин. Сокращения: IAI —  $\beta$ -индолилакрилоилпипимидазол, PMSF — бензилсульфонилфторид, SPPNA — *p*-нитроангидрид *N*-сукцинил-*L*-фенилаланина.

вода с регулируемым соотношением компонентов, которое можно реализовать в маловодных условиях. Такая система легко осуществляется в отсутствие воды как растворителя в твердой фазе белка, лиофилизованного вместе с субстратом. Степень гидратации белка регулируется при этом путем изменения относительного давления паров воды ( $p/p_s$ ) над препаратом [2].

Впервые твердофазная ферментативная реакция в отсутствие растворителя была описана на примере гидролиза циннамоилхимотрипсина [3]. Транс-циннамоилимидазол модифицирует активный центр химотрипсина с образованием достаточно устойчивого интермедиата [4]. Было показано, что циннамоилхимотрипсин устойчив и в твердой фазе, но при низкой гидратации фермента. Появление продуктов гидролиза наблюдалось только при давлении паров воды выше определенного критического значения  $(p/p_s)_{кр} = 0,5$  [3]. Однако препарат циннамоилхимотрипсина содержал большое количество солей, что могло существенно влиять на его гидратацию, а следовательно, и на реакционную способность в твердой фазе [5]. Глубину реакции в работе [3] определяли по выходу коричной кислоты, что сильно затрудняло количественную интерпретацию, поскольку не учитывалась неспецифическая адсорбция коричной кислоты белком. В результате могли быть получены заниженные значения степени превращения ацилфермента и, следовательно, экспериментальное значение критической гидратации могло быть сдвинуто в сторону больших  $p/p_s$ .

Позднее на примере твердофазных реакций необратимого ингибирования химотрипсина под действием PMSF [1] и гидролиза SPPNA [5] было показано, что гидратация, необходимая для функционирования фермента в твердой фазе в отсутствие солей, достигается при  $p/p_s \geq (p/p_s)_{кр} = 0,44$  и  $0,48$  соответственно.

В настоящей работе изучен твердофазный гидролиз индольного гомолога циннамоилхимотрипсина,  $\beta$ -индолилакрилоилхимотрипсина. Реакция  $\beta$ -индолилакрилоилимидазола (IAI)



с активным центром химотрипсина с образованием  $\beta$ -индолилакрилоилхимотрипсина происходит в растворе при pH 5,0 с константой скорости  $k_2 = 0,6 \text{ с}^{-1}$  [6]. Стабильность ацилфермента в растворе с pH 5,0 обеспечивает возможность приготовления  $\beta$ -индолилакрилоилхимотрипсина в форме лиофилизованного препарата. Это позволило изучить влияние степени гидратации на гидролитическую устойчивость ацилфермента в твердой фазе. Реакцию проводили в бессолевом препарате, из которого летучие буферные соли удалялись в ходе лиофилизации. Для измерения глубины твердофазной реакции долю непрореагировавшего ацилхимотрипсина определяли в растворе спектрофотометрически, используя наличие характерной полосы поглощения с  $\lambda_{max}$  360 нм [6].

Основной целью работы была идентификация возможных путей реакции твердофазного гидролиза  $\beta$ -индолилакрилоилхимотрипсина и установление роли гидратации белка в формировании функционально активного состояния ацилфермента.

При  $p/p_s \leq 0,4$  в течение 120 ч не было обнаружено изменения состава реакционной системы в пределах чувствительности метода (1—2%). С другой стороны, при  $p/p_s \geq 0,9$  в течение того же периода времени наблюдалось полное разложение ацилхимотрипсина. Поэтому время  $t_0 = 120 \text{ ч}$  было выбрано как заведомо достаточное для данного опыта, что соответствовало времени достижения предельных выходов в интервале  $p/p_s$  0,4—0,9 для изученных ранее типичных ферментативных реакций в твердой фазе [1, 5].

Изотерма гидролиза  $\beta$ -индолилакрилоилхимотрипсина, т. е. зависимость степени превращения ацилфермента от давления паров воды  $p/p_s$ , изображена на

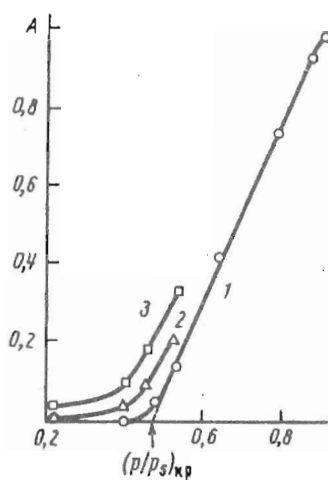


Рис. 1. Зависимость выхода (в отн. ед.) твердофазного гидролиза  $\beta$ -индолилакрилоилхимотрипсина от давления паров воды ( $p/p_s$ ) над препаратом при 25° С и времени экспозиции 120 (1), 220 (2) и 550 ч (3)

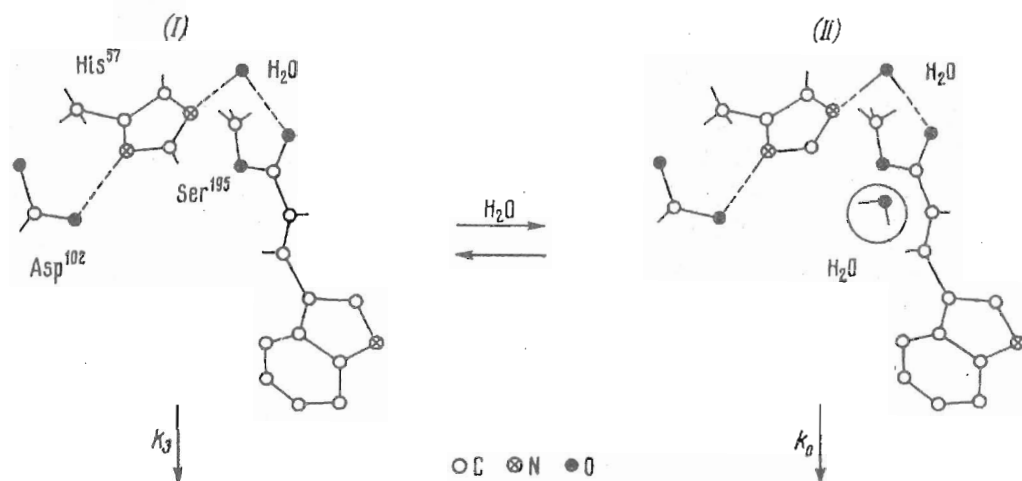


Рис. 2. Образование предреакционного состояния (II) из непродуктивного комплекса  $\beta$ -индолилакрилоилхимотрипсина с молекулой воды (I)

рис. 1 (1). Она имеет ту же форму, что и изотермы реакций, изученных ранее [1, 5]. Экстраполяция линейного участка изотермы гидролиза до пересечения с осью абсцисс дает значение  $(p/p_s)_{кр} = 0,46 \pm 0,05$  ( $r = 0,93$ ). Полученная величина практически совпадает со значениями  $(p/p_s)_{кр}$  для ингибирования химотрипсина PMSF и для гидролиза специфического субстрата SPPNA. Это позволяет утверждать, что именно в области  $p/p_s \approx 0,46$ , соответствующей гидратации 135 моль  $H_2O$ /моль белка [2], происходит переход гидратированного фермента в функционально активное состояние.

Полученные результаты подтверждают возможность протекания в твердой фазе реакций ацилированных по активному центру производных химотрипсина. Важно отметить, что в данном случае в твердой фазе, т. е. в маловодных условиях, происходит гидролиз ацилфермента, который в растворе при pH 5,0 не наблюдался [6]. Анализ рентгенокристаллографических данных о структуре  $\beta$ -индолилакрилоилхимотрипсина привел автора [7] к выводу о невозможности продуктивного связывания молекулы воды, которое необходимо для нуклеофильной атаки сложноэфирной связи в ходе гидролиза ацилферментного соединения. Этот вывод основан на следующих данных. Отсутствие конформационной по-

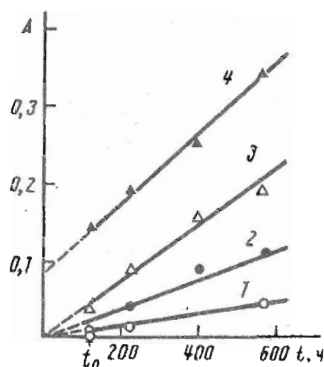


Рис. 3. Кинетика твердофазного гидролиза  $\beta$ -индолилакрилоилхимотрипсина в области низких значений относительного давления паров воды ( $p/p_s$ ): 0,22 (1), 0,4 (2), 0,46 (3) и 0,54 (4)

движности в сопряженной системе остатка арилакриловой кислоты не позволяет образовать вилочковую водородную связь карбонильного атома кислорода ацильной группы с NH-группами остатков Gly<sup>193</sup> и Ser<sup>195</sup> в оксианионном субцентре химотрипсина. Вследствие этого не достигается «правильная» ориентация карбонильного атома углерода ацилфермента относительно третичного атома азота имидазольной группы остатка His<sup>57</sup> (рис. 2). Кроме того, в кристаллическом  $\beta$ -индолилакрилоилхимотрипсине локализована молекула H<sub>2</sub>O таким образом, что она образует две водородные связи — с  $\epsilon$ 2-атомом азота имидазольной группы и карбонильным атомом кислорода ацильного остатка [7]. Ориентация молекулы воды в этом комплексе предотвращает нуклеофильную атаку карбонильного атома углерода ацильной группы, что и обеспечивает стабильность ацилфермента. Можно предположить, что аналогичное строение комплекс (I) имеет в лиофилизированном препарате. Время жизни такого комплекса в твердой фазе практически не ограничено, так как в этом случае отсутствует конкуренция с объемной водой за связанную молекулу H<sub>2</sub>O. Поэтому необходимая для протекания реакции дезацилирования продуктивная конфигурация комплекса может возникнуть за счет скачкообразного усиления внутримолекулярной подвижности при переходе от  $p/p_s < (p/p_s)_{кр}$  к  $p/p_s \geq (p/p_s)_{кр}$ , как показано в работе [8].

Таким образом, реакция твердофазного дезацилирования химотрипсина проходит в тех же условиях, что и другие типичные для ферментативного катализа твердофазные реакции [1, 5], для которых характерно: 1) наличие критической точки  $(p/p_s)_{кр}$ , 2) полное отсутствие реакции при  $p/p_s < (p/p_s)_{кр}$  при большом времени экспозиции, 3) активация фермента при  $p/p_s \geq (p/p_s)_{кр}$ ; следовательно, и твердофазную реакцию гидролиза  $\beta$ -индолилакрилоилхимотрипсина, наблюдаемую за время  $t \leq t_0$ , можно рассматривать как протекающую по ферментативному механизму.

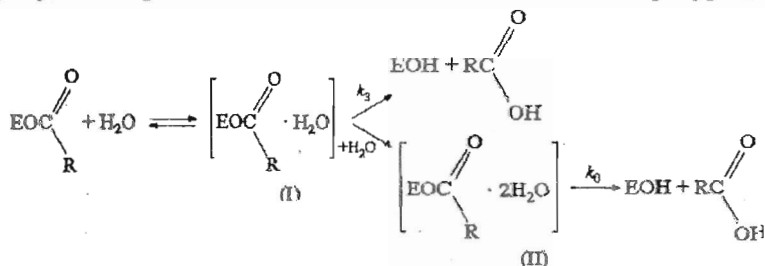
При экспозиции препарата ацилхимотрипсина в указанных условиях, но в течение значительно большего времени ( $t \gg t_0$ ) наблюдалось медленное протекание гидролиза при низких значениях  $p/p_s$  (рис. 1, 2, 3). Следует отметить, что такое же или большее увеличение длительности опытов в ранее изученных твердофазных реакциях химотрипсина [1, 5] не приводило к увеличению выхода продуктов реакции во всем интервале  $p/p_s$ . В этих случаях образование ацилхимотрипсина и его гидролиз происходят в процессе твердофазной реакции. В реакции с IAI ферментативные свойства химотрипсина были в значительной мере использованы на стадии приготовления ацилфермента в растворе. В отличие от указанных выше реакций твердофазный гидролиз ацилфермента не зависит от диффузии субстрата, а происходит непосредственно в активном центре фермента при условии продуктивного связывания молекулы воды в предреакционном состоянии. При большом времени экспозиции может проявиться и второй, «не-



ферментативный» путь реакции гидролиза  $\beta$ -индолилакрилоилхимотрипсина, а именно неспецифическое нуклеофильное замещение с участием второй молекулы воды без образования продуктивного комплекса (рис. 2) по механизму общего основного катализа.

На рис. 3 показана зависимость глубины гидролиза ацилхимотрипсина от времени при разных значениях  $p/p_s$ . В отличие от кинетических кривых 1—3, полученных при  $p/p_s \leq (p/p_s)_{кр}$ , линейная экстраполяция прямой 4 к  $t=0$  идет не в начало координат, а дает точку пересечения с ординатой выше нуля. Это согласуется с тем, что на начальной стадии реакции ( $t \leq t_0$ ) при  $p/p_s > (p/p_s)_{кр}$  имеет место «быстрая» реакция, протекающая, вероятно, по типу ферментативной (см. выше, а также [1] и [5]). Анализ величин скорости «медленных» реакций при разных  $p/p_s$  показывает, что порядок данной реакции по воде близок к первому.

Полученные результаты можно объяснить, если предположить, что стабильный комплекс (I) способен связать вторую молекулу воды из газовой фазы таким образом, чтобы одна молекула воды выполняла роль нуклеофильного реагента, а вторая была общесновным катализатором, т. е. осуществляла бы перенос протона от нуклеофильного реагента на уходящую группу —  $\beta$ -атом кислорода остатка Ser<sup>195</sup>. В этом случае «медленная» (неферментативная) реакция гидролиза сложноэфирной связи должна иметь первый порядок по воде. По этому маршруту реакции связывание второй молекулы воды может происходить при любой степени гидратации белка, в том числе и при  $p/p_s < (p/p_s)_{кр}$ , так как при этом не требуется образования каталитически активной конфигурации фермента



Как известно, в ферментативной реакции перенос протона осуществляется с участием  $\epsilon 2$ -атома азота имидазольной группы остатка His<sup>57</sup> активного центра химотрипсина. Однако необходимая «продуктивная» ориентация соответствующего основания может достигаться в воде «быстрой» реакции при  $p/p_s > (p/p_s)_{кр}$ , т. е. только после соответствующей перестройки пространственной структуры ацилхимотрипсина в области активного центра. При «медленной» (неферментативной) твердофазной реакции такие ограничения отсутствуют, ее скорость определяется пространственной доступностью сложноэфирной связи в комплексе (I) и числом соударений с молекулами воды из газовой фазы при образовании комплекса (II). При  $p/p_s > (p/p_s)_{кр}$  реакция протекает преимущественно по ферментативному механизму и параллельный неферментативный маршрут не может давать заметного вклада в общий выход твердофазной реакции гидролиза  $\beta$ -индолилакрилоилхимотрипсина. Таким образом, использование твердофазных условий позволяет установить наличие двух маршрутов гидролиза IAI с участием химотрипсина.

#### Экспериментальная часть

Использовали  $\alpha$ -химотрипсин с активностью 9000 ед. АТЭЕ (по гидролизу этилового эфира N-ацетил-L-тирозина (Reanal, Венгрия),  $\beta$ -индолилакрилоилимидазол получен по методу [6].

Состав реакционной смеси определяли спектрофотометрически, используя значения  $E_{280}^{1\%} = 20,0$  для химотрипсина,  $\epsilon_{360} = 1,84 \cdot 10^4$  [9] и  $\epsilon_{280} = 5,7 \cdot 10^4$  для  $\beta$ -индолилакрилоилхимотрипсина. Последняя величина была получена по [10] из дифференциального спектра в условиях контролируемого ацилирования химотрипсина.

*Получение ацилхимотрипсина.* К 20 мл раствора химотрипсина (1 мг/мл) в 0,01 М  $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ -буфере, pH 5,0, добавляли 0,4 мл 0,004 М раствора IAI в ацетоне. Соотношение фермент — субстрат в инкубационной смеси составляло 1 : 2. Через 3 мин раствор замораживали при  $-40^\circ\text{C}$  и лиофилизовали 4—5 ч. Полноту удаления буферной соли контролировали гравиметрически.

*Гидролиз ацилфермента и анализ продуктов гидролиза.* Реакцию проводили в герметичных сосудах в течение 120—600 ч, заданные значения  $p/p_0$  устанавливали с помощью гигростатирующих водных растворов  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . По окончании опыта твердую реакционную смесь растворяли в 0,001 н.  $\text{HCl}$ , что обеспечивало устойчивость негидролизованного ацилфермента в процессе анализа. Низкомолекулярные продукты реакции и непрореагировавший субстрат разделяли на колонке (1×20 см) с сефадексом G-10, уравновешенным 0,001 н.  $\text{HCl}$ , со скоростью 0,5 мл/мин. Собирали фракцию с временем выхода 10—12 мин и измеряли ее поглощение при 280 и 360 нм. По полученным данным рассчитывали молярное соотношение ацилфермента и свободного химотрипсина в каждом препарате и строили изотерму гидролиза  $\beta$ -индолилакрилоилхимотрипсина.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Хургин Ю. И., Максарева Е. Ю. // Биоорганическая химия. 1991. Т. 17. № 1. С. 76—80.
2. Хургин Ю. И., Росляков В. Я., Клячко-Гурвич А. Л., Бруева Т. П. // Биохимия. 1972. Т. 37. № 3. С. 485—492.
3. Росляков В. Я., Хургин Ю. И. // Биохимия. 1972. Т. 37. № 3. С. 493—497.
4. Schonbaum G. R., Zerner B., Bender M. L. // J. Biol. Chem. 1961. V. 236. № 11. P. 2930—2935.
5. Хургин Ю. И., Медведева Н. В., Росляков В. Я. // Биофизика. 1977. Т. 22. № 6. С. 1010—1014.
6. Bernhard S. A., Tashjian Z. H. // J. Amer. Chem. Soc. 1965. V. 87. № 8. P. 1806—1807.
7. Henderson R. // J. Mol. Biol. 1970. V. 54. № 2. P. 341—354.
8. Крупянский И. Р., Шаркевич И. В., Медведева Н. В., Хургин Ю. И., Суздальев И. П., Гольданский В. И. // Молекулярная биология. 1987. Т. 20. № 5. С. 1356—1363.
9. Bernhard S. A., Lau S. J., Noller H. // Biochemistry. 1965. V. 4. № 6. P. 1108—1118.
10. Oliver R. W. A., Viswanatha T., Whish W. J. D. // Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1967. V. 27. № 1. P. 107—111.

Поступила в редакцию  
16.III.1993

*Yu. I. Khurgin, E. Yu. Maksareva*

#### THE SOLID-STATE ENZYME REACTIONS.

#### IV. HYDROLYSIS OF $\beta$ -INDOLEACRYLOYL- $\alpha$ -CHYMOTRYPSIN

*N. D. Zelinsky Institute of Organic Chemistry, Russian Academy of Sciences,  
Moscow*

$\beta$ -Indoleacryloyl- $\alpha$ -chymotrypsin stable in aqueous solution at pH 5.0 is shown to be stable also in lyophilized state at low hydration for to 120 h, if the hydration degree does not exceed critical value ( $H_{crit}$ ) 135 mole  $\text{H}_2\text{O}$  per mole of protein

typical for other chymotrypsin-catalyzed solid-state and solvent-free reactions. However upon hydration above  $H_{crit}$  the hydrolysis of acylenzyme does occur at  $t = t_0$ , the reaction to be considered as an enzyme-like process. In contrast to solid-state chymotrypsin reactions with SPPNA and PMSF very slow hydrolysis of  $\beta$ -indoleacryloyl- $\alpha$ -chymotrypsin took place at  $t \gg t_0$  even at hydrations below the critical value. This reaction is probably a non-enzymatic general-base catalyzed hydrolysis. In this case the catalytic site of  $\beta$ -indoleacryloyl- $\alpha$ -chymotrypsin can bind two water molecules of which one is a nucleophile and the other may be involved in the process of proton transfer from nucleophile to the leaving group, i. e. Ser 195  $\beta$ -oxygen atom of the catalytic site.