



УДК 577.156

ГИДРОЛИЗ СЛОЖНЫХ ЭФИРОВ АМИНОКИСЛОТ
СО СВОБОДНОЙ α -АМИНОГРУППОЙ, КАТАЛИЗИРУЕМЫЙ
 α -ХИМОТРИПСИНОМ И ТРИПСИНОМ. СТЕРЕОСПЕЦИФИЧНОСТЬ
И pH-ЗАВИСИМОСТЬ ИНДИВИДУАЛЬНЫХ КОНСТАНТ СКОРОСТЕЙ

Блесов А. А.

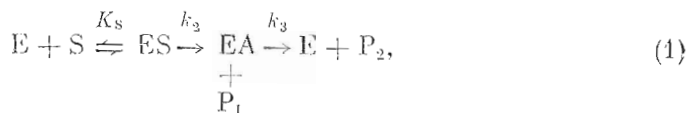
*Химический факультет Московского государственного университета
им. М. В. Ломоносова*

Гидролиз субстратов со свободной α -аминогруппой, катализируемый трипсином и α -химотрипсином, характеризуется различными pH-зависимостями констант скоростей ацилирования и деацилирования. Этот эффект приводит к росту отношения k_2/k_3 с увеличением pH. Левая ветвь pH-зависимости каталитической константы соответствует отношению $k_2 < k_3$, pH-оптимум реакции — отношению $k_2 \approx k_3$, правая ветвь (искаженная, по-видимому, реакцией транспептидации) — отношению $k_2 > k_3$. Предложен метод отдельного определения индивидуальных констант скоростей из pH-зависимости ферментативного гидролиза субстратов со свободной α -аминогруппой, основанный на селективном влиянии ионов водорода на константу скорости ацилирования. Найдено, что стереоспецифичность действия трипсина на субстрат со свободной α -аминогруппой минимальна по сравнению со всеми известными субстратными сериями трипсина и α -химотрипсина. Анализ энергетических диаграмм ферментативных реакций показал, что основной причиной аномальной pH-зависимости гидролиза субстратов со свободной α -аминогруппой является зависимость стандартной свободной энергии соответствующих ацилферментов от степени ионизации α -аминогруппы субстрата.

Особое внимание в литературе последнего времени уделяется механизму химотрипсинового и трипсинового гидролиза аминокислотных субстратов с незащищенной α -аминогруппой [1—11]. Еще в начале 50-х годов было замечено [12, 13], что pH-зависимости ферментативного гидролиза подобных субстратов аномальны и заметно отличаются от pH-зависимостей гидролиза соответствующих N-ацилированных субстратов. Если pH-оптимум гидролиза производных N-замещенных аминокислот под действием трипсина и α -химотрипсина находится около pH 8 [14], то ферментативный гидролиз субстратов со свободной α -аминогруппой характеризуется pH-оптимумом $\sim 5,5-6,5$ [1—13] и, как отмечается в ряде недавних публикаций, сложными, с трудом поддающимися количественному анализу pH-зависимостями для этой системы. Однако практически все заключения о сложном механизме действия трипсина и α -химотрипсина на субстраты со свободной α -аминогруппой (см. [2] и ссылки там же) основаны на анализе эффективных констант скоростей (относящихся к определяющим скорость стадиям) или кажущихся констант Михаэлиса. Очевидно, что для корректного анализа результатов кинетического эксперимента необходимо проводить отдельное определение констант скоростей промежуточных стадий ферментативной реакции («индивидуальных»

констант скоростей). Решение этой проблемы и было целью настоящей работы.

Известно, что гидролиз сложноэфирных субстратов под действием трипсина или α -химотрипсина протекает в три кинетически значимые стадии [15]:



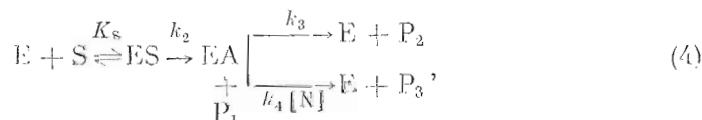
где ES — фермент-субстратный комплекс, EA — ацилферментное промежуточное соединение, P_1 и P_2 — основной и кислотный продукты гидролиза. Из кинетического анализа схемы (1) следует, что определяемые на опыте эффективные параметры (каталитическая константа $k_{кат}$ и кажущаяся константа Михаэлиса $K_{m(каж)}$) являются в общем случае комбинациями «индивидуальных» констант:

$$k_{кат} = \frac{k_2 k_3}{k_2 + k_3}, \quad (2)$$

$$K_{m(каж)} = K_s \frac{k_3}{k_2 + k_3}, \quad (3)$$

здесь K_s — истинная константа Михаэлиса, k_2 и k_3 — константы скоростей ацилирования и деацилирования соответственно. Из выражений (2) и (3) следует, что раздельное определение индивидуальных констант не может быть достигнуто кинетическим анализом трехстадийной реакции в стационарном режиме ее протекания (см. [16]).

Для определения численных значений констант k_2 , k_3 и K_s в настоящей работе было использовано влияние дополнительных нуклеофильных агентов на стадию деацилирования фермента [16, 17]. В этом случае схема (1) приобретает вид



где N — нуклеофильный агент, добавленный в реакционную систему, P_3 — продукт переноса ацильной части субстрата на нуклеофил, k_4 — константа скорости сольволиза ацилфермента под действием нуклеофильного агента. Детальный кинетический анализ схемы (4) и методы определения индивидуальных констант даны в работах [16—18]. В качестве добавленных нуклеофильных агентов в реакциях, катализируемых α -химотрипсином и трипсином, были выбраны соответственно 1,4-бутандиол и *n*-бутанол, так как в используемых концентрациях (максимально 1,9% для 1,4-бутандиола и 2,6% для бутанола) они практически не влияют на кинетику ферментативных реакций [17, 18].

Зависимость от pH индивидуальных констант скоростей. На рис. 1 приведена pH-зависимость каталитической константы трипсинового гидролиза этилового эфира L-лизина, типичная для ферментативного гидролиза субстратов со свободной α -аминогруппой. Так как pH-оптимум этой реакции смещен на 2—3 единицы в кислотную область по сравнению с pH-оптимумом гидролиза N-ацилированных субстратов, в литературе обычно принимается, что присутствие в активном центре фермента заряженной α -аминогруппы субстрата приводит к соответствующему смещению величин pK_a ионогенных групп активного центра. Однако анализ pH-зависимостей индивидуальных констант скоростей, катализируемых трипсином (табл. 1, 2) и α -химотрипсином (табл. 3), приводит к выводу, что подобная трактовка зависимости ферментативной реакции от pH неверна, так

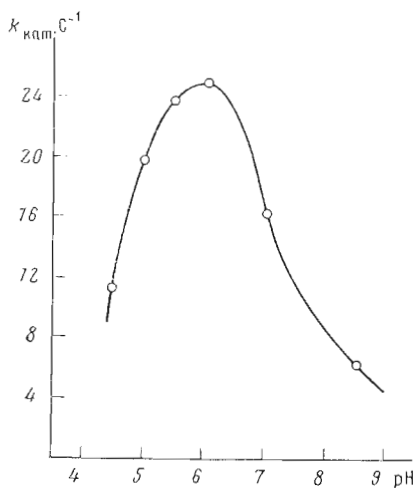


Рис. 1. pH-Зависимость каталитической константы гидролиза этилового эфира L-лизина, катализируемого трипсином

скорость стадии при каждом значении pH, так как формально получаемые при этом величины pK_a нельзя отнести к какому-либо определенному процессу.

Раздельный анализ pH-зависимостей индивидуальных констант скоростей ферментативного гидролиза субстратов со свободной α -аминогруппой показал, что основная причина «аномальности» pH-зависимостей данных реакций — необычный вид pH-зависимости константы скорости деацилирования, которая имеет практически постоянную величину в кислотной области pH (табл. 1—3). В то же время pH-зависимость константы скорости ацилирования, а также «валовой» константы скорости ферментативной реакции ($k_{\text{кат}}/k_{\text{ин(каж)}}$) имеет нормальный вид, характерный для гидролиза N-ацилированных субстратов (pK_a между 6 и 7) [19]. Различный ход pH-зависимостей констант скоростей ацилирования и деацилирования при гидролизе субстратов со свободной α -аминогруппой вызывает существенное увеличение отношения k_2/k_3 с ростом pH (табл. 1—3). Это в свою очередь приводит к появлению кажущегося оптимума скорости ферментативной реакции именно в той области pH, где происходит смена лимитирующей скорость стадий ферментативного гидролиза** в соответствии с выражением (2). Далее с увеличением отношения k_2/k_3 с ростом pH уменьшается кажущаяся величина константы Михаэлиса (3), хотя, согласно табл. 1—3, величина истинной константы Михаэлиса остается практически постоянной во всей исследованной области pH.

* Хотя правая ветвь pH-зависимости искажена (по-видимому, за счет реакции транспептидации, см. ниже) и не описывается теоретической кривой, кинетические данные свидетельствуют о том, что при значениях pH выше 5,5 лимитирующей скоростью стадий является деацилирование ($k_2 \gg k_3$). На это указывает тот факт, что при данных значениях pH внешние нуклеофильные агенты (*n*-бутанол или 1,4-бутандиол) являются полностью конкурентными, а при pH ниже 5,0 — смешанными ($k_2 \approx k_3$) или неконкурентными ($k_2 \ll k_3$) ингибиторами (см. [16—18]).

** В принципе на положение оптимума pH может оказывать влияние реакция транспептидации, или ферментативный перенос ацильной части субстрата на депротонированную α -аминогруппу субстрата [7, 9, 30—33]. Этот вопрос был детально проанализирован в работе [9], где показано, что данный эффект обычно имеет место при сравнительно высоких начальных концентрациях субстрата (выше 0,1 M), при нейтральных и щелочных значениях pH и проявляется в ингибировании ферментативной реакции субстратом. В нашем случае ни одного из использованных субстратов эффект субстратного ингибирования не наблюдался.

как в случае субстратов со свободной α -аминогруппой левая и правая ветви pH-зависимости относятся к различным лимитирующим скорость стадиям (левая ветвь кривой относится в значительной степени к pH-зависимости константы скорости ацилирования, а правая — к константе скорости деацилирования*). Таким образом, pH-зависимости этих реакций не могут быть формально сопоставлены с pH-зависимостями констант скоростей гидролиза специфических N-ацилированных сложноэфирных субстратов, где лимитирующей скоростью стадий во всем используемом интервале pH обычно является деацилирование [15]. По этой же причине лишена смысла количественная обработка кривых pH-зависимостей ферментативных реакций гидролиза субстратов со свободной α -аминогруппой без предварительного определения лимитирующей

Таблица 1

Влияние pH на кинетические параметры гидролиза этилового эфира *L*-лизина, катализируемого трипсином

pH	$k_{кат.}$, с ⁻¹	K_m^* (каж), мМ	k_2 , с ⁻¹	k_3 , с ⁻¹	k_2/k_3 **	k_2/k_3 ***	k_4/k_3 , М ⁻¹	[S] ₀ ****, мМ
4,5	11,2	78,4	22±2	23±3	1,0±0,2	1,0	3,6±0,3	25-200
5,0	19,7	37,0	75±10	27±2	2,8±0,5	2,1	3,4±0,4	13-100
5,5	23,5	12,5	259±50	26±2	10±2	7,5	3,1±0,5	13-80
6,0	24,7	6,33	543±70	16±1	21±3	13	4,0±0,3	5-40
7,0	16,1	3,10				$k_2 \gg k_3$		1,3-10
8,5	6,2	2,04				$k_2 \gg k_3$		0,5-4

* В области pH 4,5-6,0 истинная константа Михаэлиса равна 0,14±0,02 М.

** Определено из pH-зависимости реакции.

*** Определено с использованием дополнительного нуклеофильного агента, *n*-бутанола (0,14-0,28 М, или 1,3-2,6%).

**** Начальные концентрации субстрата.

Таблица 2

Влияние pH на кинетические параметры гидролиза производных *D*-аминокислот, катализируемого трипсином

Субстрат	pH	$k_{кат.}$, с ⁻¹	K_m^* (каж), мМ	k_2 , с ⁻¹	k_3 , с ⁻¹	k_2/k_3 **	k_2/k_3 ***	[S] ₀ , мМ
<i>D</i> -LysOMe	4,5	0,47	147	0,8±0,1	1,14±0,08	0,7±0,2	1,0	33-250
	5,0	0,85	56,2	3,7±0,5	1,10±0,06	3,4±0,7	3,8	13-100
	6,0	1,10	11,4	24±4	1,15±0,07	21±4	14	6,7-50
<i>D</i> -ArgOMe	4,5	0,22	91	0,51±0,06	0,39±0,06	1,3±0,3	3,2	33-250
	5,0	0,37	45	1,7±0,3	0,47±0,05	3,7±0,9		33-100
	5,5	0,42	16,7	5,4±0,8	0,46±0,04	12±2		13-100
	6,0	0,43	5,93	15,1±2,5	0,44±0,05	34±6		3-27

* В области pH 4,5-6,0 истинная константа Михаэлиса равна 0,25±0,05 М для *D*-LysOMe и 0,21±0,05 М для *D*-ArgOMe.

** Определено из pH-зависимости реакции.

*** Определено с использованием дополнительного нуклеофильного агента *n*-бутанола (0,14-0,28 М), величина k_4/k_3 равна 3,6±0,4 М⁻¹ для обоих субстратов.

Таблица 3

Влияние pH на кинетические параметры гидролиза этилового эфира *L*-тирозина, катализируемого α -химотрипсином

pH	$k_{кат.}$, с ⁻¹	K_m^* (каж), мМ	k_2 , с ⁻¹	k_3 , с ⁻¹	k_2/k_3 **	k_2/k_3 ***	k_4/k_3 , М ⁻¹	[S] ₀ , мМ
4,0	0,63	50	0,63	$k_3 \gg k_2$	<0,1	<0,1	5,0±0,6	3,3-20
5,5	22,3	22	38±5	54±12	1,2±0,3	0,7±0,2	5,7±0,5	2,7-20
6,5	55,2	10,5	265±30	69±10	3,8±0,5	3,7±0,4	6,1±0,9	2,0-20

* В области pH 4,0-6,5 истинная константа Михаэлиса равна (4,2±0,8)·10⁻² М.

** Определено из pH-зависимости реакции.

*** Определено с использованием дополнительного нуклеофильного агента, 1,4-бутандиола (0,11-0,22 М).

Определение индивидуальных констант из pH-зависимости ферментативного гидролиза. Особенности кинетики действия трипсина и α -химотрипсина на субстраты со свободной α -аминогруппой предоставляют возможность отдельно определять константы скоростей промежуточных стадий реакции с помощью pH-зависимости ферментативного гидролиза. Как известно, что если имеется возможность влиять на стадию ацилирования трехстадийной ферментативной реакции с помощью селективно действующего эффектора, это позволяет проводить раздельное определение

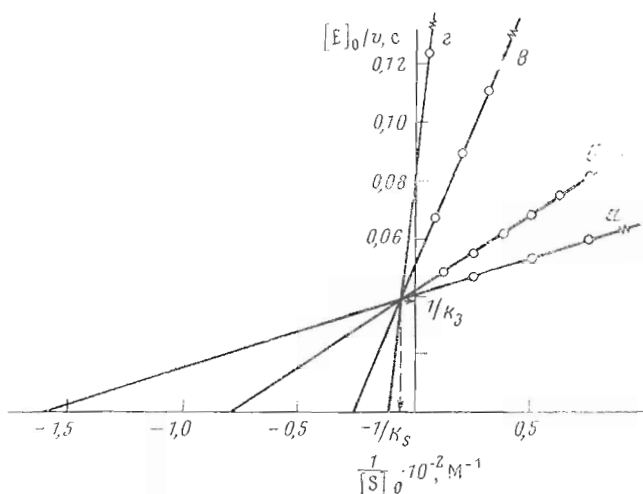


Рис. 2. Влияние рН на зависимости в координатах Лайнуивера — Берка для гидролиза этилового эфира *L*-лизина, катализируемого трипсином. рН: *a* — 6,0; *b* — 5,5; *c* — 5,0; *z* — 4,5. Пунктиром показаны координаты точки пересечения прямых, позволяющие проводить раздельное определение индивидуальных констант

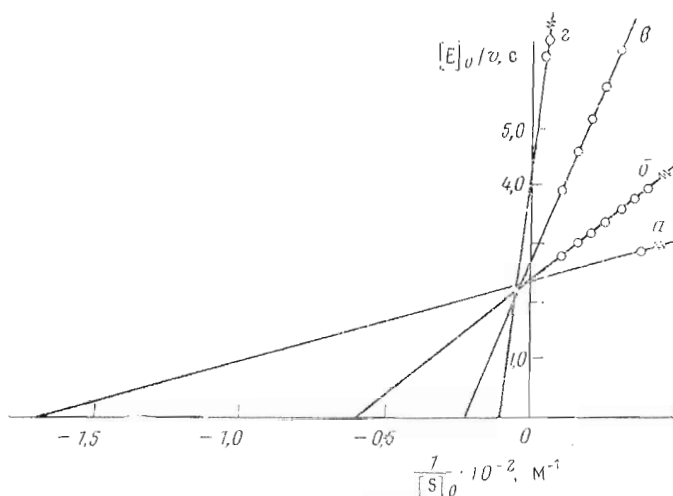


Рис. 3. Влияние рН на зависимости в координатах Лайнуивера — Берка для гидролиза метилового эфира *D*-аргинина, катализируемого трипсином: рН: *a* — 6,0; *b* — 5,5; *c* — 5,0; *z* — 4,5

индивидуальных констант (k_2 , k_3 , k_s) независимо от конкретного механизма действия эффектора [16]. Именно этот случай имеет место при гидролизе субстратов со свободной α -аминогруппой, где таким эффектором является ион водорода. Из табл. 1—3 следует, что увеличение концентрации ионов водорода приводит к уменьшению константы скорости ацилирования и не влияет (в области рН 4—6) на величины констант скоростей деацилирования и истинной константы Михаэлиса. В этом случае зависимости в координатах Лайнуивера — Берка, соответствующие различным значениям рН, пересекаются в левом верхнем квадранте в общей точке с координатами

$$\begin{aligned} [E]_0/v &= 1/k_3, \frac{v}{[E]_0} \\ 1/[S]_0 &= -1/K_s \end{aligned}$$

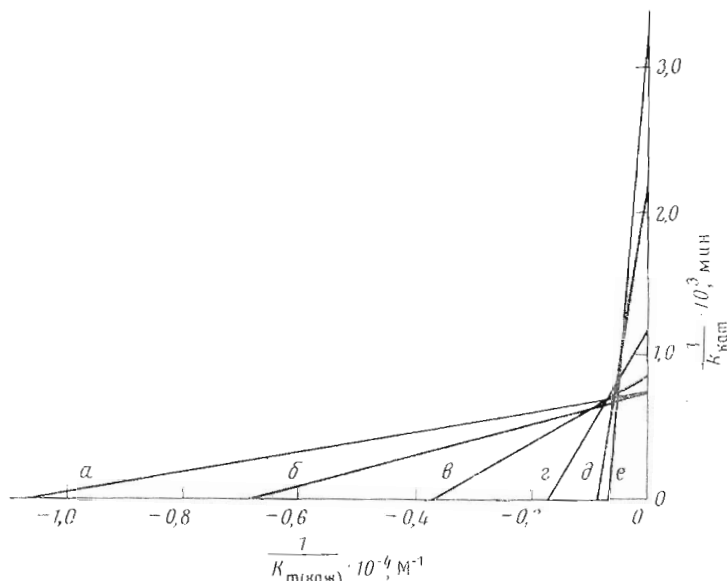


Рис. 4. Влияние рН на эффективные кинетические параметры гидролиза *n*-нитробензильного эфира *L*-фенилаланина, катализируемого α -химотрипсином. рН: *a* — 6,25; *б* — 6,0; *в* — 5,5; *г* — 5,0; *д* — 4,5; *e* — 4,25. Значения $K_{m(\text{каж})}$ и $k_{\text{кат}}$ как функции рН взяты из работы [8]

(см. рис. 2, 3). Таким же образом можно проводить построение в координатах $(1/k_{\text{кат}}, 1/K_{m(\text{каж})})$, где координаты точки пересечения прямых будут равны

$$\begin{aligned} 1/k_{\text{кат}} &= 1/k_3, \\ 1/K_{m(\text{каж})} &= -1/K_s. \end{aligned}$$

Определив значения k_3 и K_s , из выражений (2) или (3) можно рассчитать величину k_2 . Как видно из табл. 1—3, отношения k_2/k_3 , рассчитанные из рН-зависимостей ферментативных реакций, удовлетворительно согласуются с этими отношениями, определенными с помощью добавленных нуклеофильных агентов.

Для иллюстрации предложенного метода определения индивидуальных констант на рис. 4 и в табл. 4, 5 приведены примеры использования для этой цели литературных данных для реакций ферментативного гидролиза субстратов со свободной α -аминогруппой. Очевидно, что общей особенностью этих реакций является сохранение постоянной величины константы скорости деацилирования наряду с увеличением константы скорости ацилирования при возрастании рН.

Стереоспецифичность. Из табл. 1, 2 видно, что рН-зависимости индивидуальных констант скоростей трипсина гидролиза производных *L*- и *D*-аминокислот со свободной α -аминогруппой сходны. «Отношение стереоспецифичности» $(k_{\text{кат}}/K_m)_L / (k_{\text{кат}}/K_m)_D$ для эфиров лизина практически не изменяется при варьировании рН от 4,5 до 6,0 и равно 40 ± 4 при значительном изменении абсолютных величин каталитических констант (табл. 1, 2). Другими словами, характер влияния α -аммониевой группы *L*- и *D*-субстратов на кинетику действия трипсина с изменением рН изменяется аналогичным образом. Так как ацилирование трипсина может осуществляться только при правильной ориентации положительно заряженной боковой цепи* (образующей в переходном состоянии реакции ионную пару с остатком Asp¹⁴⁹ активного центра [20, 21]) и реакционно-

* Необходимость положительного заряда в боковой цепи субстрата со свободной α -аминогруппой для гидролиза его трипсином следует из того факта, что трипсин практически неактивен по отношению к метилому эфиру *D*-норвалипа в области рН 5,0—6,0.

Определение индивидуальных констант скоростей гидролиза метилового эфира *L*-лизина, катализируемого трипсином*, из pH-зависимости ферментативной реакции

pH	$k_{кат}$, с ⁻¹	K_m^{**} (каж), мМ	k_2 , с ⁻¹	k_3 , с ⁻¹	k_2/k_3	pH	$k_{кат}$, с ⁻¹	K_m^{**} (каж), мМ	k_2 , с ⁻¹	k_3 , с ⁻¹	k_2/k_3
4,25	10,60	74,0	15,9	31,8	0,5	5,20	28,70	15,8	200	33,4	6,0
4,50	13,55	44,5	34,9	23,2	1,5	5,50	28,35	8,05	397	30,5	13
4,65	19,85	45,0	47,6	34,0	1,4	5,80	30,50	4,60	732	31,8	23
4,80	21,05	34,5	67,4	30,6	2,2	6,00	29,05	3,15	1030	30,4	34
5,00	27,05	24,2	124	34,5	3,6						

* Величины $k_{кат}$ и K_m^{**} взяты из работы [9].

** При всех значениях pH величина истинной константы Михаэлиса равна $0,11 \pm 0,02$ М.

Таблица 5

Определение индивидуальных констант скоростей из pH-зависимостей гидролиза субстратов со свободной α -аминогруппой под действием α -химотрипсина

Субстрат	pH	$k_{кат}$, с ⁻¹	K_m (каж), мМ	k_2 , с ⁻¹	k_3 , с ⁻¹	k_2/k_3	K_S , мМ ****
<i>L</i> -TrpOMe *	4,9	9,7	29,0	13,6	34	0,4	40±10
	5,5	21,8	24,6	34,9	58	0,6	
	5,9	36,0	11,2	130	50	2,6	
	6,2	40,5	1,18	1380	42	33	
<i>L</i> -TrpOEt **	4,0	2,48	9,34	2,66	38	0,07	10±2
	5,0	13,16	7,37	18,5	46	0,4	
	5,5	22,56	4,91	45	45	1,0	
<i>L</i> -PheOEt ***	5,0	9,15	67,8	17,4	19,3	0,9	130±30
	5,2	12,6	57,2	29,4	22,3	1,3	
	5,3	14,0	45,2	40,6	21,4	1,9	
	5,5	12,7	31,4	53,4	16,7	3,2	
	5,8	16,4	21,4	100	19,6	5,1	
	6,0	20,0	16,5	158	22,9	6,9	
	6,2	23,0	14,5	207	25,9	8,0	
<i>L</i> -PheONBE ****	4,25	5,22	1,52	5,2	$k_3 > k_2$	<0,1	1,6±0,3
	4,5	7,73	1,15	10,8	27	0,4	
	5,0	14,5	0,604	39,2	23	1,7	
	5,5	19,7	0,272	116	23,7	4,9	
	6,0	22,6	0,145	248	24,8	10	
	6,25	22,3	0,095	380	23,8	16	

* Значения $k_{кат}$ и K_m (каж) взяты из работы [2]. ** из [3].

*** *p*-Нитробензиловый эфир *L*-фенилаланина; значения $k_{кат}$ и K_m (каж) — из работы [8].

**** Значение истинной константы Михаэлиса постоянно во всем указанном интервале pH.

способного карбоксильного атома углерода субстрата, то очевидно, что определенное фиксирование α -аммониевой группы, ориентированной во взаимно противоположном направлении для *L*- и *D*-субстратов, не обязательно для трипсинового гидролиза.

В этом отношении α -химотрипсин ведет себя иначе, проявляя практически абсолютную стереоспецифичность и катализируя гидролиз только производных *L*-аминокислот [2, 8]. По-видимому, пространственное строение активного центра трипсина допускает определенную свободу перемещения α -аммониевой группы субстрата в реакционноспособном фермент-субстратном комплексе с эфирами *D*- и *L*-аминокислот. Правда, эта свобода довольно ограничена и утрачивается в случае *N*-ацилированных субстратов (где величины «относительной стереоспецифичности» достигают нескольких тысяч [22]). Итак, стереоспецифичность трипсина по отношению к субстратам со свободной α -аминогруппой минимальна по сравнению со стереоспецифичностью трипсина и α -химотрипсина по отношению ко всем другим известным субстратным сериям.

Диаграммы свободных энергий. Анализ субстратной специфичности ферментов удобно проводить в рамках теории переходного состояния, используя энергетические диаграммы ферментативной реакции*. В реакциях гидролиза субстратов со свободной α -аминогруппой, катализируемых трипсином и α -химотрипсином, уменьшение pH во всех случаях приводит к уменьшению значений стандартной свободной энергии как переходных состояний реакций ацилирования и деацилирования, так и основного состояния соответствующих ацилферментных промежуточных соединений (рис. 5). Поскольку энергетический уровень фермент-субстратных комплексов не зависит от pH, это в свою очередь вызывает уменьшение свободной энергии активации реакций ацилирования при постоянном значении свободной энергии деацилирования. Кинетическим следствием подобного изменения энергетических диаграмм ферментативных реакций является постоянная величина константы скорости деацилирования в определенном интервале кислотности среды (ниже pH 6).

В реакциях ферментативного гидролиза N-ацилированных производных аминокислот стандартные свободные энергии переходного состояния реакций ацилирования и деацилирования также уменьшаются с увеличением pH, что объясняется увеличением доли активной, депротонированной карбоксильной группы остатка Asp¹⁰² «системы переноса заряда» активного центра. Однако величина стандартной свободной энергии образования ацилферментного промежуточного соединения в реакциях гидролиза N-ацилированных субстратов постоянна в широком интервале pH и в случае α -химотрипсина приблизительно равна стандартной свободной энергии образования фермент-субстратного комплекса [24]. Именно в этом и заключается основное различие в механизме ферментативного гидролиза N-ацилированных субстратов и субстратов со свободной α -аминогруппой.

Окружение α -аммониевой группы субстрата различается в фермент-субстратном комплексе и в ацилферменте, причем с уменьшением pH неблагоприятные взаимодействия этой группы с активным центром возрастают, приводя к дестабилизации ацилфермента (рис. 5). Этот эффект можно объяснить, например, конформационным изменением активного

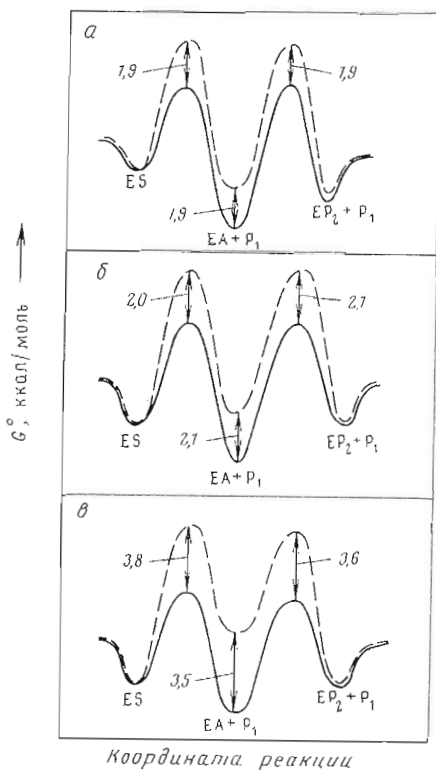


Рис. 5. Изменения стандартной свободной энергии по формальной координате реакции для трипсинового гидролиза этилового эфира L-лизина (а) и метилового эфира D-лизина (б) и химотрипсинового гидролиза этилового эфира L-тирозина (в). Сплошные линии рассчитаны для pH 6,0 (а), 6,0 (б) и 6,5 (в), пунктирные — для pH 4,5 (а), 4,5 (б), 4,0 (в). Расчеты проведены для неионизованных форм продуктов

* В данном случае вместо истинной координаты реакции, принятой в химической кинетике и относящейся к пространственным координатам реагирующих атомов (см. [23]), используется формальная координата реакции, соответствующая последовательности исходных и промежуточных (кинетически значимых) состояний фермента. Определенный смысл здесь придается только минимумам и максимумам, соответствующим свободным энергиям метастабильных и переходных состояний ферментативной реакции, в то время как соединяющие их кривые лишены физического смысла.

центра после завершения стадии ацилирования, результатом чего является перемещение α -аммониевой группы с образованием термодинамически невыгодного контакта с сорбционным участком активного центра. Из кинетических данных известно [24], что N-ацильная группа аминокислотного субстрата «экстрагируется» при связывании гидрофобным участком фермента. Естественно, переход положительно заряженной α -аммониевой группы в гидрофобное окружение — термодинамически невыгодный процесс, приводящий к увеличению уровня свободной энергии основного состояния ацилфермента при уменьшении рН (при увеличении степени протонирования α -аминогруппы субстрата).

Заключение. Аномальные рН-зависимости реакций гидролиза субстратов со свободной α -аминогруппой, катализируемых трипсином и химотрипсином, обусловлены различной рН-зависимостью констант скоростей ацилирования и деацилирования ферментативной реакции. Это в свою очередь вызывается конформационным изменением активного центра фермента при переходе от комплекса Михаэлиса (где α -аминогруппа субстрата находится в полярном окружении) к ацилферментному промежуточному соединению (где α -аминогруппа субстрата находится в гидрофобном окружении). Таким образом, свободная энергия комплекса Михаэлиса не зависит от степени ионизации субстрата, в то время как свободная энергия ацилфермента возрастает при увеличении степени ионизации α -аминогруппы субстрата с $pK_a \sim 7$. В этом заключается основное отличие реакций ферментативного гидролиза субстратов со свободной α -аминогруппой от N-ацилированных субстратов, состояние которых не зависит от рН среды.

Экспериментальная часть

Трипсин и α -химотрипсин — кристаллические препараты Ленинградского мясокомбината им. С. М. Кирова. Ферменты растворяли в 10^{-3} М НСl и хранили в холодильнике. Концентрацию активных центров запасных растворов трипсина и α -химотрипсина определяли титрованием *n*-нитрофениловым эфиром *n'*-гуанидинбензойной кислоты [25] и N-трансцианамойлимидазолом [26] соответственно. Сложные эфиры α -аминокислот L-LysOMe, L-LysOEt, D-LysOMe, D-ArgOMe (все дихлоргидраты) и L-Tyr OEt (хлоргидрат) синтезировали по стандартным методикам [27].

Кинетику ферментативного гидролиза субстратов изучали при помощи регистрирующего рН-стага (Radiometer ТТТ-1с, Дания) в водных растворах при ионной силе 0,1 (КСl или СаСl₂) и $25 \pm 0,2^\circ$. Постоянное значение рН в реакционной системе поддерживали добавлением в термостатируемую ячейку (объемом 10 мл) 0,01 н. КОН. Стационарную скорость ферментативной реакции измеряли в начальный период времени. Так как pK_a α -аминогруппы субстратов (обычно равное 7,2) значительно ниже по сравнению с величинами pK_a α -аминогруппы аминокислот, образующихся в результате ферментативного гидролиза (равными 8,95—9,24 для различных аминокислот в настоящей работе), при изучении кинетики гидролиза субстратов в области рН 6,0—8,5 вводилась соответствующая поправка на поглощение протонов продуктом реакции.

В ряде работ [7, 9, 30—33] было найдено, что ферментативный гидролиз сложных эфиров аминокислот со свободной α -аминогруппой сопровождается образованием продуктов транспептидации — олигопептидов, что в свою очередь может вызывать искажения кинетических кривых. Детальный кинетический анализ транспептидации [9] показал, что данный эффект проявляется в заметной степени лишь при значениях рН, превышающих величину pK_a α -аминогруппы субстрата. Исходя из этого, все кинетические расчеты в настоящей работе проводили для значений рН не более 6,5.

Построение энергетических диаграмм ферментативных реакции осуществляли согласно [24], используя численные значения индивидуальных констант k_2 , k_3 и K_s (схема 1), а также величину константы равновесия образования ацилфермента из исходного субстрата и свободного фермента:



Из схемы (1) вытекает, что константа равновесия данного процесса определяется соотношением

$$K_{\text{равн}} = k_2/K_s k_{-2},$$

где k_{-2} — константа скорости реакции ацилфермента с продуктом P_1 , действующим в качестве внешнего нуклеофильного агента. Так как в настоящей работе вместо продукта P_1 (метанола или этанола) использовали 1,4-бутандиол или *n*-бутанол (в реакциях, катализируемых α -химотрипсином и трипсином соответственно), на опыте определяется величина

$$\alpha K_{\text{равн}} = k_2/K_s k_4, \quad (5)$$

где α равна отношению констант скоростей деацилирования ацилфермента 1,4-бутандиолом или бутанолом, с одной стороны, и продуктом P_1 — с другой. Численные значения констант равны 3 (для пары 1,4-бутандиол — метанол), 6 (для пары 1,4-бутандиол — этанол), 2,9 (*n*-бутанол — метанол) и 7,8 (*n*-бутанол — этанол) [24, 28, 29]. При известных величинах α соотношение (5) позволяет рассчитать стандартную свободную энергию образования ацилферментного промежуточного соединения.

Автор благодарит чл.-кор. АН СССР, проф. И. В. Березина за интерес и постоянную помощь в работе.

ЛИТЕРАТУРА

1. Del Castillo L. M., Castañeda-Agullo M. (1975) The First Chem. Congress North Amer. Continent, Mexico, Abstr. No. 153.
2. Kezdy F. J., Jindal S. P., Bender M. L. (1972) J. Biol. Chem., **247**, 5746—5762.
3. Johnson P. E., Stewart J. A. (1972) Arch. Biochem. and Biophys., **149**, 295—306.
4. Seydoux F., Jon J. (1967) Eur. J. Biochem., **3**, 42—54.
5. Stewart J. A., Anderson J. K., Tseng J. K., Hallada R. M. (1974) Biochem. and Biophys. Res. Commun., **42**, 1220—1227.
6. Del Castillo L. M., Castañeda-Agullo M. (1971) Biochim. et biophys. acta, **235**, 358—369.
7. Purdie J. E., Demayo R. E., Seely J. H., Benoiton N. L. (1972) Biochim. et biophys. acta, **268**, 523—526.
8. Purdie J. E., Benoiton N. L. (1970) Can. J. Biochem., **48**, 1058—1065.
9. Seydoux F. (1970) Eur. J. Biochem., **17**, 209—217.
10. Del Castillo L. M., Davila G., Dorantes L., Oliver C., Ibarra R., Castañeda-Agullo M. (1969) Biochim. et biophys. acta, **191**, 354—361.
11. Castañeda-Agullo M., Davila C., Oliver C., Cruz T., Del Castillo L. M. (1969) Biochim. et biophys. acta, **191**, 362—369.
12. Go'denberg H., Goldenberg V. (1950) Arch. Biochem., **29**, 154.
13. Goldenberg H., Goldenberg V., McLaren A. D. (1951) Biochim. et biophys. acta, **7**, 110—114.
14. Брюс Т., Бенкович С. (1970) Механизмы биоорганических реакций, с. 251—253, «Мир», М.
15. Bender M. L., Kezdy F. J. (1965) Ann. Rev. Biochem., **34**, 49—76.
16. Березин И. В., Клесов А. А. (1976) Практический курс химической и ферментативной кинетики, с. 144—147, Изд. МГУ.
17. Berezin I. V., Kazanskaya N. F., Klyosov A. A. (1974) FEBS Lett., **45**, 121—124.
18. Березин И. В., Казанская Н. Ф., Клесов А. А. (1971) Биохимия, **36**, 108—117.
19. Blow D. M., Steitz T. A. (1970) Ann. Rev. Biochem., **39**, 63—100.
20. Krieger M., Kay L. M., Stroud R. M. (1974) J. Mol. Biol., **83**, 209—230.
21. Bode W., Schwager P. (1975) J. Mol. Biol., **98**, 693—717.
22. Клесов А. А. (1977) Биоорганич. химия, **3**, 1100—1110.
23. Глестон С., Лейдасер К., Эйринг Г. (1948) Теория абсолютных скоростей реакций, Изд-во ивостр. лит., М.
24. Martinek K., Klyosov A. A., Kazanskaya N. F., Berezin I. V. (1974) Int. J. Chem. Kinetics, **6**, 801—811.

25. Chase T., Jr., Shaw E. (1967) *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, **29**, 508—514.
26. Schonbaum G. R., Zerner B., Bender M. J. (1961) *J. Biol. Chem.*, **236**, 2930—2935.
27. Гринштейн Дж., Виниц М. (1965) *Химия аминокислот и пептидов*, «Мир», М.
28. Клесов А. А., Андреев В. М., Березин И. В. (1974) *Биохимия*, **39**, 1222—1230.
29. Seydoux F., Yon J., Nemethy G. (1969) *Biochim. et biophys. acta*, **171**, 145—146.
30. Каганов И. Л., Орехович В. Н. (1954) *Докл. АН СССР*, **95**, 1259—1262.
31. Козлов Л. В., Дьяченко Е. Д., Антонов В. К. (1977) *Биооргани. химия*, **3**, 105—110.
32. Fastrez J., Fersht A. R. (1973) *Biochemistry*, **12**, 2025—2034.
33. Fersht A. R., Blow D. M., Fastrez J. (1973) *Biochemistry*, **12**, 2035—2041.

Поступила в редакцию
7.IV.1977

**α -CHYMOTRYPSIN AND TRYPSIN CATALYZED HYDROLYSIS OF AMINO
ACID ESTERS HAVING FREE α -AMINO GROUP. pH-DEPENDENCE
OF THE INDIVIDUAL RATE CONSTANTS AND STEREOSPECIFICITY**

KLYOSOV A. A.

Department of Chemistry, M. V. Lomonosov State University, Moscow

For amino acid esters bearing a free α -amino group, the trypsin and α -chymotrypsin catalyzed hydrolysis is characterized by different pH-dependences for the acylation and deacylation reactions. This effect results in the growth of k_2/k_3 ratio upon increase in pH value. As a consequence, the catalytic rate constants have a maximum in the acid pH range where the rate-limiting individual constants change. The left part of the bell-shaped pH-dependence of k_{cat} corresponds to the ratio $k_2 < k_3$, pH-optimum is observed at $k_2 \sim k_3$, whereas the right branch corresponds to the $k_2 > k_3$ ratio. A procedure is developed for determination of the individual rate constants for trypsin and α -chymotrypsin catalyzed hydrolyses of non-N-acylated substrates from the intersection of Lineweaver — Burk plots at different pH values. An analysis of the free energy profiles led to the conclusion that the anomalous pH-rate profiles for trypsin and α -chymotrypsin catalyzed hydrolysis of amino acid esters are due to the fact that the apparent standard free energy of the ground state of the acyl-enzyme intermediate depends on the degree of ionization of the substrate α -amino group ($pK_a \sim 7$), which is not the case in the enzymatic hydrolysis of N-acylated substrates.
