



УДК 577.150.2

**ЭНАНТИОСЕЛЕКТИВНОСТЬ α -ХИМОТРИПСИНОВОГО
ГИДРОЛИЗА ЭТИЛОВЫХ ЭФИРОВ N-БЕНЗИЛИДЕН-
И N-БЕНЗИЛТРИПТОФАНА****Швадас В. К., Галаев И. Ю., Иванов А. Е.,
Везини И. В.***Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова*

Обнаружено обращение энантиоселективности действия α -химотрипсина по отношению к этиловым эфирам N-бензилиден- и N-бензилтриптофана. D-Изомеры этих субстратов характеризуются константами скорости гидролиза соответственно 0,07 (рН 9,0) и 0,2 с⁻¹ (рН 9,2). Для L-изомеров гидролиз зарегистрировать не удалось. Кинетические параметры спонтанного и ферментативного гидролиза субстратов D-конфигурации получены в интервале рН 8,5–10. Явление обращения энантиоселективности может быть описано с позиций механизма трехточечного связывания молекулы субстрата на активном центре фермента.

В настоящее время α -химотрипсин является одним из наиболее изученных ферментов [1]. Если не рассматривать олигомерные пептиды и белки, то существует два вида эфирных субстратов α -химотрипсина, которые гидролизуются наиболее быстро: N-ацилированные сложные эфиры ароматических α -аминокислот и их аналоги со свободной аминогруппой. Значения $k_{кат}$ для первого класса веществ составляют сотни, а для второго — десятки обратных секунд [1, 2]. Такие высокие скорости превращения субстратов характерны для взаимодействия α -химотрипсина с производными L-аминокислот, т. е. с веществами, обладающими определенной стереохимической конфигурацией. Согласно общепринятому механизму трехточечного связывания [3], молекула L-субстрата, имеющего форму R₂CH(NHR₁)COOR₂, располагается в активном центре α -химотрипсина, как показано на рис. 1. Взаимодействие ациламидной или аминогруппы субстрата с соответствующими группами активного центра фермента необходимо для продуктивного связывания молекулы гидролизующегося эфира. Если удалить из этой молекулы ацилированную аминогруппу, то полученный субстрат будет гидролизываться α -химотрипсином в несколько сот раз медленнее исходного [4]. Проведенный в работах [4, 5] термодинамический анализ роли ациламидной группы субстрата в его связывании с ферментом показал, что взаимодействие этой группы с определенной областью активного центра приводит к более жесткому закреплению молекулы гидролизующегося вещества в каталитически активном положении.

Исследовался также химотрипсиновый гидролиз различных субстратов, амино- или ациламидная группа которых была либо модифицирована, либо вместо нее был введен какой-то другой заместитель. На основании этих исследований и данных рентгеноструктурного анализа сформировалось

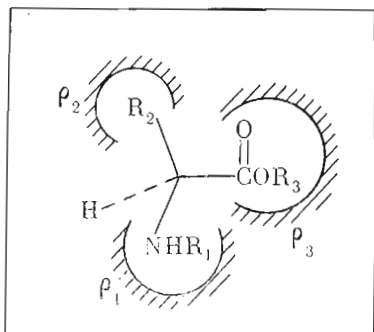


Рис. 1

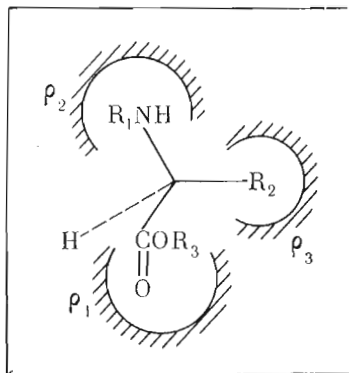


Рис. 2

Рис. 1. Схематическое изображение продуктивного связывания молекулы *L*-субстрата на активном центре α -химотрипсина: $R_1 = \text{H}$ или COCH_3 , R_2 — остаток аминокислоты, R_3 — остаток спирта, ρ_1 — акцептор аминогруппы субстрата, ρ_2 — гидрофобный «карман», ρ_3 — обобщенный нуклеофил активного центра α -химотрипсина

Рис. 2. Непродуктивное связывание *L*-субстрата на активном центре α -химотрипсина. α -Аминогруппа сложного эфира ориентирована в гидрофобный «карман»

представление о том, что ациламидная группа субстрата связывается на активном центре α -химотрипсина путем образования водородной связи с аминокислотным остатком Ser-214, лежащим в области активного центра. Атом водорода предоставляется в этом случае именно аминогруппой или ациламидной группой субстрата [6]. На это указывает, во-первых, то, что превращение атома азота ациламидной группы в третичный (путем метилирования, например) приводит к падению скорости ферментативного гидролиза почти в 4000 раз [3]. Во-вторых, субстрат, где аминогруппа заменена на группу OSCOCH_3 , также гидролизуется α -химотрипсином медленно ($k_{\text{кат}} 0,6 \text{ с}^{-1}$, $K_m 23 \text{ мМ}$ для этилового эфира *L*- α -ацетокси- β -фенилпропионовой кислоты). Это свидетельствует о том, что субстрат является не акцептором, а донором водородной связи [7]. Замечено также, что алкилирование свободной α -аминогруппы субстрата приводит к снижению скоростей гидролиза более чем на два порядка [2]. В принципе это может объясняться тем, что алкилированная аминогруппа является более основной, чем свободная аминогруппа, и поэтому менее склонна к образованию водородной связи.

Из субстратов неаминокислотного происхождения наиболее быстро, как оказалось, превращается этиловый эфир α -окси- β -фенилпропионовой кислоты ($k_{\text{кат}} 4 \text{ с}^{-1}$) [7]. Как видно, в этом случае, напротив, связь $\text{O}-\text{H}$ достаточно сильно поляризована и атом водорода, таким образом, может принимать участие в образовании водородной связи. Но почему же тогда сложные эфиры аминокислот со свободной аминогруппой, не содержащие дополнительно никаких акцепторных заместителей, гидролизуются примерно в 10 раз быстрее [2], чем эфир α -окси- β -фенилпропионовой кислоты? Оказывается, в этом случае, как показано в работах [8, 9], превращению подвергаются только те молекулы эфира, которые в условиях реакции протонированы по аминогруппе. Такая заряженная аминогруппа может предоставить протон для образования водородной связи гораздо легче, чем гидроксил.

Для дальнейшего выяснения роли α -аминогруппы субстрата в механизме химотрипсинового гидролиза нами было изучено взаимодействие фермента с этиловыми эфирами *N*-бензилиден- (I) и *N*-бензилтриптофана (II). Характерной чертой этих реакций оказалось то, что α -химотрипсин катализировал гидролиз производных *D*-триптофана и, напротив, ферментативный гидролиз их *L*-изомеров зарегистрирован не был (табл. 1).

Таблица 1

Кинетические параметры химотрипсинового гидролиза этиловых эфиров N-бензил-D-триптофана (II) и N-бензилиден-D-триптофана (I) (25° С)

| рН | (II) | | (I) | |
|------|-----------------------------|-------------|-----------------------------|------------|
| | $k_{кат}$, с ⁻¹ | K_m , мМ | $k_{кат}$, с ⁻¹ | K_m , мМ |
| 8,4 | | | 0,13±0,03 | 0,01±0,003 |
| 8,6 | 0,09±0,02 | 0,04±0,01 | | |
| 9,0 | 0,07±0,02 | 0,007±0,002 | | |
| 9,2 | | | 0,20±0,04 | 0,04±0,01 |
| 9,7 | 0,07±0,02 | 0,04±0,01 | | |
| 9,9 | | | 0,05±0,01 | 0,05±0,01 |
| 10,0 | 0,10±0,03 | 0,08±0,02 | | |

Таблица 2

Оптическое вращение и константа скорости спонтанного гидролиза этиловых эфиров триптофана и его N-производных (рН 10,3, 25° С)

| Этиловые эфиры | [α] _D ²⁰ , град | | k , с ⁻¹ |
|------------------------|--|----------|--------------------------|
| | L-изомер | D-изомер | |
| Триптофана | +8±2 | -10±2 | 4±0,4·10 ⁻⁵ |
| N-Бензилтриптофана | -19±4 | +16±4 | 4±0,4·10 ⁻⁴ |
| N-Бензилидентриптофана | -26±5 | +29±5 | 1,7±0,3·10 ⁻³ |

При рН<8 ферментативный гидролиз этих соединений не удается зарегистрировать. При рН>10 происходит заметный спонтанный гидролиз эфиров. Спонтанный гидролиз, как мы обнаружили, подчиняется кинетике реакции первого порядка при рН 10,3. В этих условиях определены значения наблюдаемых констант скорости первого порядка (табл. 2). В молекулах этиловых эфиров N-бензилиден- и N-бензилтриптофана влияние фенильного радикала на сложноэфирную группу, которое, видимо, передается через сопряженную с бензольным кольцом двойную связь в соединении (I) или неподеленную пару электронов азота в соединении (II), приводит к существенному ускорению щелочного гидролиза этих веществ по сравнению со сложным эфиром, содержащим свободную аминогруппу (см. табл. 2). Ферментативный гидролиз этих D-субстратов D-конфигурации также протекает заметно быстрее, чем ферментативный гидролиз метилового эфира D-триптофана ($k_{кат}$ 0,004 с⁻¹, K_m 0,25 мМ, рН 7,93 [10]).

Обратимся теперь вновь к вопросу о стереоселективности действия α -химотрипсина. Ориентация молекулы сложного эфира, изображенная на рис. 1, не является, конечно, единственно возможной. Показано [11], что при увеличении гидрофобности N-заместителя может происходить его включение в гидрофобный «карман» вместо остатка аминокислоты R₂ (рис. 2). Любопытно, что примерно такая же картина получается при взаимодействии α -химотрипсина с субстратами D-конфигурации. В этом случае, однако, непродуктивное связывание достигается при «правильной» ориентации в гидрофобном «кармане» (см. рис. 3). Если же заместитель при α -аминогруппе D-субстрата обладает значительной гидрофобностью, то его ориентация в гидрофобный «карман» в принципе может приводить к продуктивному взаимному расположению нуклеофила ρ_3 и группы COOR₃ (см. рис. 4). В этом случае иногда наблюдается обращение стереоселективности действия α -химотрипсина. В литературе описаны примеры такого обращения [7].

Синтезированные нами N-замещенные сложные эфиры D-триптофана взаимодействуют с ферментом подобным же образом, что вполне понятно,

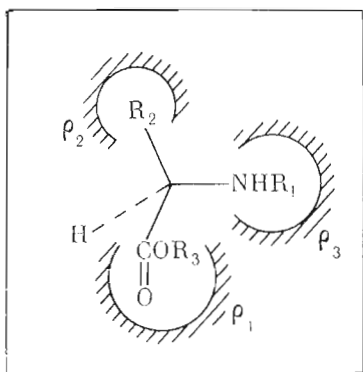


Рис. 3

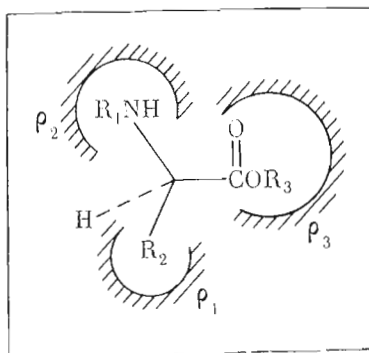


Рис. 4

Рис. 3. Непродуктивное связывание *D*-субстрата на активном центре α -химотрипсина. R_2 ориентирован в гидрофобный «карман»

Рис. 4. Продуктивное связывание *D*-субстрата на активном центре α -химотрипсина. Аминогруппа ориентирована в боковой «карман»

если принять во внимание большую гидрофобность *N*-бензильного и *N*-бензилиденового радикалов. Ферментативный гидролиз *L*-изомеров полученных субстратов не наблюдается в области pH 7–10. Этот факт, вообще говоря, не вполне понятен, так как теоретически должно было бы реализовываться связывание по типу рис. 4 и 1, поскольку индольный, *N*-бензилиденный и *N*-бензильный радикалы не слишком сильно различаются по гидрофобности.

Сопоставляя значения кинетических констант для субстратов (I) и (II) (табл. 1), можно увидеть, что восстановление двойной связи в молекуле этилового эфира *N*-бензилидентриптофана почти не влияет на протекание химотрипсинового гидролиза. По-видимому, это говорит о том, что атом водорода аминогруппы в молекуле этилового эфира *N*-бензилтриптофана не образует связи с активным центром фермента, которая могла бы влиять на скорость гидролиза эфира. Это и понятно, ведь в данном случае продуктивен такой тип связывания, при котором гидрофобный «карман» занят *N*-бензильным или *N*-бензилиденным радикалом (рис. 4), и наличие или отсутствие у аминогруппы атома водорода не должно сказываться на кинетике реакции. Относительно низкие значения величины $K_{m(\text{эф})}$ можно объяснить, например, учитывая возможность непродуктивного связывания молекулы *D*-субстрата на активном центре α -химотрипсина в соответствии с рис. 3.

Таким образом, кинетические параметры α -химотрипсинового гидролиза таких нетрадиционных субстратов, как этиловые эфиры *N*-бензил- и *N*-бензилидентриптофана, еще раз подтверждают сложившиеся представления о механизме каталитического действия фермента.

Экспериментальная часть

В работе использовали α -химотрипсин марки Б («Союзреактив»). Концентрацию активных центров фермента определяли при помощи *N*-гранцинамидоимидазола [12] на автоматическом анализаторе «Gemsaeс» (Electronucleonics, США).

L- и *D*-триптофан — отечественного производства, марки ч. КОН — производства VEB Chemische Werke Buna (ГДР). Остальные соли и реактивы отечественного производства марки х.ч.

Этиловые эфиры *L*- и *D*-триптофана получали по методу [13]. Чистоту полученных препаратов контролировали методом ТСХ на силуфоле в системе бутиловый спирт — уксусная кислота — вода, 4 : 1 : 5. Шиффовы

основания этиловых эфиров триптофана синтезировали по общей методике, приведенной в работе [14], из эквивалентных количеств эфира аминокислоты и бензальдегида. Полученные таким образом азометины восстанавливали в соответствующие вторичные амины в растворе этанола боргидридом натрия. Оптическое вращение растворов полученных субстратов измеряли на поляриметре СМ (СССР).

Кинетику ферментативного и спонтанного гидролиза изучали при помощи регистрирующего рН-стага (Radiometer TTT-1с, Дания) в водных растворах при ионной силе 0,1 (KCl) и $25 \pm 0,2^\circ \text{C}$.

Постоянное значение рН в системе поддерживали добавлением в ячейку объемом 20 мл 3 мМ раствора КОН. Порядок реакции спонтанного гидролиза определяли как тангенс угла наклона в координатах $\lg V - \lg c$. Кинетические параметры ферментативного и спонтанного гидролиза получили обработкой интегральных кривых по методу [15].

ЛИТЕРАТУРА

1. Березин И. В., Мартинек К. (1977) в кн.: Основы физической химии ферментативного катализа, с. 126–170, «Высшая школа», М.
2. Purdie J. E., Benoiton N. L. (1970) *Can. J. Biochem.*, **48**, 1058–1065.
3. Ingles D. W., Knowles J. R. (1968) *Biochem. J.*, **108**, 561–569.
4. Мартинек К., Доровска В. Н., Варфоломеев С. Д. (1972) *Биохимия*, **37**, 655–658.
5. Martinek K., Dorovska V. N., Berezin I. V. (1972) *Biochim. et biophys. acta*, **271**, 80–86.
6. Blow D. M. (1974) *Isr. J. Chem.*, **12**, 483–494.
7. Cohen S. G., Weinstein S. Y. (1964) *J. Amer. Chem. Soc.*, **86**, 5326–5330.
8. del Castillo L. M., Nieto Z., Arce E., Inei-Shizukawa G., Crus M. T., Castaneda-Agullo M. (1974) *Biochim. et biophys. acta*, **235**, 358–369.
9. Швядас В. К., Галаев И. Ю., Березин И. В. (1980) *Биохимия*, **45**, вып. 4, 629–635.
10. Kezdy F. J., Jindal S. P., Bender M. L. (1972) *J. Biol. Chem.*, **247**, 5746–5752.
11. Rapp J. R., Niemann C., Hein G. E. (1966) *Biochemistry*, **5**, 4100–4105.
12. Shoubaum G. R., Zerner B., Bender M. L. (1961) *J. Biol. Chem.*, **236**, 2930–2935.
13. Werbin H., Palm A. (1951) *J. Amer. Chem. Soc.*, **73**, 1382.
14. Кудрявцев А. С., Савич И. А. (1963) *Ж. общ. химии*, **33**, 1351–1354.
15. Березин И. В., Клесов А. А. (1976) *Практический курс химической и ферментативной кинетики*, с. 20–23, 166, 167, Изд-во МГУ.

Поступила в редакцию
17.I.1980

ENANTIOSELECTIVITY OF α -CHYMOTRYPSIN CATALYZED HYDROLYSIS OF N-BENZYL AND N-BENZYLIDENE TRYPTOPHAN ETHYL ESTERS

SHVEDAS V.-Ju. K., GALAEV I. Yu., IVANOV A. E., BEREZIN I. V.

M. V. Lomonosov State University, Moscow

The inversion of enantioselectivity in α -chymotrypsin catalyzed hydrolysis of N-benzyl (I) and N-benzylidenetryptophan ethyl esters (II) was observed. The hydrolysis rate constants k_{cat} are $0,2 \text{ s}^{-1}$ (at pH 9,2) for *D*-isomer of (I), and $0,07 \text{ s}^{-1}$ for *D*-isomer of (II), whereas the attempts to detect the hydrolysis of *L*-isomers failed. The kinetic parameters of enzymatic and spontaneous hydrolysis of *D* - (I) and *D* - (II) are obtained over pH-range of 8,5–10. The phenomenon of enantioselectivity inversion can be rationalized in terms of the substrate three-point-binding in the enzyme active site.