



УДК 577.152.344.02

ТВЕРДОФАЗНЫЕ ФЕРМЕНТАТИВНЫЕ РЕАКЦИИ

V*. СРАВНЕНИЕ КАТАЛИТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ СУБТИЛИЗИНА И α -ХИМОТРИПСИНА В ОТСУТСТВИЕ РАСТВОРИТЕЛЯ

© 1995 г. Е. Ю. Максарева, Ю. И. Хургин

Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН, Москва, 117913, Ленинский пр-т, 47

Поступила в редакцию 11.02.94 г.

Показана способность субтилизина Carlsberg (КФ 3.4.21.14) гидролизовать *n*-нитроанилид *N*-сукцинил-*L*-фенилаланина в твердой фазе в отсутствие растворителя. Для реализации этого процесса необходима определенная степень гидратации белка, достигаемая при относительном давлении паров воды (p/p_s) не ниже критического значения 0.49. Максимальное превращение субстрата происходит при p/p_s 0.92. Такая же зависимость от гидратации наблюдается и для твердофазной инактивации субтилизина бензилсульфонилфторидом. Закономерности протекания твердофазных реакций α -химотрипсина и субтилизина, принадлежащих к разным семействам сериновых протеиназ, практически одинаковы.

Ключевые слова: субтилизин, α -химотрипсин, ферментативные реакции твердофазные.

Ранее нами была обнаружена способность α -химотрипсина (далее – химотрипсина) осуществлять катализ реакции гидролиза низкомолекулярных субстратов в твердой фазе [2]. Изученные твердофазные ферментативные реакции протекают в отсутствие воды как растворителя, но требуют наличия определенной степени гидратации белка. Установленные экспериментально характерные особенности протекания твердофазных реакций связаны с гидратационными свойствами поверхности белковой глобулы [3]. Следует отметить, что количество связанной белками воды (*N*, моль/моль) однозначно задается величиной относительного давления водяных паров p/p_s .

Реакция твердофазного гидролиза с участием химотрипсина протекает по ферментативному механизму; в расчете на один активный центр может осуществляться большое число оборотов [4]. Локально связанная в активном центре молекула воды выполняет роль одного из субстратов катализируемой реакции, а адсорбированная на поверхности вода участвует в формировании каталитически активной пространственной структуры молекулы белка, в том числе в области активного центра [3].

Приготовленные для исследования твердофазных реакций лиофилизированные препараты смеси

фермент-субстрат не претерпевают изменений при низком давлении паров воды ($p/p_s < 0.4$) [2]. В этих условиях происходит связывание молекул воды локальными, пространственно разделенными полярными центрами поверхности глобулы [5]. При определенном (так называемом критическом) давлении паров воды $p^*/p_s = 0.44 - 0.48$ происходит фазовый переход, который сопровождается включением каталитической активности фермента; было установлено, что в этих условиях начинается формирование непрерывных цепочек, включающих *N*-связанные молекулы воды и локальные полярные центры на поверхности глобулы [6]. Именно в этом узком интервале степени гидратации наблюдалась активация химотрипсина в реакциях гидролиза SPPNA [2], необратимая инактивация фермента PMSF [5] и гидролиз ацильных производных фермента по остатку активного центра Ser195 (циннамоил- и индолил-акрилоилхимотрипсин) [1, 7]. В настоящей работе изучены проходящие в твердой фазе с участием субтилизина Carlsberg (КФ 3.4.21.14) реакции гидролиза SPPNA и инактивации фермента PMSF.

Субтилизин и химотрипсин принадлежат к разным семействам сериновых протеиназ и принципиально различаются как по первичной, так и по пространственной структуре и топографии поверхности глобулы. Оба фермента в растворе инактивируются PMSF [8]. Субтилизин, как и химотрипсин, катализирует гидролиз различных эфирных и амидных субстратов [9], причем хими-

*Сообщение IV см. [1]. Сокращения: SPPNA – *n*-нитроанилид *N*-сукцинил-*L*-фенилаланина, PMSF – бензилсульфонилфторид, DMSO – диметилсульфоксид.

ческие механизмы катализа обоими ферментами, так же как и принцип организации структуры активного центра, практически совпадают [10]. Это дает возможность провести сравнение степени гидратации, необходимой для формирования каталитической активной конформации химотрипсина и субтилизина.

Предварительные опыты в твердой фазе в отсутствие воды как растворителя показали, что субтилизин, как и химотрипсин, проявляет каталитическую активность при достижении некоторых значений p/p_s .

1. Твердофазный гидролиз SPPNA

Анализ продуктов реакции субтилизина с SPPNA проводился в условиях, разработанных ранее для химотрипсина [2]. При использовании химотрипсина [2] и субтилизина в твердой фазе (рис. 1) увеличение времени экспозиции фермента с субстратом не приводило к увеличению выхода *n*-нитроанилина при всех значениях p/p_s (кривые 1 - 3). Субтилизин, как и химотрипсин, оказался неактивным при низкой гидратации препарата ($p/p_s < 0.4$). Резкое увеличение предельного выхода продукта реакции с ростом p/p_s наблюдалось выше определенного критического значения p^*/p_s , которое получали экстраполяцией прямолинейной части кривых до пересечения с осью абсцисс (рис. 1). Для субтилизина $p^*/p_s = 0.49 \pm 0.02$, что практически совпадает с p^*/p_s для химотрипсина (0.48 ± 0.02) [2]. Наклоны кривых для двух ферментов несколько различались; максимальный выход реакции (A_{max}) в опытах с химотрипсином достигался при $p/p_s = 0.75$, в то время как с субтилизином — при более высоком значении p/p_s (0.92). Значение p/p_s , при котором достигался максимальный выход ($A/A_{max} \approx 1$) (рис. 1), было практически одинаковым для смесей с молярным соотношением субтилизина и SPPNA 1 : 2 и 1 : 6. Следовательно, в твердой фазе каждый активный центр субтилизина способен осуществлять несколько оборотов. Это указывает на ферментативный характер данной твердофазной реакции.

2. Инактивация субтилизина в твердой фазе

Как и гидролиз SPPNA, инактивация субтилизина PMSF (рис. 2) требует определенной степени гидратации. Необратимая модификация остатков Ser195 активных центров была ранее использована для количественного определения содержания активного химотрипсина в твердой фазе в зависимости от p/p_s [5]. Было показано, что в препарате химотрипсина имеется распределение молекул фермента по степени гидратации, необходимой для включения каталитической активности. По мере роста влажности выше p^*/p_s происходит переход все большего количества молекул фермен-

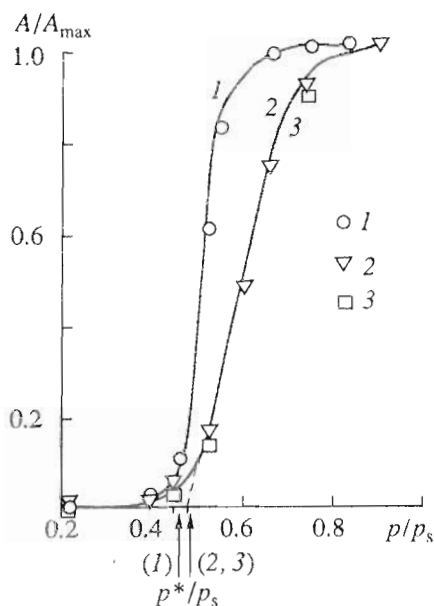


Рис. 1. Зависимость выхода *n*-нитроанилина, образующегося в результате гидролиза SPPNA в смеси с химотрипсином (1) или субтилизином (2, 3), от относительного давления паров воды (p/p_s) над препаратом при длительности опытов 150 (1), 350 (2) и 700 ч (3). A_{max} — выходы *n*-нитроанилина при p/p_s 0.92.

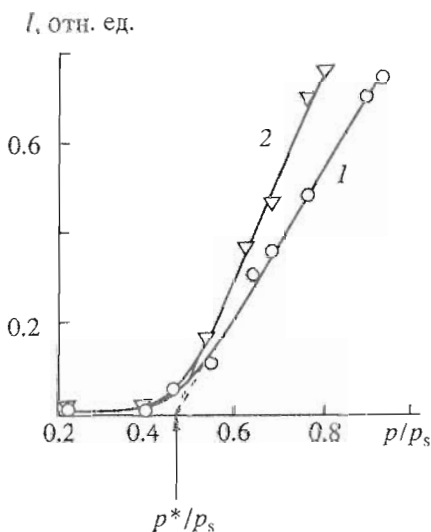


Рис. 2. Зависимость степени инактивации *I* (в отн. ед.) химотрипсина (1) и субтилизина (2) в твердой смеси с PMSF от относительного давления паров воды над препаратом. Длительность опытов 350 ч.

та в активное состояние. Поэтому изотермы твердофазных реакций (рис. 2) характеризуют распределение молекул химотрипсина и субтилизина по степени их "подготовленности" к включению активности при разных p/p_s [5].

Как видно из рис. 2, при инактивации химотрипсин и субтилизин обнаруживают точку фазового перехода в одной и той же области p/p_s :

критические значения p^*/p_s составляют 0.44 ± 0.03 ($r = 0.94$) для химотрипсина [5] и 0.48 ± 0.03 ($r = 0.95$) для субтилизина.

Максимальная глубина инактивации в обоих случаях не превышала 75%. Неполнота ингибирования, вероятно, объясняется наличием неактивной доли фермента в растворе при тех значениях pH, которые использовались нами при приготовлении препаратов [5].

Наряду с критической точкой перехода в активное состояние гидратационно-зависимые процессы характеризуются наклоном линейного участка изотермы гидролиза при $p/p_s > p^*/p_s$. Соответствующие величины для двух сопоставляемых протеиназ заметно различаются (рис. 1, 2). Для достижения одного и того же уровня инактивации требуется меньшая гидратация субтилизина по сравнению с химотрипсином (рис. 2). В то же время определенным предельным выходом *n*-нитроанилина при гидролизе SPPNA в случае субтилизина достигается при больших значениях p/p_s (рис. 1). Полученные к настоящему времени данные в первом приближении можно объяснить несколько более прочным удерживанием ингибитора и субстрата, а также продуктов гидролиза в активном центре субтилизина. Это должно способствовать стабилизации комплекса фермент-субстрат. Одновременно может затрудняться продуктивное связывание молекулы воды на стадии дезацилирования, а также диссоциация продуктов в твердой фазе.

Полученные результаты показывают, что ферментативная активность в твердой фазе не является уникальным свойством химотрипсина, а проявляется также и в случае субтилизина. Необходимо отметить, что субтилизин, как и химотрипсин, в твердой фазе начинает проявлять каталитическую активность в том же самом интервале p/p_s ($p^*/p_s = 0.45 - 0.50$).

Одинаковый характер воздействия воды на функциональные свойства двух белков с различной третичной структурой согласуется с обнаруженной ранее общностью гидратационных свойств водорастворимых глобулярных белков [3]. Емкость эффективного монослоя воды на поверхности белковой глобулы, которая соответствует общему числу первичных центров гидратации, для большого числа водорастворимых глобулярных белков является постоянной величиной (0.056 ± 0.003 г H₂O на 1 г белка) [3, 11]. Следовательно, можно предполагать, что фазовый переход в области $p/p_s = 0.45 - 0.50$, который сопровождается включением функциональной активности химотрипсина и субтилизина, происходит при одинаковой степени гидратации обоих белков, в 1.8 раза превышающей емкость эффективного монослоя.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Использовали субтилизин (Boehringer), бензилсульфонилфторид (Serva), *n*-нитроанилид *N*-сукцинил-*L*-фенилаланина ("Реахим").

Концентрацию белка (*C*, мг/мл) определяли спектрофотометрически, используя значение $E_{280}^{1\%} = 9.6$ [8]. Содержание активного субтилизина определяли по [12], применяя в качестве титранта циннамоилимидазол.

Активность субтилизина в единицах ВТМЕ (*a*) измеряли по скорости гидролиза метилового эфира бензоил-*L*-тирозина (ВТМЕ, Reanal) по аналогии с методом определения активности химотрипсина [13] с использованием этилового эфира бензоил-*L*-тирозина. Расчет проводили по формуле

$$a = \Delta D_{256} / \Delta t C,$$

где *t* – время гидролиза (мин), *C* – концентрация субтилизина в реакционной смеси (мг/мл), D_{256} – оптическое поглощение при 256 нм.

Приготовление смеси фермент-субстрат (ингибитор). К 20 мл раствора субтилизина (1 мг/мл) в 0.01 *n*.NH₄HCO₃-буфере, pH 8.0, добавляли 0.2 - 0.4 мл 4 мМ SPPNA (или 4 мМ PMSF) в ацетоне. Были использованы препараты с соотношением субстрат-фермент соответственно 3 : 1, 5 : 1 и 6 : 1 по отношению к количеству активного субтилизина. Не более чем через 3 мин смесь замораживали при -40°C и лиофилизовали.

Твердофазную реакцию проводили при заданных значениях p/p_s , устанавливаемых с помощью водных растворов H₂SO₄, в течение 350 - 700 ч. Глубину гидролиза SPPNA определяли спектрофотометрически по величине отношения D_{416}/D_{357} после растворения твердого образца в перегнанном DMSO [2].

Для определения остаточной активности ингибированного субтилизина 1 мг реакционной смеси растворяли в 100 мл трис-HCl-буфера, pH 7.8, и не более чем через 1 мин измеряли активность.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Хургин Ю.И., Максарева Е.Ю. // Биоорганич. химия. 1993. Т. 19. № 10. С. 961 - 967.
2. Хургин Ю.И., Медведева Н.В., Росляков В.Я. // Биофизика. 1977. Т. 22. № 6. С. 1010 - 1014.
3. Хургин Ю.И. // Журн. Всес. хим. о-ва им. Д.И. Менделеева. 1976. № 6. С. 684 - 692.
4. Медведева Н.В., Хургин Ю.И. // Изв. АН СССР. Сер. хим. 1977. № 5. С. 1205.
5. Хургин Ю.И., Максарева Е.Ю. // Биоорганич. химия. 1991. Т. 17. № 1. С. 76 - 80.
6. Хургин Ю.И., Никитина А.Н., Тимофеева Ю.Ф. // Биофизика. 1980. Т. 25. № 3. С. 563 - 564.
7. Росляков В.Я., Хургин Ю.И. // Биохимия. 1972. Т. 37. № 3. С. 493 - 497.

8. Ottensen M., Svendsen I. // Meth. Enzymol. 1970. V. 19. P. 199 - 215.
9. Bernhard S.A., Tashjian Z.H. // J. Am. Chem. Soc. 1965. V. 87. P. 1806 - 1807.
10. Matthews D.A., Alden R.A., Birktoft J.J., Freer S.T., Kraut J. // J. Biol. Chem. 1977. V. 252. № 24. P. 8875 - 8883.
11. Хургин Ю.И., Росляков В.Я., Клячко-Гурвич А.Л., Бруева Т.Р. // Биохимия. 1972. Т. 37. № 3. С. 485 - 492.
12. Shonbaum G.R., Zerner B., Bender M.L. // J. Biol. Chem. 1961. V. 236. № 11. P. 2930 - 2935.
13. Hummel B.C.W. // Can. J. Biochem. and Physiol. 1959. V. 37. P. 1393.

The Solid-State Enzyme Reactions.

5. Comparison of the Subtilisin and α -Chymotrypsin Solvent-Free Catalysis

E. Yu. Maksareva and Yu. I. Khurgin*

*Zelinsky Institute of Organic Chemistry, Russian Academy of Sciences,
Moscow, 117913, Leninsky pr-t, 47*

Abstract – Subtilisin Carlsberg (E.C. 3.4.21.14) catalyzes the hydrolysis of N-succinyl-L-phenylalanine *p*-nitroanilide in solid-state solvent-free hydrated protein-substrate mixtures. This process needs a certain critical degree of hydration of the protein molecule which is attained at the relative water vapour pressure (p/p_s) above 0.49. The identical hydration dependency was found for the solid-state inactivation of subtilisin by phenylmethylsulphonyl fluoride. Despite the fact that subtilisin and α -chymotrypsin belong to two different families of serine proteinases, the characteristics of their solid-state catalytic reactions are almost identical.

Key words: subtilisin Carlsberg, α -chymotrypsin; solid-state enzyme reactions.

* Author for correspondence.