



УДК 577.156.3.02

ВЗАИМОСВЯЗЬ КИНЕТИЧЕСКИХ И ТЕРМОДИНАМИЧЕСКИХ
ПАРАМЕТРОВ ХИМОТРИПСИНОВОГО КАТАЛИЗА

Козлов Л. В., Дьяченко Е. Д., Антонов В. Ю.

*Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина
Академии наук СССР, Москва*

Обнаружена линейная зависимость между величинами свободной энергии гидролиза субстратов α -химотрипсина — производных $\text{AcPhe}(\text{NO}_2)$ и логарифмом отношения $k_{\text{кат}}/K_{\text{m(кат)}}$. Полученная зависимость позволяет оценить свободную энергию гидролиза ацилфермента, а также скорость переноса ациламиноокислоты на различные акцепторы в реакциях переноса. Гидролиз пептидов не подчиняется этой зависимости, что объясняется специфичностью фермента в отношении второй (С-концевой) аминокислоты гидролизуемого ацилдипептида.

Специфичность ферментативного катализа может проявляться как на стадии связывания субстрата, так и в каталитической стадии. Совпадение этих двух типов специфичности Ноулз [1] выразил получившей широкую известность формулой «лучшее связывание — лучший катализ». В случае α -химотрипсина такая формула верна, по-видимому, лишь для некоторых типов субстратов [2], однако во многих случаях корреляция между связыванием субстрата и скоростью его гидролиза отсутствует [3, 4]. До последнего времени отсутствовало количественное объяснение существенного различия в скоростях гидролиза сложноэфирных и амидных субстратов химотрипсина, хотя общность ацилферментного механизма гидролиза этих субстратов можно считать доказанной [5, 6]. Попытки найти корреляционные зависимости кинетических констант химотрипсинового гидролиза от $\text{p}K_{\text{a}}$ уходящей группы субстратов — производных N -ацетилтирозина [7, 8] не были успешными, вероятно, вследствие того, что данные, используемые для расчетов, были получены разными авторами не всегда в строго одинаковых условиях.

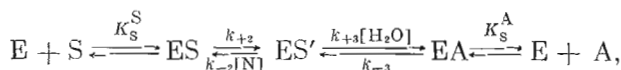
Обнаруженная нами ранее [9] линейная зависимость, связывающая величины свободной энергии гидролиза производных N -ацетил- L -фенилаланина и логарифма отношения $k_{\text{кат}}/K_{\text{m(кат)}}$, была в значительной степени основана на использовании литературных данных. Для подтверждения этих данных нами были синтезированы хромофорные субстраты на основе $\text{AcPhe}(\text{NO}_2)$ [4] и исследован их гидролиз в стандартных условиях спектрофотометрическим методом. Величины свободной энергии гидролиза этих субстратов α -химотрипсина были нами определены ранее в ряде работ [10—13]. В настоящей работе эти данные анализируются с точки зрения корреляций между свободной энергией и скоростью ферментативного гидролиза.

Сокращения: ДМФА — диметилформамид, $\text{Phe}(\text{NO}_2)$ — n -нитрофенилаланин, все аминокислоты L -ряда.

Кинетические и термодинамические параметры гидролиза субстратов
 α -химотрипсина ряда AcPhe(NO₂)-X (pH 7,0; 25°, 3% ДМФА)

-X	- ΔF_r , ккал/моль	Литера- тура	$k_{кат}/K_m$ (наж), M ⁻¹ с ⁻¹ [4]	$RT \ln(k_{кат}/K_m(\text{наж})),$ ккал/моль	k_{-2} , M ⁻¹ с ⁻¹	
					вычис- лено	определе- но экспе- рименталь- но
·OEt	6,45	[10]	6501±366	5,202±0,033	8,2	—
·OMe	6,13	[10]	3871±264	4,895±0,040	7,8	—
NHC ₆ H ₄ NO ₂	4,08	[12]	67±2	2,491±0,018	6,0	—
NHC ₆ H ₅	2,26	[13]	4,11±0,11	0,837±0,016	4,8	—
NH ₂	2,05	[13]	2,25±0,04	0,480±0,011	4,7	5±1
NHNH ₂	1,78	[13]	1,22±0,04	0,118±0,019	4,5	—
AlaNH ₂	0,91	[11]	132,8±1,6	2,897±0,007	1942	—
GlyNH ₂	0,80	[11]	0,89±0,05	-0,069±0,033	15,6	12±2

Гидролиз субстратов химотрипсином можно описать следующей схемой [14]:



где ES — фермент-субстратный комплекс; ES' — ацилфермент; EA — комплекс фермент — продукт с ациламинокислотой; N — часть субстрата, отщепляющаяся первой; K_S^S — константа диссоциации фермент-субстратного комплекса и K_S^A — константа диссоциации комплекса фермент — продукт.

Свободная энергия всего процесса (ΔF_r) равна сумме свободной энергии всех стадий:

$$\Delta F_r = \sum_i \Delta F_i.$$

Свободная энергия индивидуальных стадий выражена следующими уравнениями:

$$\begin{aligned} \Delta F_I &= RT \ln K_S^S; \\ \Delta F_{II} &= -RT \ln k_{+2} + RT \ln k_{-2}; \\ \Delta F_{III} &= \Delta F_{ES'} = -RT \ln (k_{+3}' / k_{-3}), \text{ где } k_{+3}' = k_{+3} [H_2O]; \\ \Delta F_{IV} &= -RT \ln K_S^A = \Delta F_{EA}. \end{aligned}$$

Суммируя эти выражения, получаем

$$\Delta F_r = -RT \ln(k_{+2} / K_S) + RT \ln k_{-2} + \Delta F_{ES'} + \Delta F_{EA}. \quad (1)$$

Поскольку $k_{+2} / K_S = k_{кат} / K_m(\text{наж})$ [15], для расчетов использовали последнее отношение, определяемое экспериментально.

Для серии субстратов с одинаковой ацильной частью (в нашем случае это AcPhe(NO₂)-) последние два члена выражения (1), относящиеся только к ацильной части, должны быть одинаковы для всех субстратов данного ряда. Таким образом, представляется возможным рассмотреть зависимость, связывающую ΔF_r и логарифмы отношения $k_{кат}/K_m(\text{наж})$ и k_{-2} . Первые два члена выражения определяют величины свободной энергии активации реакций гидролиза и переноса ацильной части на нуклеофильный акцептор:

$$\begin{aligned} \Delta F_r^* &= -RT \ln(k_{кат}/K_m(\text{наж})) + RT \ln \frac{kT}{h}, \\ \Delta F_{II}^* &= -RT \ln k_{-2} + RT \ln \frac{kT}{h}. \end{aligned}$$

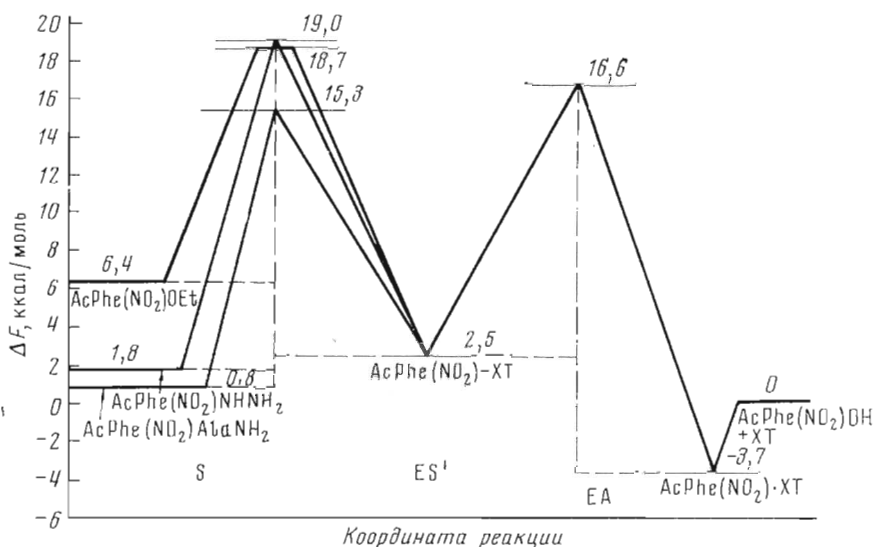


Рис. 2. Изменение стандартной свободной энергии системы вдоль координаты реакции гидролиза α -химоотрипсином (ХТ) $\text{AcPhe}(\text{NO}_2)\text{-OEt}$, $\text{AcPhe}(\text{NO}_2)\text{-NHNH}_2$ и $\text{AcPhe}(\text{NO}_2)\text{-AlaNH}_2$

с ацилфермента на эти акцепторы по неконкурентному ингибированию ими реакции гидролиза $\text{AcPhe}(\text{NO}_2)\text{-OEt}$. Видно, что вычисленные величины и определенные экспериментально совпадают, что еще раз свидетельствует в пользу ацилферментного механизма химоотрипсинового гидролиза. Данные, приведенные в таблице, также показывают, что для «неспецифических» акцепторов величины k_{-2} изменяются очень мало, лишь немного возрастая для акцепторов, образующих более богатую энергией связь. Это не относится к «специфическим» акцепторам (AlaNH_2 , GlyNH_2), скорости переноса $\text{AcPhe}(\text{NO}_2)$ на которые существенно выше.

На основании полученных данных строили график изменения свободной энергии в системе вдоль координаты реакции без учета промежуточного фермент-субстратного комплекса. Как следует из этого графика (рис. 2), для всех «полуспецифических» субстратов уровень первого активированного состояния практически одинаков (18,7—19,0 ккал/моль) и скорость реакции определяется почти исключительно величиной свободной энергии гидролиза субстрата. Для более богатых энергией субстратов абсолютная величина свободной энергии активации несколько снижается (19,0 ккал/моль для гидролиза, имеющего $\Delta F_r = -1,78$ ккал/моль, и 18,7 ккал/моль для эфира с $\Delta F_r = -6,45$ ккал/моль). Это говорит о том, что для таких субстратов переходное состояние более похоже на исходное состояние в соответствии с постулатом Хаммонда (см. [16]). Для «специфических» субстратов уровень свободной энергии активации существенно понижен, что свидетельствует о создании ситуации, близкой к переходному состоянию уже при сорбции таких субстратов. Возможности снижения свободной энергии активации путем использования части энергии связывания рассмотрены в работах Фершта [17] и Дженкса [18].

Полученные нами данные свидетельствуют о линейной зависимости величин свободной энергии гидролиза «полуспецифических» субстратов α -химоотрипсина и логарифмов $k_{\text{кат}} / K_{\text{m(кат)}}$. Эта закономерность позволяет предсказывать на основании знания ΔF_r каталитические константы реакций гидролиза и переноса ациламино кислот на акцепторы и еще раз подтверждает справедливость ацилферментного механизма для всех типов производных N-ациламино кислот.

Экспериментальная часть

α -Химотрипсин — кристаллический препарат Олайнского завода химических реактивов, содержание активного фермента в препарате, определенное титрованием *N*-транс-циннамолимидазолом [19], составляло 70—75%.

Скорость переноса AcPhe(NO₂) на акцепторы NH₄Cl и GlyNH₂ определяли по неконкурентному ингибированию гидролиза AcPhe(NO₂)-OEt, измеряемому на высокочувствительном самопишущем спектрофотометре собственной конструкции с чувствительностью 0,01 ед. оптической плотности на ширину диаграммной ленты самописца (25 см) в кварцевой герметической кювете (толщина слоя 1 см). Измерения основаны на различных величинах молярной экстинкции субстратов и продуктов при 310 нм; величины молярной экстинкции составляют для AcPhe(NO₂)-OEt 3733, для AcPhe(NO₂)-GlyNH₂ 3913, для AcPhe(NO₂)-NH₂ 3900 и для AcPhe(NO₂) 5333 [4]. $K_{m(каж)}$ в присутствии акцепторов и без них совпадали. За $k_{общ}$ — константу скорости превращения AcPhe(NO₂)-OEt в результате гидролиза и реакции переноса принимали $k_{кат}$ в отсутствие акцептора, которая равнялась $2,94 \pm 0,37$ с⁻¹ [4]. Концентрации субстрата составляли 0,17—1,03 мМ, фермента — (3—6) · 10⁻⁸ М, акцепторов: NH₄Cl — 1 М, GlyNH₂ — 0,1 М. В случае NH₄Cl реакцию гидролиза без акцептора проводили при той же ионной силе раствора, создавая ее 1 М KCl. В этом случае $k_{общ}$ равнялась $7,8 \pm 1,6$ с⁻¹. Во всех случаях использовали 0,2 М фосфатный буфер, pH 7,0, содержащий 3% ДМФА, температура 25°.

Константы скорости переноса ($k_{п}$) определяли по формуле [20]

$$k_{п} = \frac{k_{общ}}{[N]} \left(1 - \frac{\Delta N}{\Delta O} \right) \frac{\epsilon_A - \epsilon_{Et}}{\epsilon_A - \epsilon_N},$$

где ΔN и ΔO — измеряемые изменения оптической плотности в присутствии и в отсутствие акцептора; ϵ_A , ϵ_{Et} и ϵ_N — молярные экстинкции AcPhe(NO₂), AcPhe(NO₂)-OEt и продукта реакции переноса.

Измерения начальных скоростей гидролиза метилового эфира *N*-ацетилфенилаланина в присутствии AcPhe(NO₂) в качестве ингибитора проводили с помощью регистрирующего pH-стата ТТТ-1с Radiometer (Дания) при pH 7,0 и 25°. Использовали водные растворы метилового эфира *N*-ацетилфенилаланина (0,4—2 мМ), α -химотрипсина (1 мМ) и AcPhe(NO₂) (5 мМ). Ионную силу ($I = 0,1$) создавали KCl. Полученная для AcPhe(NO₂) величина $K_i = 2,03 \pm 0,29$ мМ.

Величины свободной энергии гидролиза субстратов рассчитывали по формулам, приведенным в работе [21], используя данные работ [10—13] и pK_a для AcPhe(NO₂) 3,2 [13], AlaNH₂ 8,15 [22], *n*-нитроанилина 1,02 [23], анилина 4,58 [23] и гидразина 8,10 [23]. Все расчеты проводили с помощью ЭКВМ «Электроника-70».

ЛИТЕРАТУРА

1. Knowles J. R. (1965) J. Theor. Biol., 9, 213—228.
2. Berezin I. V., Kazanskaya N. F., Klyosov A. A., Martinek K. (1974) FEBS Lett., 15, 125—128.
3. Дьяченко Е. Д., Волкова Л. И., Козлов Л. В., Антонов В. К. (1974) Молекулярн. биология, 8, 879—885.
4. Дьяченко Е. Д., Волкова Л. И., Козлов Л. В., Антонов В. К. (1976) Биоорг. химия, 2, 1665—1671.
5. Лякишева А. Г., Гинцман Л. М., Антонов В. К. (1973) Молекулярн. биология, 7, 810—816.
6. Fastrez J., Fersht A. R. (1973) Biochemistry, 12, 2025—2034.
7. Fersht A. R., Blow D. M., Fastrez J. (1973) Biochemistry, 12, 2035—2041.
8. Philipp M., Pollack R. M., Bender M. L. (1973) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 70, 517—520.
9. Kozlov L. V., Antonov V. K., Djachenko E. D. (1971) Abstracts 7-th Meeting FEBS, Varna, № 181, p. 110.

10. Козлов Л. В., Гинопдман Л. М. (1965) Биохимия, 30, 1051—1054.
11. Козлов Л. В., Гинопдман Л. М., Орехович В. Н., Валгуева Г. А. (1966) Биохимия, 31, 315—321.
12. Дьяченко Е. Д., Козлов Л. В., Антонов В. К. (1971) Биохимия, 36, 981—984.
13. Дьяченко Е. Д., Козлов Л. В., Антонов В. К. (1977) Биоорганич. химия, 3, 99—104.
14. Bender M. L., Kezdy F. J. (1964) J. Amer. Chem. Soc., 86, 3704—3714.
15. Zerner B., Bender M. L. (1964) J. Amer. Chem. Soc., 86, 3669—3674.
16. Дженкс В. (1972) Катализ в химии и энзимологии, с. 161, «Мир», М.
17. Fersht A. R. (1974) Proc. Roy. Soc., Ser. B 187, 337—407.
18. Jencks W. F. (1975) Advances Enzymol., 43, 249—410.
19. Schonbaum G. R., Zerner B., Bender M. L. (1961) J. Biol. Chem., 236, 2930—2935.
20. Inwart P. W., Jencks W. P. (1965) J. Biol. Chem., 240, 1986—1996.
21. Carpenter F. H. (1960) J. Amer. Chem. Soc., 82, 1111—1122.
22. Baumann W. K., Bizzozero S. A., Dutler H. (1970) FEBS Lett., 8, 257—260.
23. Справочник химика, 2-е изд. (1964) т. III, с. 84, 98, 102, «Химия», М.—Л.

Поступила в редакцию
2.VI.1976

RELATION BETWEEN KINETIC AND THERMODYNAMIC PARAMETERS OF CHYMOTRYPSIN CATALYSIS

KOZLOV L. V., DJACHENKO E. D., ANTONOV V. K.

*M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry,
Academy of Sciences of the USSR, Moscow*

A linear relation has been found between the values of free energies and the k_{cat}/K_m (app. ratio logarithms for the hydrolysis of α -chymotrypsin substrates, viz. N-acetyl-*p*-nitro *L*-phenylalanine derivatives. This relation allows to calculate the free energy of acyl enzyme hydrolysis and the rate of acylamino acid transfer to acceptor in the transfer reaction. The hydrolysis of peptides does not follow the above relation what may be rationalized in terms of enzyme specificity towards C-terminal amino acid residue of the acyldipeptide.
