



УДК 577.155.3.02

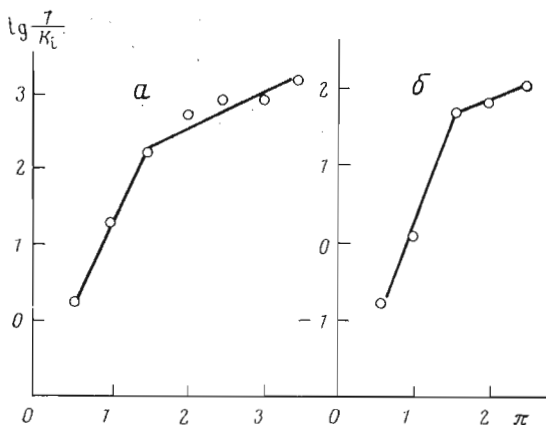
ИЗУЧЕНИЕ ТОПОГРАФИИ АКТИВНОГО ЦЕНТРА  
ПЕНИЦИЛЛИНАМИДАЗЫ ИЗ *E. COLI*II. РОЛЬ ГИДРОФОБНЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ В СПЕЦИФИЧНОСТИ  
ИНГИБИРОВАНИЯ ФЕРМЕНТА \**Глесов А. А., Швядас В.-Ю. К., Галаев И. Ю.**Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова,  
химический факультет*

Эффективность ингибирования пенициллинамидазы серией алифатических спиртов возрастает с увеличением гидрофобности спирта. Полученные данные не укладываются в рамки «экстракционной» модели ингибирования и свидетельствуют о необычном, «двойном» уменьшении свободной энергии связывания ингибиторов с ферментом. Найденные зависимости являются экспериментальным подтверждением ранее обоснованной «конформационно-сольватационной» модели взаимодействия субстратов или ингибиторов с ферментом, согласно которой: а) гидрофобная «полость» активного центра фермента в основном состоянии имеет термодинамически невыгодный контакт с окружающей средой, б) в результате гидрофобного взаимодействия ингибитора (субстрата) с ферментом вода вытесняется из активного центра.

В предыдущей статье [1] нами был проведен детальный ингибиторный анализ топографии активного центра пенициллинамидазы (пенициллин-амидогидролаза, КФ 3.5.1.11) из *E. coli* и показано, что в состав активного центра входит сорбционный участок, имеющий гидрофобную природу и принимающий участие в связывании алифатических спиртов. Рассмотрение структуры наиболее специфических субстратов пенициллинамидазы, как правило производных фенилуксусной кислоты [2, 3], также свидетельствует о важной роли гидрофобных взаимодействий в катализе данным ферментом. Более того, структура ацильной группы субстратов пенициллинамидазы практически полностью определяет ее субстратную специфичность, причем с увеличением гидрофобности ацильной группы субстратов (до производных фенилуксусной кислоты) резко возрастает каталитическая активность пенициллинамидазы (по принципу «лучшее связывание — лучший катализ» [4—6]).

Для изучения протяженности гидрофобной области активного центра фермента, а также для выяснения термодинамических закономерностей образования фермент-субстратного или фермент-ингибиторного комплекса в последнее время широко применяется корреляционный анализ с использованием констант гидрофобности Ганша для функциональных заместителей в молекуле субстрата или ингибитора [5—8]. Если в системе имеют место гидрофобные взаимодействия между активным центром фермента и аполярными фрагментами молекулы ингибитора, то при систематическом изменении гидро-

\* Сообщение I см. [1].



Влияние гидрофобности углеводородных радикалов спиртов ( $\pi$ -константа гидрофобности Ганша) на величины констант ингибирования пенициллинамидазы из *E. coli* в реакции ферментативного гидролиза *n*-нитроанилида фенилуксусной кислоты (со спиртами — от метилового до гептилового) (а) и бензилпенициллина (со спиртами от метилового до амилового) (б)

фобности ингибитора, согласно принципу линейности свободных энергий (см. [9]), должно выполняться соотношение

$$\lg 1/K_i = a\pi + \text{const}, \quad (1)$$

где  $K_i$  — константа диссоциации комплекса фермент — ингибитор,  $\pi$  — константа гидрофобности Ганша для заместителя, варьирующегося в изучаемом ряду ингибиторов. Естественно, данное соотношение учитывает лишь гидрофобные взаимодействия между ингибитором и активным центром фермента и не учитывает протяженность и конфигурацию гидрофобного участка активного центра, а также другие стерические факторы, относящиеся к взаимодействию ингибитор — фермент.

Величины «гидрофобности» заместителей могут быть также выражены значениями стандартной свободной энергии переноса функциональной группы ингибитора из воды в неводный растворитель,  $\Delta\Delta G_{\text{trans}}$  [6], которая связана с константой гидрофобности Ганша простым линейным соотношением

$$\Delta\Delta G_{\text{trans}} = -2,3 RT\pi. \quad (2)$$

В качестве стандартной системы мы будем далее рассматривать систему вода — октанол, относительно которой к настоящему времени имеется наибольшее число исследований (см. [7, 8]).

На рисунке приведены данные, которые позволяют сопоставить значения констант ингибирования пенициллинамидазы алифатическими спиртами, с одной стороны, и соответствующие значения констант гидрофобности неполярных радикалов в молекуле спирта — с другой. Так как константы ингибирования фермента отражают переход молекулы ингибитора из воды в окружение активного центра, а константы гидрофобности — переход ингибитора (точнее, его аполярной группы) из воды в неводный растворитель, то из приведенного рисунка можно сделать вывод о взаимоотношении между этими двумя процессами. Следует отметить, что в случае  $\alpha$ -химотрипсина [5, 6, 10] и карбоксипептидазы А [11, 12] значения тангенсов угла наклона подобных зависимостей были равны единице, что указывает на простой «экстракционный» механизм связывания ингибиторов с этими двумя ферментами [6]. Однако в случае пенициллинамидазы значения тангенсов угла наклона прямых на рисунке для первых членов ряда равно  $\sim 2$ . Характер полученных данных не укладывается в рамки «экс-



Можно полагать, что механизм действия пенициллинамидазы отличается от механизма действия  $\alpha$ -химотрипсина тем, что в случае пенициллинамидазы свободная энергия сорбции субстрата реализуется уже на стадии связывания, а не перераспределяется между стадиями связывания и ацилирования, как в случае химотрипсина [6]. В этом смысле даже такие простые ингибиторы пенициллинамидазы, как алифатические спирты, могут рассматриваться как аналоги переходного состояния ферментативной реакции.

При обсуждении данных рисунка следует также отметить наличие двух характерных областей представленных зависимостей. Если первая область (между метанолом и *n*-пропанолом) характеризуется резкой зависимостью константы ингибирования от гидрофобности спиртов, то при переходе от *n*-пропанола к алифатическим спиртам с более гидрофобными (или протяженными) аполярными группами наблюдается существенно менее выраженная зависимость эффективности ингибирования пенициллинамидазы от гидрофобности углеводородного радикала спирта. Интересно, что подобные данные были также получены для связывания алифатических спиртов с  $\alpha$ -химотрипсином [10], трипсином [17] и папаином [18] и во всех случаях излом на зависимости логарифма константы ингибирования от константы гидрофобности приходился на *n*-пропиловый или *n*-бутиловый спирт. Этот эффект обусловлен по меньшей мере двумя причинами.

Во-первых, следуя за Немети и Шерагой [19], можно предположить, что для протяженных метиленовых цепей в водном растворе имеет место внутримолекулярное гидрофобное взаимодействие. В таком случае переход длинноцепочечных углеводородных групп из воды в неполярную среду должен характеризоваться меньшими значениями свободных энергий на метиленовую группу и, следовательно, худшими значениями констант ингибирования, чем для низших членов реакционной серии \*. Это предположение было сделано на основании данных по растворимости *n*-алканов в воде [20]. Напротив, Бенджамин [21] продемонстрировал линейный характер зависимости термодинамических параметров растворения алканов ( $C_1 - C_{12}$ ) от длины углеводородной цепи. Таким образом, вопрос о существовании внутримолекулярных гидрофобных взаимодействий и их роли в эффективности переноса алифатических углеводородов из воды в органический растворитель остается пока открытым.

Во-вторых, наблюдаемые изломы зависимостей (рисунок) могут также отражать конфигурацию или протяженность гидрофобной области активного центра фермента. В этом случае любопытным представляется качественное совпадение соответствующих зависимостей для пенициллинамидазы, химотрипсина, трипсина и папаина (см. выше). Маловероятно, чтобы это совпадение было случайным, и оно должно или определяться какими-либо общими физико-химическими закономерностями, или отражать реальное сходство топографии активного центра данных ферментов.

В заключение следует еще раз подчеркнуть, что применение изохимического ряда ингибиторов для исследования топографии активного центра пенициллинамидазы и использование корреляционных соотношений типа «структура — реакционная способность» позволило экспериментально обнаружить неизвестный до настоящего времени механизм реализации свободной энергии переноса углеводородных фрагментов ингибитора из воды в неполярную область активного центра фермента. Этот механизм приводит к необычайно высокой «специфичности связывания» пенициллинамидазы, что выражается в свою очередь в резкой зависимости констант ингибирования пенициллинамидазы от длины углеводородной цепи ингибитора.

\* В цитируемой работе Ганша [8] значения констант гидрофобности для углеводородных радикалов спиртов от *n*-пропанола до *n*-гептанола были рассчитаны экстраполяцией экспериментальных данных для низших спиртов.

## Экспериментальная часть

Характеристики препарата пенициллинамидазы из *E. coli*, а также бензилпенициллина описаны в работе [22]. *n*-Нитроанилид фенилуксусной кислоты был синтезирован на кафедре химической энзимологии МГУ по стандартной методике [23].

Методы изучения кинетики гидролиза *n*-нитроанилида фенилуксусной кислоты и бензилпенициллина, катализируемых пенициллинамидазой, а также обработка данных по ингибированию ферментативного гидролиза спиртами описаны в предыдущем сообщении [1].

Константы ингибирования пенициллинамидазы определяли при 25°, в реакции ферментативного гидролиза *n*-нитроанилида фенилуксусной кислоты — в 0,1 М фосфатном буфере, рН 7, в присутствии 1% диметилсульфоксида, при гидролизе бензилпенициллина — в безбуферной среде (рН 7,5), 0,1 М КСl.

Авторы благодарят чл.-кор. АН СССР проф. И. В. Березина и К. Мартинекка за интерес к работе и полезные дискуссии, а также проф. Е. М. Савицкую и П. С. Ныс за любезное предоставление препарата пенициллинамидазы.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Клесов А. А., Галаев И. Ю., Швядас В. К. (1977) Б биоорг. химия, 3, 663—372
2. Каррингтон Т. Р. (1972) Антибиотики, 17, 197—204.
3. Cole M. (1969) Biochem. J., 115, 741—745.
4. Knowles J. R. (1965) J. Theor. Biol., 9, 213—228.
5. Berezin I. V., Kazanskaya N. F., Klyosov A. A., Martinek K. (1971) FEBS Lett., 15, 125—128.
6. Martinek K., Klyosov A. A., Kazanskaya N. F., Berezin I. V. (1974) Int. J. Chem. Kinet., 6, 801—811.
7. Hansch C., Coats E. (1970) J. Pharm. Sci., 59, 731—743.
8. Hansch C., Quinlan J. E., Lawrence G. L. (1968) J. Org. Chem., 33, 347—350.
9. Шортер Дж. (1971) Успехи химии, 40, 2081—2101.
10. Berezin I. V., Levashov A. V., Martinek K. (1970) FEBS Lett., 7, 20—22.
11. Klyosov A. A. (1975) Fed. Proc., 34, 523, Abstr. № 1705.
12. Klyosov A. A. (1975) Progress Report, Biophysics Research Laboratory, Harvard Medical School, Boston, Mass.
13. Мартинек К., Левашов А. В., Березин И. В. (1970) Молекулярн. биология, 4, 517—528.
14. Швядас В. К. (1976) Канд. дис. «Кинетика и механизм действия пенициллинамидазы», МГУ.
15. Клесов А. А. (1971) Сб. трудов научн. конференции межфакультетской лаб. биоорг. химии МГУ, с. 261—271.
16. Структура и функции активных центров ферментов (1974) с. 35—36, «Наука», М.
17. Клесов А. А. (1972) Канд. дис. «Взаимосвязь структуры и реакционной способности субстратов  $\alpha$ -химотрипсина», МГУ.
18. Fink A. L., Bender M. L. (1969) Biochemistry, 8, 5109—5118.
19. Nemethy G., Scheraga H. A. (1962) J. Chem. Phys., 36, 3401—3417.
20. Nemethy G., Scheraga H. A. (1962) J. Phys. Chem., 66, 1773—1790.
21. Benjamin L. (1964) J. Phys. Chem., 68, 3577—3581.
22. Березин И. В., Клесов А. А., Швядас В. К., Ныс П. С., Савицкая Е. М. (1974) Антибиотики, 19, 880—887.
23. Hefnerich V., Böshagen H. (1953) Chem. Ber., 92, 2813—2827.

Поступила в редакцию  
12.XI.1976

STUDY OF THE ACTIVE CENTER TOPOGRAPHY OF PENICILLIN AMIDASE  
FROM *E. COLI*. II. ROLE OF HYDROPHOBICITY IN SPECIFICITY OF THE  
ENZYME INHIBITION

KLYOSOV A. A., SHVYADAS V. K., GALAEV I. Yu.

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

The effectivity of penicillin amidase inhibition by a series of aliphatic alcohols increases with an increase in alcohol hydrophobicity. Analysis of «structure-reactivity» correlations provides evidence for unusual, «double» decrease in the free energy of binding between the inhibitors and the enzyme. The dependences obtained can be considered as an experimental verification of the earlier proposed «conformation-solvation» model of enzyme-substrate (enzyme-inhibitor) interaction. According to this model, a) hydrophobic «pocket» of the enzyme active site in its «ground» state has a thermodynamically unfavorable contact with the environment, b) as a result of hydrophobic interaction between the enzyme and substrate/or inhibitor, water is expelled from the active site.

---