



УДК 577.152.3.03

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ α -ХИМОТРИПСИНА С ДИМЕТИЛСУЛЬФОКСИДОМ: СМЕНИ СУБСТРАТ – “ИЗМЕНИШЬ” МЕХАНИЗМ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ

© 2003 г. Н. Л. Еремеев

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, химический факультет,
119992, Москва, Воробьевы горы

Поступила в редакцию 19.09.2002 г. Принята к печати 20.11.2002 г.

Рассмотрено кинетическое поведение α -химотрипсина в смесях вода–диметилсульфоксид (DMSO) в интервале концентраций органического растворителя, не вызывающих необратимой денатурации фермента. Показано, что для различных субстратов α -химотрипсина (*N*-замещенных производных *L*-тирозина) наблюдаемая кинетическая картина выглядит принципиально по-разному и может быть описана совершенно разными кинетическими схемами. Выдвинуто предположение о том, что подобные различия – результат конкуренции *N*-ацильного заместителя субстрата и молекулы DMSO в S_2 -сайте связывания субстрата активного центра фермента.

Ключевые слова: α -химотрипсин в смеси вода–DMSO, механизм взаимодействий с DMSO.

ВВЕДЕНИЕ

Изучение закономерностей функционирования ферментов (в частности, сериновых протеиназ) в водно-органических смесях – весьма актуальная задача как фундаментальной, так и прикладной энзимологии. Традиционно для ее решения экспериментальным путем получают зависимости констант ферментативной реакции (каталитической и Михаэлиса) от концентрации органического растворителя в смеси и на основании этих зависимостей предлагают тот или иной механизм влияния эффектора (в нашем случае – органического растворителя) на функционирование фермента. Кажущаяся простота подобного подхода связана, тем не менее, с довольно серьезными трудностями в интерпретации экспериментальных данных. Именно выбор исследователем той или иной кинетической схемы определяет физический смысл предлагаемого им механизма влияния эффектора на фермент. Однако на стадии выбора схемы огромную роль играет как предшествующий опыт исследователя, так и его пристрастие к тем или иным кинетическим механизмам. Цель настоящей статьи – прямая демонстрация того факта, что даже такой параметр системы, как субстрат, может принципиальным образом менять наблюдаемую кинетическую картину поведения фермента в водно-органических смесях. Более того, даже при использовании одного и того же субстра-

та возможно применение различных кинетических схем для трактовки получаемых результатов. Данное утверждение демонстрируется на примере весьма хорошо изученной системы – α -химотрипсина в смесях вода–диметилсульфоксид (DMSO).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Базовая теория взаимодействия смешивающихся с водой органических растворителей с белками была разработана А.В. Левашовым с сотр. [1, 2]. Согласно предложенному ими механизму, при увеличении концентрации органического растворителя в смеси происходит замещение молекул воды в гидратной оболочке белковой глобулы. При достижении “критической” степени замещения белок необратимо денатурирует [3]; в “докритических” концентрациях изменения конформации белковой глобулы в результате ее взаимодействия с органическим растворителем обратимы [1, 4]. “Критическая” концентрация конкретного органического растворителя по отношению к конкретному белку определяется природой данной пары (для пары α -химотрипсин–DMSO, согласно спектральным данным, эта величина составляет 4.2 М [5]).

Поскольку описанный выше механизм предполагает неспецифические взаимодействия между белком и органическим растворителем, следует ожидать слабого влияния органического растворителя в его “докритических” концентрациях на каталитические параметры α -химотрипсина. Действительно, при гидролизе *n*-нитроанилида *N*-бензоил-*L*-тирозина (рис. 1) ни каталитическая

Сокращения: АТЭЕ – этиловый эфир *N*-ацетил-*L*-тирозина; АТНА – *n*-нитроанилид *N*-ацетил-*L*-тирозина; ВТЭЕ – этиловый эфир *N*-бензоил-*L*-тирозина; ВТНА – *n*-нитроанилид *N*-бензоил-*L*-тирозина.

Тел.: (095) 939-34-17; эл. почта: eremeev@enzyme.chem.msu.ru.

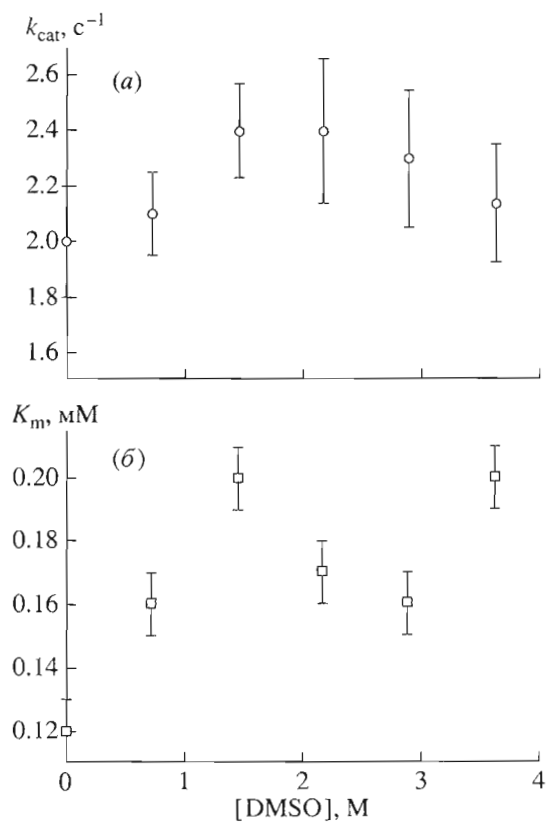


Рис. 1. Зависимость констант каталитической (а) и Михаэлиса (б) для гидролиза BTNA α -химотрипсином от концентрации DMSO в смеси.

константа, ни константа Михаэлиса практически не зависят от концентрации DMSO (слабую активацию каталитической константы можно либо считать ошибкой эксперимента, либо объяснять понижением энергии сорбции субстрата на активном центре фермента при увеличении диэлектрической проницаемости среды, как это делается в работе [6]).

В то же время при смене субстрата на этиловый эфир *N*-ацетил-*L*-тирозина наблюдаемая картина резко меняется (рис. 2). Каталитическая константа реакции монотонно падает, а константа Михаэлиса медленно возрастает вплоть до 2 М концентрации DMSO, после чего возрастает довольно сильно. Таким образом, в интервале концентраций DMSO от 0 до 2 М экспериментальные данные можно описывать схемой неконкурентного

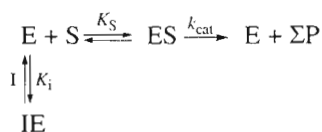


Схема 1.

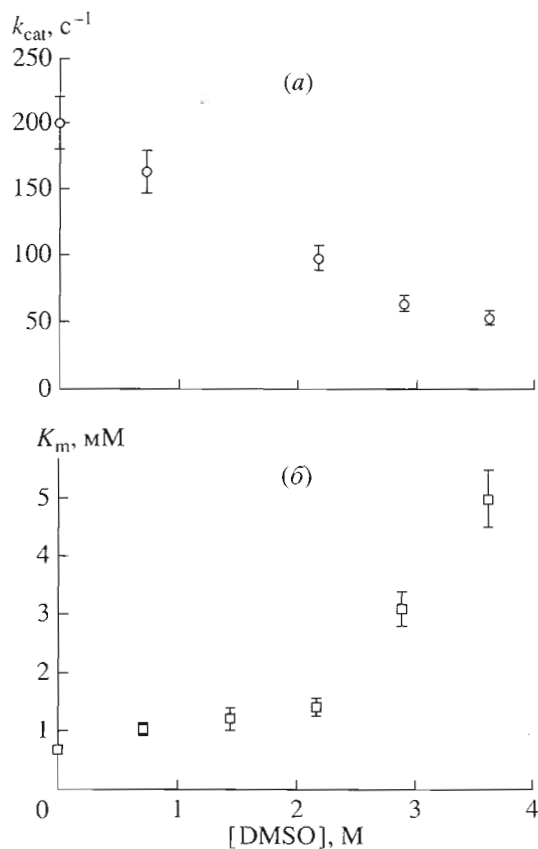


Рис. 2. Зависимость констант каталитической (а) и Михаэлиса (б) для гидролиза ATEE α -химотрипсином от концентрации DMSO в смеси.

ингибирования (схема 1), однако на всем интервале концентраций более применима схема ингибирования смешанного типа [7] (схема 2).

Итак, первое наблюдаемое различие в кинетическом поведении α -химотрипсина в смесях вода–DMSO – принципиально разный тип зависимости каталитической константы от концентрации органического растворителя для двух субстратов – BTNA и ATEE. Следует отметить, что и раньше в литературе были отмечены закономерности такого рода. Так, авторы, использовавшие *n*-нитроанилиды (*N*-бензоил-*L*-тирозина [1, 5, 7], *N*-сукцинил- и *N*-глутарил-*L*-фенилаланина [8]), приводили пороговый характер зависимости активности фермента в смесях вода–DMSO, при использовании эфирных субстратов (этиловые эфиры *N*-ацетил-*L*-тирозина [9–11] или *N*-ацетил-*L*-триптофана

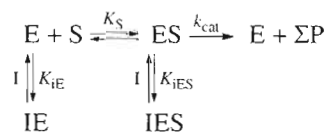


Схема 2.

Таблица 1. Константы индивидуальных стадий гидролиза α -химотрипсином АТЭЕ, полученные по методу дополнительного нуклеофила (схемы 4, 5)

Органический растворитель	k_{cat}, c^{-1}	k_2, c^{-1}	k_3, c^{-1}	K_S, mM
DMSO	205 ± 64	4600 ± 600	238 ± 85	13.0 ± 1.0
1,4-Бутандиол [14]	192	5000	200	17.2
Ацетоксим [15]	130	3380	135.2	16.0 ± 0.4
Этанол [16]	219 ± 11	3240 ± 1420	238 ± 3	5.8 ± 0.5

[12]) обычно сообщалось о монотонном убывании каталитической константы. Обычное объяснение такому несоответствию основано на трехстадийной схеме катализа сериновыми протеиназами (схема 3).

При этом для нитроанилидных субстратов скоростью лимитирующей стадией реакции является ацилирование α -химотрипсина ($k_2 \ll k_3, k_{cat} \approx k_2$), то есть стадия, на которой участие воды в реакции не предполагается. Для эфирных субстратов скоростью лимитирующей стадией служит обычно дезацилирование ацилфермента ($k_3 < k_2$) под действием молекулы воды, концентрация которой падает при увеличении содержания органического растворителя (трудно, однако, представить себе, что уменьшение концентрации воды на 10% способно привести к двукратному уменьшению каталитической константы реакции – см. рис. 2: при концентрации DMSO 1.2 М концентрация воды равна 50 М!).

Описанная выше ситуация вполне понятна для органических растворителей, способных выступать на стадии гидролиза ацилфермента в роли дополнительного нуклеофила, конкурирующего с водой за образование экспериментально измеряемого продукта P_2 ферментативной реакции [13] (схема 4).

Основанный на схеме 4 метод расчета констант индивидуальных стадий гидролиза субстратов сериновыми протеиназами с использованием спиртов или оксимов был разработан в начале 1970-х годов И.В. Березиным с сотр. [14, 15]. DMSO химически инертен по отношению к гидролизу ацилхимотрипсина, однако расчеты кинетических схем показывают, что в случае селективного образования обратимого комплекса ацилфермента с эффектором I (схема 5) математический аппарат этого метода также пригоден для определения констант индивидуальных стадий трехстадийной реакции (в данном случае расчетная величина k_4 по схеме 4 реально отражает соотношение концентраций продуктивного ацилфермента и непродуктивного комплекса ацилфермент-эффектор). Применяв метод дополнительного нуклеофила к экспериментальным данным (рис. 2), мы получили представленные в табл. 1 величины констант индивидуальных ста-

Таблица 2. Константы индивидуальных стадий гидролиза использованных субстратов α -химотрипсином

Субстрат	k_{cat}, c^{-1}	k_2, c^{-1}	k_3, c^{-1}
АТЭЕ*	192	5000	200
ВТЭЕ*	85.9	249	131
ВТНА	2		200**
АТНА	0.04		131**

* Данные [17].
** Полагая k_3 одинаковой для соответствующего ацилхимотрипсина.

дий гидролиза АТЭЕ α -химотрипсином. Хорошее соответствие полученных нами значений с литературными данными свидетельствует о плодотворности такого подхода.

Итак, на первый взгляд, ситуация довольно ясна – органический растворитель замедляет (по одному или другому механизму) стадию дезацилирования фермента и не влияет на стадию ацилирования. В результате при гидролизе нитроанилидных субстратов α -химотрипсином ($k_2 \ll k_3$,

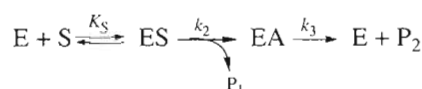


Схема 3.

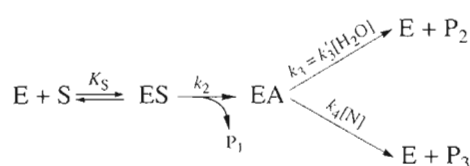


Схема 4.

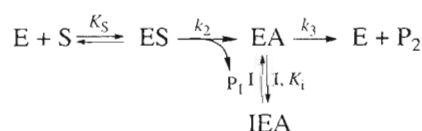


Схема 5.

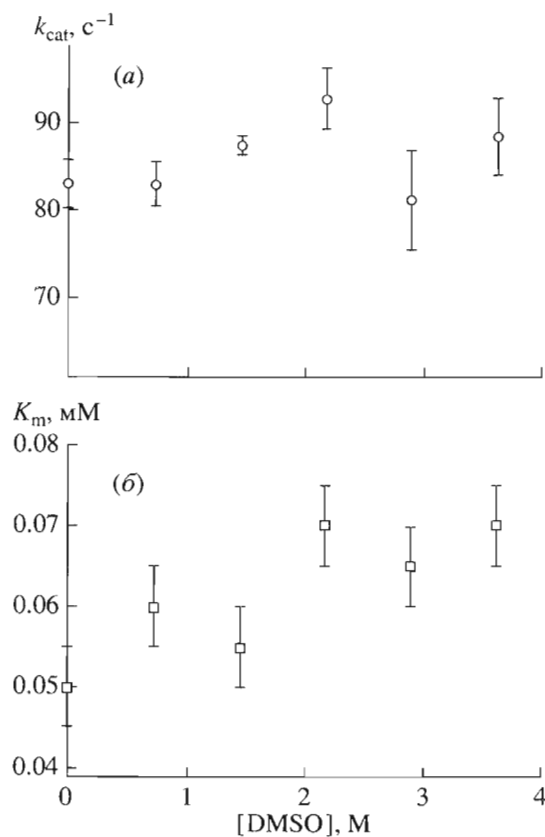


Рис. 3. Зависимость констант каталитической (а) и Михаэлиса (б) для гидролиза ВТЕЕ α -химотрипсином от концентрации DMSO в смеси.

$k_{\text{cat}} = k_2$) должна наблюдаться слабая зависимость каталитической константы реакции от концентрации органического растворителя (либо ее отсутствие), в то время как при гидролизе эфирных субстратов ($k_3 < k_2$) увеличение концентрации органического растворителя в смеси должно приводить к монотонному падению данного параметра (сравни рис. 1 и 2). Действительно, однако, полностью опровергает описанное выше предположение. Рассмотрим гидролиз ВТЕЕ, для которого $k_3 < k_2$ (табл. 2), но не на порядок, как для АТЕЕ, а всего примерно в два раза (рис. 3). Как видно из рисунка, в этом случае наблюдается не ожидаемое для эфирных субстратов падение каталитической константы, а практически полная ее независимость от концентрации DMSO (напоминающая по внешнему

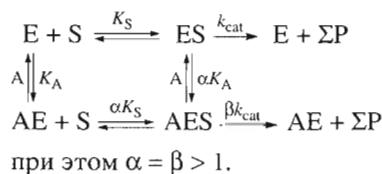


Схема 6.

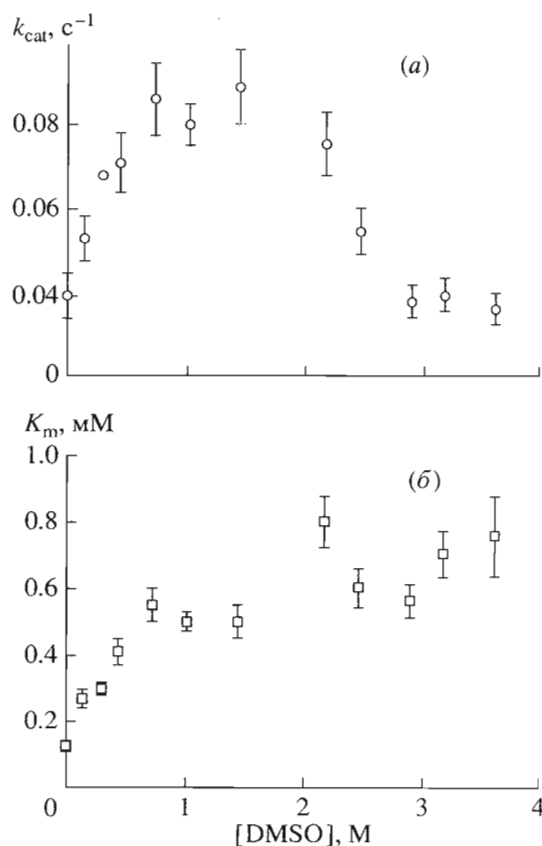


Рис. 4. Зависимость констант каталитической (а) и Михаэлиса (б) для гидролиза АТНА α -химотрипсином от концентрации DMSO в смеси.

виду аналогичную зависимость для реакции гидролиза ВТНА, рис. 1).

Окончательный приговор природе гидролизуемой связи как фактора, определяющего скорость лимитирующую стадию реакции гидролиза субстрата и соответственно вид зависимости каталитической константы от концентрации органического растворителя, выносит зависимость для гидролиза АТНА (рис. 4). Никакими спекуляциями на тему различия между эфирными и нитроанилидными субстратами α -химотрипсина невозможно объяснить двукратный активационный эффект, достигаемый при 1 М концентрации DMSO. При этом в зависимости от использованных концентраций DMSO применимы абсолютно разные кинетические схемы – до 1 М органического растворителя экспериментальные данные можно описать при помощи схемы бесконкурентной активации (схема б), в то время как для более широкого интервала концентраций DMSO требуется принципиально иная схема. Традиционно подобного рода колоколообразные зависимости принято описывать через последовательное присоединение двух молекул эффектора, первая из которых активирует фермент, а вторая замедляет скорость

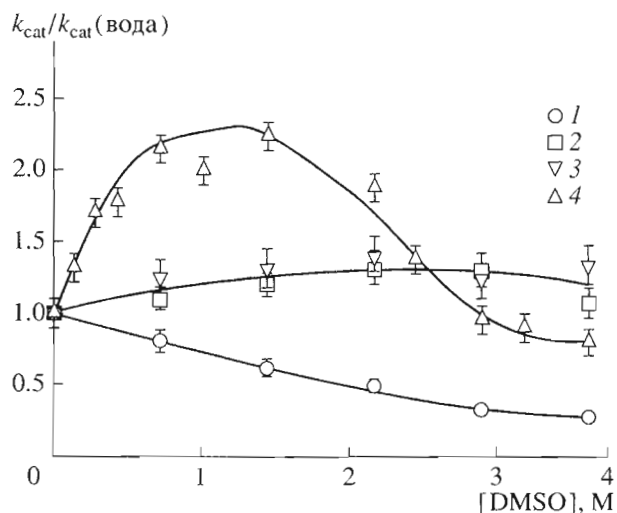


Рис. 5. Зависимость относительных каталитических констант гидролиза АТЕЕ (1), ВТЕЕ (2), ВТНА (3) и АТНА (4) α -химотрипсином от концентрации DMSO в смеси.

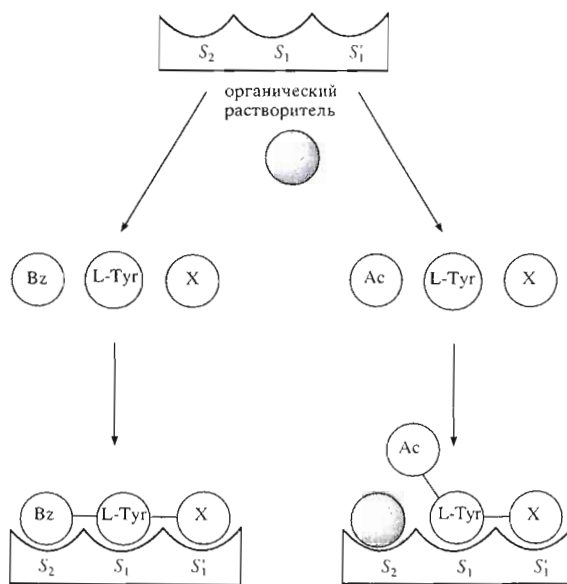


Рис. 6. Гипотетическая схема взаимодействия DMSO с активным центром α -химотрипсина.

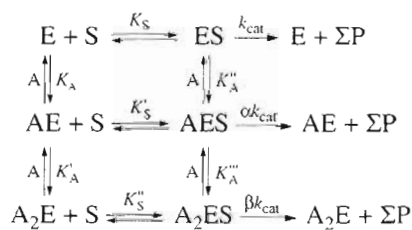
гидролиза (схема 7, классический пример – рН-зависимость α -химотрипсина).

Таким образом, минимальные структурные изменения в молекуле субстрата (табл. 2) приводят к драматическим изменениям в наблюдаемой кинетической картине при функционировании α -химотрипсина в смесях вода–DMSO. Действительно, схемы 1–7 отражают практически полный спектр известных кинетических проявлений при взаимодействиях обратимых эффекторов с биокатализаторами [18]. С чем же может быть связано такое поведение фермента?

Рассмотрим суммарные данные по изменению относительных каталитических констант реакции гидролиза различных субстратов нативным α -химотрипсином в зависимости от концентрации DMSO в смеси (рис. 5). Как видно из рисунка, определяющим фактором здесь является структура *N*-заместителя аминогруппы *L*-тирозина. Если кинетические данные по гидролизу эфирного и нитроанилидного *N*-бензоилзамещенных субстратов практически идентичны, то смена *N*-заместителя на ацетильную группу приводит к появлению резких различий в наблюдаемой кинетической картине: падение активности для эфирного субстрата и значительная активация в тех же концентрациях DMSO для нитроанилидного. Очевидно, что подобное различие – следствие того, что DMSO специфическим образом взаимодействует с белковой глобулой в районе сорбционного участка *N*-ацильной группы субстрата (S_2 -сайт по терминологии Шехтера–Бергера [19]).

Известно, что связывание в S_2 -сайте происходит за счет гидрофобных взаимодействий с остатками Пе99 и (или) Трр215 [20]. При этом субстраты,

имеющие более гидрофобный *N*-бензоильный заместитель, связываются α -химотрипсином значительно более эффективно (уменьшение уровня стандартной свободной энергии фермент–субстратного комплекса при переходе от *N*-ацетильных к *N*-бензоильным производным аминокислот составляет 2.7–2.9 ккал/моль [21]). Таким образом, если молекула DMSO способна занимать S_2 -сайт, то можно предположить, что на стадии образования фермент-субстратного комплекса *N*-бензоильный заместитель вытесняет эту молекулу (т.е. структуры образованных в воде и смесях вода–DMSO фермент-субстратных комплексов идентичны), в то время как для существенно менее гидрофобной ацетильной группы такое вытеснение энергетически невыгодно. Следовательно, в смесях вода–DMSO α -химотрипсин катализирует гидролиз *N*-бензоилзамещенных субстратов в составе “нативной” структуры фермент-субстратного комплекса, в то время как при использовании *N*-ацетилзамещенных субстратов структура этого комплекса меняется в результате взаимодействия белковой глобулы с молекулами DMSO (рис. 6).



при этом $\alpha > 1$, $\beta < \alpha$.

Схема 7.

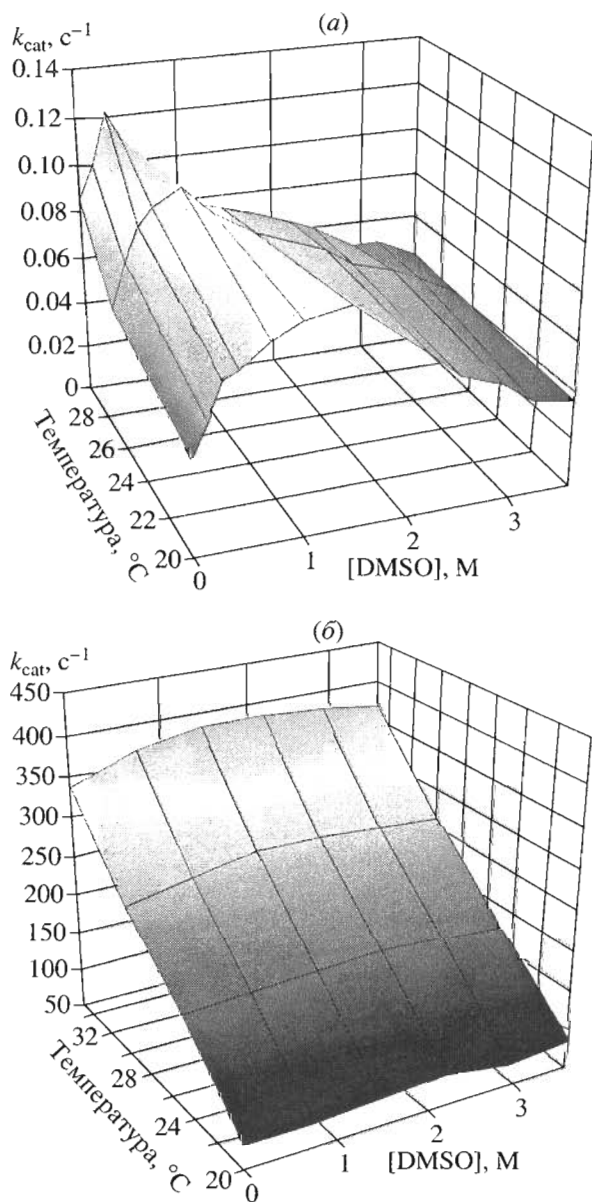


Рис. 7. Зависимость каталитических констант гидролиза ATNA (а) и VTEE (б) α -химотрипсином от температуры и концентрации DMSO в смеси.

Защитное действие *N*-бензоильной группировки субстрата на активный центр α -химотрипсина в смесях вода–DMSO особенно четко проявляется при повышенных температурах (рис. 7). Как видно из рисунка, в случае гидролиза ATNA повышение температуры от 20 до 30°C приводит к сдвигу значения содержания DMSO для максимума каталитической активности фермента от 1.5 М до 0.3 М. В то же время повышение температуры не оказывает влияния на ход зависимости каталитической константы гидролиза VTEE от концентрации DMSO, так же как и увеличение концентрации DMSO не влияет на температурную зависимость

этого параметра. Эти результаты подтверждают высказанное предположение о том, что причиной кинетических эффектов, наблюдаемых для гидролиза *N*-ацетилзамещенных субстратов, является изменение конформации активного центра и предпочтительном связывании в S_2 -сайте активного центра α -химотрипсина гидрофобной *N*-бензоильной группы субстрата по сравнению с молекулой органического растворителя. Повышение температуры приводит к увеличению подвижности аминокислотных остатков, что способствует изменению конформации активного центра α -химотрипсина при связывании DMSO в S_2 -сайте, что и проявляется кинетически как смещение максимума каталитической активности при гидролизе ATNA в область более низких концентраций органического растворителя. В случае гидролиза VTEE при повышении температуры устойчивость гидрофобных взаимодействий *N*-бензоильной группы и аминокислотных остатков S_2 -сайта увеличивается, что приводит к стабилизации структуры фермент-субстратного комплекса и к “разобщению” действия температуры и концентрации DMSO на каталитическую константу реакции.

Таким образом, как уже было сказано выше, минимальные структурные изменения в молекуле субстрата приводят к резким изменениям в наблюдаемой кинетической картине при функционировании α -химотрипсина в смесях вода–DMSO. Следует отметить, что DMSO не является уникальным растворителем с точки зрения влияния на кинетику действия α -химотрипсина – аналогичные зависимости были продемонстрированы и для смесей вода–этанол [16]. Это означает, что органический растворитель в ряде случаев является эффектором не столько молекулы фермента, сколько эффектором конкретной реакции, этим ферментом катализируемой. Отсюда следует, что необходимо с большой осторожностью относиться к закономерностям поведения фермента в водно-органических смесях, полученных при использовании некоего модельного субстрата. Механический перенос таких закономерностей на иную реакцию (смена субстрата) может быть чреват катастрофическими ошибками.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали α -химотрипсин кристаллический из поджелудочной железы быка, марки А, производства ОАО “Самсон” (Санкт-Петербург, Россия); этиловый эфир *N*-ацетил-*L*-тирозина, *n*-нитроанилид *N*-бензоил-*L*-тирозина, этиловый эфир *N*-бензоил-*L*-тирозина производства “Sigma” (США); диметилсульфоксид производства ОАО “Химреактивкомплект” (Россия). *n*-Нитроанилид *N*-ацетил-*L*-тирозина синтезирован по методике [22].

Соли и компоненты буферных растворов марки “ч. д. а.”, “Реахим” (Россия).

Активность нативного α -химотрипсина по эфирным субстратам (АТЕЕ, ВТЕЕ) определяли по начальным скоростям гидролиза методом потенциометрического титрования на рН-стате марки RTS 822 (Radiometer, Дания). Температура 20°C, рН 8.0, ионная сила создавалась 0.2 М NaCl и 0.02 М CaCl₂.

Активность нативного α -химотрипсина по нитроанилидным субстратам (АТНА, ВТНА) определяли по начальным скоростям гидролиза на спектрофотометре 124 (Hitachi, Япония) при длине волны 390 нм. Температура 20°C, рН 8.0 (0.05 М натрий-фосфатный буфер). Молярные коэффициенты поглощения продукта (*n*-нитроанилина) определяли в независимых экспериментах для каждой использованной концентрации органического растворителя.

Параметры уравнения Михаэлиса–Ментен рассчитывали из зависимостей начальных скоростей гидролиза соответствующего субстрата от его концентрации в двойных обратных координатах Лайнуивера–Берка.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор благодарит В.В. Рыжову и Н.А. Ускову (химический факультет МГУ) за синтез АТНА, а также Российский фонд фундаментальных исследований за частичное финансирование работы (грант № 98-03-32204а).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Mozhaev V.V., Khmel'nitsky Yu.L., Sergeeva M.V., Belova A.B., Klyachko N.L., Levashov A.V., Martinek K. // Eur. J. Biochem. 1989. V. 184. P. 597–602.
2. Белова А.Б., Можяев В.В., Левашов А.В., Сергеева М.В., Мартинек К., Хмельницкий Ю.Л. // Биохимия. 1991. Т. 56. С. 1923–1945.
3. Griebenow K., Klivanov F.V. // J. Am. Chem. Soc. 1996. V. 118. P. 11 695–11 700.
4. Гладиллин А.К., Левашов А.В. // Биохимия. 1998. Т. 63. С. 408–421.
5. Белова А.Б. Критерии выбора органического растворителя для проведения ферментативных реакций в водно-органических средах. Дис. ... канд. хим. наук. М.: МГУ, 1992. С. 72.
6. Guinn R.M., Blanch H.W., Clark D.S. // Enz. Microb. Technol. 1991. V. 13. P. 320–326.
7. Cornish-Bowden A. Fundamentals of Enzyme Kinetics. London: Portland Press Ltd., 1999. P. 95–100.
8. Mao Q., Walde P. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1991. V. 178. P. 105–112.
9. Kise H., Tomiuchi Y. // Biotechnol. Lett. 1991. V. 13. P. 317–322.
10. Simon L.M., Laslo K., Vertesi A., Bagi K., Szajani B. // J. Mol. Cat. Part B: Enzymatic. 1998. V. 4. P. 41–45.
11. Еремеев Н.Л., Беляева Е.А., Казанская Н.Ф. // Биоорганич. химия. 1999. Т. 25. С. 460–465.
12. Maurel P. // J. Biol. Chem. 1978. V. 253. P. 1677–1683.
13. Bender M.L., Clement G.E., Gunter C.R., Kezdy F.J. // J. Am. Chem. Soc. 1964. V. 86. P. 3697–3699.
14. Березин И.В., Казанская Н.Ф., Клесов А.А. // Биохимия. 1971. Т. 36. С. 108–115.
15. Berezin I.V., Kazanskaya N.F., Klyosov A.A. // FEBS Lett. 1971. V. 15. P. 121–124.
16. Беляева Е.А., Гра Д.В., Еремеев Н.Л. // Биохимия. 2002. Т. 67. С. 1246–1251.
17. Клесов А.А., Березин И.В. Ферментативный катализ. М.: Изд-во МГУ, 1980. С. 115.
18. Варфоломеев С.Д., Гуревич К.Г. Биокинетика. М.: Фаир-Пресс, 1999. С. 200–208.
19. Shechter I., Berger A. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1967. V. 27. P. 157–162.
20. Segal D.M., Powers J.C., Cohen G.H. // Biochemistry. 1986. V. 10. P. 3728–3737.
21. Клесов А.А., Цетлин В.И. // Биоорганич. химия. 1977. Т. 3. С. 1523–1538.
22. Гринштейн Дж., Виниц М. Химия аминокислот и пептидов. Пер. с англ. М.: Мир, 1965. С. 425.

Interaction of α -Chymotrypsin with Dimethyl Sulfoxide: A Change of Substrate Could “Change” the Interaction Mechanism

N. L. Eremeev

Phone: +7 (095) 939-3417; e-mail: eremeev@enzyme.chem.msu.ru
Faculty of Chemistry, Moscow State University, Vorob'evy gory, Moscow, 119992 Russia

The kinetic behavior of α -chymotrypsin was studied in water–DMSO mixtures at concentrations of the organic solvent that do not cause irreversible denaturation of the enzyme. Various substrates (*N*-substituted derivatives of *L*-tyrosine) were found to display substantially different kinetic patterns of interaction with α -chymotrypsin, which can be described by totally different kinetic schemes. The differences were ascribed to competition between the *N*-acyl group of the substrate and the DMSO molecule at the S₂-site of substrate binding to the active site of the enzyme. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2003, vol. 29, no. 5; see also <http://www.maik.ru>.

Key words: α -chymotrypsin in water–DMSO mixtures, mechanism of interaction with DMSO