



УДК 577.153.2.02

ИССЛЕДОВАНИЕ ТОПОГРАФИИ АКТИВНОГО ЦЕНТРА
СУБТИЛИЗИНА BPn' *Ротанова Т. В., Васильева Н. В., Гинодман Л. М.,
Антонов В. К.**Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина
Академии наук СССР, Москва*

Метод бифункционального обратимого ингибирования борорганическими кислотами применен к изучению топографии активного центра субтилизина BPn' (КФ 3. 4. 21. 14). Исследовано ингибирующее действие ряда *n*-алкилборных кислот, $N(CH_2)_nB(OH)_2$ ($n = 2-8$), и аралкилборных кислот, $C_6H_5(CH_2)_nB(OH)_2$ ($n = 0, 2-4$), на ферментативную активность субтилизина в реакции гидролиза этилового эфира *N*-ацетил-*L*-тирозина. Из зависимости констант ингибирования от размера углеводородной цепи в молекуле борорганической кислоты сделано заключение о наличии двух гидрофобных зон в связывающем участке активного центра фермента. Высказано предположение о возможности идентификации субстратсвязывающих участков активных центров сериновых гидролаз с помощью борорганических ингибиторов.

В предыдущих работах нами было показано, что метод бифункционального обратимого ингибирования борорганическими кислотами дает важную информацию о топографии активных центров сериновых гидролаз. Были исследованы α -химотрипсин [1—4], щелочная мезентерикопептидаза [5], пенициллинамидаза [6], панкреатическая липаза [7] и установлены характерные черты топографии связывающих участков активных центров этих ферментов.

Все изученные ферменты имеют сходный механизм каталитического действия, обусловленный функционированием в активном центре серин-гистидиновой пары. Именно с этой парой функциональных групп взаимодействует боратная часть борорганических кислот, образуя тетраэдрический аддукт, аналог переходного состояния субстрата в реакциях ацилирования и дезацилирования фермента [8—10]. Это было доказано методом рентгеноструктурного анализа при исследовании комплексов, образуемых фенилборной и фенилэтилборной кислотами с субтилизином BPn' [11]. По-видимому, есть основание считать, что борорганические ингибиторы являются столь же характерным индикатором на сериновые гидролазы, как и известные фосфорорганические ингибиторы (например, ди-*изо*-пропилфторфосфат).

В активных центрах всех исследованных сериновых гидролаз в непосредственной близости от каталитического центра находится гидрофобный связывающий участок. Взаиморасположение этих структурных единиц активного центра, протяженность, а иногда даже форму связывающего участка можно охарактеризовать, изучая ингибирующее влияние гомологического ряда *n*-алкилборных и аралкилборных кислот на соответствующий фермент. Можно предполагать, что у ферментов с близкой специфичностью топография активных центров, определяемая с помощью борорганических кислот, окажется весьма сходной. Исходя из этой предпосылки, нами была исследована топография активного центра

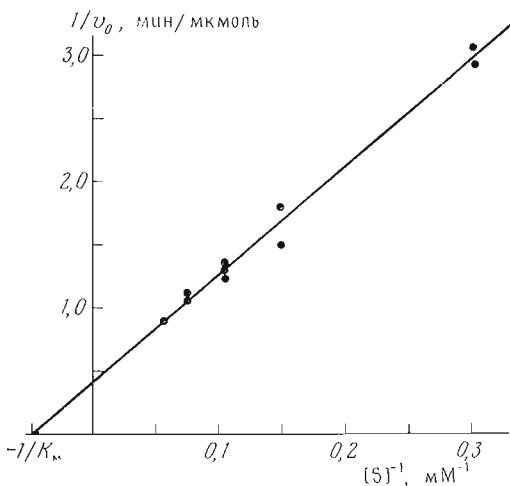


Рис. 1

Рис. 1. Зависимость скорости реакции гидролиза AcTyrOEt субтилизином от концентрации субстрата в координатах Лайнуивера — Берка

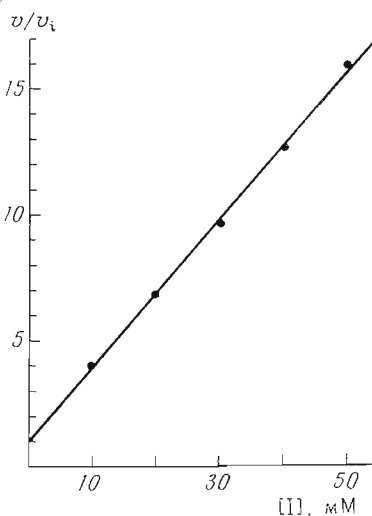


Рис. 2

Рис. 2. Ингибирование гидролиза AcTyrOEt субтилизином под действием *n*-пропилборной кислоты. На оси ординат — величины отношений начальных скоростей ферментативного гидролиза, измеренных в отсутствие (v) и в присутствии (v_i) ингибитора

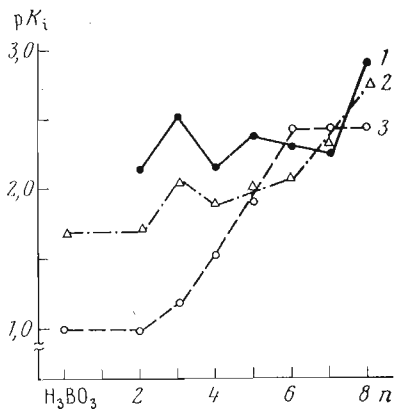


Рис. 3

Рис. 3. Зависимость эффективности ингибирования ферментативной активности субтилизина (1), щелочной мезентерикопептидазы (2) [5] и α -химотрипсина (3) [2] от величины (n) углеводородного радикала в молекуле *n*-алкилборной кислоты $H(CH_2)_nB(OH)_2$

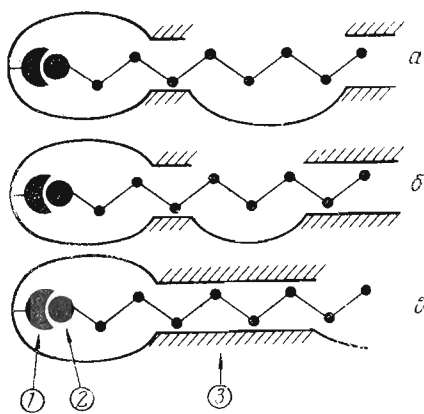


Рис. 4

Рис. 4. Схема топографии активных центров субтилизина (а), щелочной мезентерикопептидазы (б) и α -химотрипсина (в): 1 — каталитический центр, 2 — гидрофобный участок активного центра, 3 — боратная группа борорганической кислоты

субтилизина BPn' , который по специфичности близок к исследованной ранее щелочной мезентерикопептидазе [12, 13].

Было проведено исследование ингибирующего действия ряда *n*-алкилборных кислот общей формулы $H(CH_2)_nB(OH)_2$ ($n = 2-8$) и аралкилборных кислот $C_6H_5(CH_2)_nB(OH)_2$ ($n = 0, 2-4$) на реакцию гидролиза субтилизином этилового эфира *N*-ацетил-*L*-тирозина (AcTyrOEt). Константа Михаэлиса для AcTyrOEt ($K_{m(наж)}$), определенная нами по методу Лайнуивера — Берка, составляет $2,14 \cdot 10^{-2}$ М (рис. 1), что согласуется с литературными данными [14, 15].

Влияние структуры углеводородной части борорганических кислот на их ингибирующую способность в реакции гидролиза AcTyrOEt, катализируемой субтилизинном

H(CH ₂) _n B(OH) ₂		C ₆ H ₅ (CH ₂) _n B(OH) ₂		J(ит-ра)
n	K _i , мМ	n	K _i , мМ	
2	7,64	0	0,231	
3	2,80		0,229	[14]
4	7,20		0,800	[15]
5	4,00	2	0,856	
6	5,00		2,60	[15]
7	5,69	3	2,14	
8	1,51	4	3,30	

* Приведенные значения K_i являются средними арифметическими из 3—5 измерений. Ошибка в определении величин K_i составляет не более ±10%.

Для характеристики ингибирующих свойств борорганических кислот определяли скорость ферментативного процесса при различных концентрациях ингибитора. Линейный тип зависимости, наблюдающийся в широком интервале концентраций для пропилборной кислоты (рис. 2), характерен также для действия и других исследованных борорганических кислот. Принимая во внимание, что ингибирование субтилизина борорганическими кислотами носит конкурентный характер [15], расчет констант ингибирования K_i, представляющих собой константы ассоциации ингибитора со свободной формой фермента ($E + I \rightleftharpoons EI$), проводили по формуле

$$\operatorname{tg} \alpha = \frac{1}{K_i} \cdot \frac{K_{m(\text{каж})}}{K_{m(\text{каж})} + [S]_0},$$

где $\operatorname{tg} \alpha$ — тангенс угла наклона прямой на рис. 2. Полученные значения K_i суммированы в таблице. Там же приведены значения констант ингибирования ферментативной активности субтилизина фенолборной и фенилэтилборной кислотами, известные из литературы [14, 15]. Как видно из данных таблицы, эффективность ингибирования субтилизина борорганическими кислотами сильно зависит от величины и структуры углеводородной части молекулы ингибитора.

Сопоставление полученных данных с известными ранее результатами для мезентерикопептидазы и α-химотрипсина (рис. 3) позволяет сделать следующие заключения.

1. Топография гидрофобных связывающих участков активных центров всех трех ферментов имеет определенное сходство: каталитический и связывающий участки активных центров не примыкают непосредственно, а отстоят друг от друга на расстоянии, соответствующем длине фрагмента цепи из двух метиленовых звеньев (рис. 4). Это обстоятельство не следует рассматривать как неожиданное, поскольку сопоставляемые ферменты являются протеиназами, в молекулах специфических субстратов которых между расщепляемой связью и собственно гидрофобной частью содержится фрагмент, несущий боковую N-ацильную группировку.

2. Связывающие участки активного центра химотрипсина, с одной стороны и субтилизина и мезентерикопептидазы — с другой, имеют, однако, существенные различия, а именно: если в химотрипсине связывающий участок состоит из одной протяженной зоны, соответствующей по длине четырем метиленовым звеньям (рис. 3 и 4), то в субтилизине и мезентери-

копептидазе он состоит из двух зон — первой, связывающей только одну метиленовую группу, и второй, возможно, более протяженной, отстоящей от первой зоны на три (мезентерикопептидаза) или четыре (субтилизин) метиленовых звена (рис. 3 и 4).

Таким образом, субстратсвязывающие участки активных центров субтилизина и мезентерикопептидазы характеризуются общим типом топографии, что согласуется с известными данными по субстратной специфичности этих ферментов [12, 13].

Полученные нами результаты, следовательно, указывают на возможность отнесения сериновых протеиназ к определенным подгруппам на основе изучения топохимии их активных центров с помощью борорганических ингибиторов.

Экспериментальная часть

В работе использовали субтилизин типа BPN' (Sigma, США).

Этиловый эфир N-ацетил-L-тирозина синтезирован по стандартной методике [16]. Борорганические кислоты, $N(CH_2)_nB(OH)_2$ ($n = 2-8$) и $C_6H_5(CH_2)_nB(OH)_2$ ($n = 2-4$), синтезированы по методикам, приведенным в работе [3], фенолборная кислота $C_6H_5B(OH)_2$ — препарат фирмы «Schuchart» (ФРГ). Диметилсульфоксид (ДМСО) — препарат фирмы «Sigma» — использовали без дополнительной очистки. Кислоты, щелочи, соли квалификации х. ч. или ос. ч.

Кинетические измерения. Измерение начальных скоростей ферментативного гидролиза AcTyrOEt субтилизином проводили потенциометрическим методом при постоянном pH на самопишущем pH-стате (ТТТ-60, Radiometer, Дания), снабженном автоматической бюреткой АВU-13. Принцип метода заключается в титровании выделяющейся в ходе реакции кислоты раствором щелочи определенной концентрации.

Реакцию проводили в полистиленовой кювете. Условия опыта: общий объем реакционной смеси 3 мл, pH 8,0, 20°, 0,1 М KCl, 5% ДМСО. Концентрации субстрата в кювете 3,3—16,3 мМ, фермента — $3 \cdot 10^{-8}$ М, алкилборных кислот — 0—50 мМ, фенолалкилборных кислот — 0—4 мМ. В кювету титратора вносили 0,3 мл 1 М KCl, 0,15 мл раствора борорганической кислоты в ДМСО (или 0,15 мл ДМСО — контроль) и рассчитанный объем раствора субстрата в воде, доводили pH до 8,0, после чего добавляли 25—100 мкл раствора фермента и включали автоматическую запись скорости в реакции.

ЛИТЕРАТУРА

1. Антонов В. К., Иванина Т. В., Березин И. В., Мартинек К. (1968) Докл. АН СССР, 183, 1435—1438.
2. Antonov V. K., Ivanina T. V., Berezin I. V., Martinek K. (1970) FEBS Lett., 7, 23—25.
3. Антонов В. К., Иванина Т. В., Березин И. В., Мартинек К. (1970) Молекулярн. биология, 4, 558—559.
4. Antonov V. K., Ivanina T. V., Ivanova A. G., Berezin I. V., Levashov A. V., Martinek K. (1972) FEBS Lett., 20, 37—40.
5. Rotanova T. V., Ivanova A. G., Antonov V. K., Rakadjieva A., Blagoev B. (1976) Int. J. Peptide Protein Res., 8, 225—231.
6. Швядас В.-Ю. К., Клесов А. А., Березин И. В., Ротанова Т. В., Васильева Н. В., Гинопдман Л. М., Антонов В. К. (1976) Тезисы III Всесоюзного симпозиума «Структура и функции активных центров ферментов», с. 25, «Наука», М.
7. Ротанова Т. В., Клаус Р., Иванова А. Г., Гинопдман Л. М., Антонов В. К. (1976) Биоорган. химия, 2, 837—845.
8. Koehler K. A., Lienhard G. E. (1972) Biochemistry, 10, 2477—2483.
9. Robillard G., Schulman R. C. (1974) J. Mol. Biol., 86, 541—558.
10. Nakatani H., Hanai K., Uehara Y., Hiromi K. (1975) J. Biochem. (Tokyo), 77, 905—908.
11. Matthews D. A., Alden R. A., Birktoft J. J., Freer S. T., Kraut J. (1975) J. Biol. Chem., 250, 7120—7126.

12. Karadjova M., Bakardjieva A., Velcheva P. (1970) *Compt. Rend. Acad. Bulg. Sci.*, **23**, 431—434.
13. Karadjova M., Bakardjieva A., Velcheva P. (1971) *Communs. Inst. Microbiol. Bulg. Acad. Sci.*, **22**, 53—60.
14. Philipp M., Bender M. L. (1971) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **68**, 478—480.
15. Lindquist R. N., Terry C. (1974) *Arch. Biochem. and Biophys.*, **160**, 135—144.
16. Parks R. E., Plaut G. W. E. (1953) *J. Biol. Chem.*, **203**, 705—709.

Поступила в редакцию
22.VIII.1977

STUDIES ON THE ACTIVE SITE TOPOGRAPHY OF SUBTILISIN BPN'

ROTANOVA T. V., VASILYEVA N. V., GINODMAN L. M.,
ANTONOV V. K.

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

The method of bifunctional reversible inhibition by organoboronic acids has been applied for studying the active site topography in subtilisin BPN' (EC 3.4.21.14). The inhibitory effect of organoboronic acids $\text{H}(\text{CH}_2)_n\text{B}(\text{OH})_2$ ($n = 2-8$) and $\text{C}_6\text{H}_5(\text{CH}_2)_n \cdot \text{B}(\text{OH})_2$ ($n = 0, 2-4$) on the subtilisin BPN' catalyzed hydrolysis of N-acetyl-L-tyrosine ethyl ester was examined. From the dependence of inhibitory constants on the inhibitor hydrocarbon-chain length it was suggested that two hydrophobic binding subsites are present in the enzyme active site. A possibility of probing substrate-binding sites in the active centers of serine hydrolases with the aid of organoboronic inhibitors was also discussed.
