



УДК 577.150.2

**ЭНАНТИОСЕЛЕКТИВНОСТЬ  $\alpha$ -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  $\alpha$ -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<sup>-1</sup> (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  $\alpha$ -химотрипсин является одним из наиболее изученных ферментов [1]. Если не рассматривать олигомерные пептиды и белки, то существует два вида эфирных субстратов  $\alpha$ -химотрипсина, которые гидролизуются наиболее быстро: N-ацилированные сложные эфиры ароматических  $\alpha$ -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  $\alpha$ -химотрипсина с производными L-аминокислот, т. е. с веществами, обладающими определенной стереохимической конфигурацией. Согласно общепринятому механизму трехточечного связывания [3], молекула L-субстрата, имеющего форму R<sub>2</sub>CH(NHR<sub>1</sub>)COOR<sub>2</sub>, располагается в активном центре  $\alpha$ -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  $\alpha$ -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

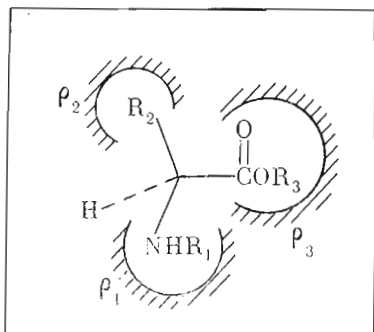


Рис. 1

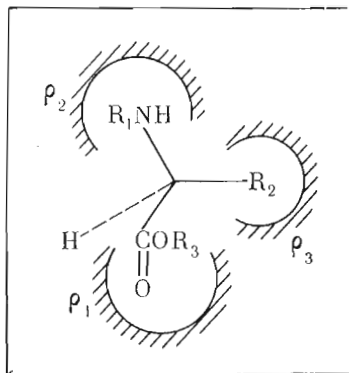


Рис. 2

Рис. 1. Схематическое изображение продуктивного связывания молекулы *L*-субстрата на активном центре  $\alpha$ -химотрипсина:  $R_1 = \text{H}$  или  $\text{COCH}_3$ ,  $R_2$  — остаток аминокислоты,  $R_3$  — остаток спирта,  $\rho_1$  — акцептор аминогруппы субстрата,  $\rho_2$  — гидрофобный «карман»,  $\rho_3$  — обобщенный нуклеофил активного центра  $\alpha$ -химотрипсина

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

представление о том, что ациламидная группа субстрата связывается на активном центре  $\alpha$ -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  $\text{OSCOCH}_3$ , также гидролизуется  $\alpha$ -химотрипсином медленно ( $k_{\text{кат}} 0,6 \text{ с}^{-1}$ ,  $K_m 23 \text{ мМ}$  для этилового эфира *L*- $\alpha$ -ацетокси- $\beta$ -фенилпропионовой кислоты). Это свидетельствует о том, что субстрат является не акцептором, а донором водородной связи [7]. Замечено также, что алкилирование свободной  $\alpha$ -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  $\alpha$ -окси- $\beta$ -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  $\alpha$ -окси- $\beta$ -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  $\alpha$ -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  $\alpha$ -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)	
	$k_{\text{кат}}, \text{с}^{-1}$	$K_m, \text{мМ}$	$k_{\text{кат}}, \text{с}^{-1}$	$K_m, \text{мМ}$
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	$[\alpha]_D^{20}$ , град		$k, \text{с}^{-1}$
	L-изомер	D-изомер	
Триптофана	+8±2	-10±2	$4 \pm 0,4 \cdot 10^{-5}$
N-Бензилтриптофана	-19±4	+16±4	$4 \pm 0,4 \cdot 10^{-4}$
N-Бензилидентриптофана	-26±5	+29±5	$1,7 \pm 0,3 \cdot 10^{-3}$

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 ( $k_{\text{кат}} 0,004 \text{ с}^{-1}$ ,  $K_m 0,25 \text{ мМ}$ , рН 7,93 [10]).

Обратимся теперь вновь к вопросу о стереоселективности действия  $\alpha$ -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  $R_2$  (рис. 2). Любопытно, что примерно такая же картина получается при взаимодействии  $\alpha$ -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  $\alpha$ -аминогруппе D-субстрата обладает значительной гидрофобностью, то его ориентация в гидрофобный «карман» в принципе может приводить к продуктивному взаимному расположению нуклеофила  $\rho_3$  и группы  $\text{COOR}_3$  (см. рис. 4). В этом случае иногда наблюдается обращение стереоселективности действия  $\alpha$ -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,

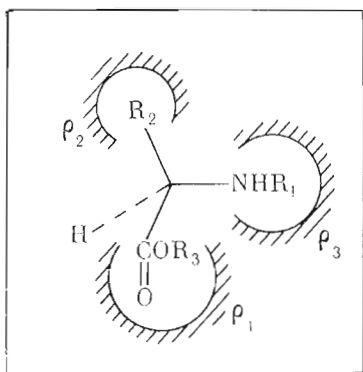


Рис. 3

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

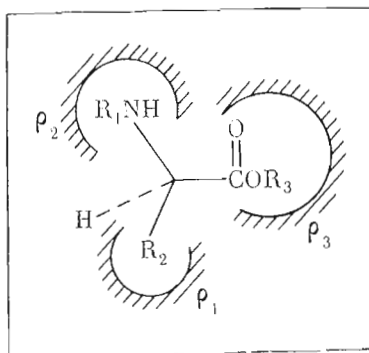


Рис. 4

Рис. 4. Продуктивное связывание *D*-субстрата на активном центре  $\alpha$ -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  $\alpha$ -химотрипсина в соответствии с рис. 3.

Таким образом, кинетические параметры  $\alpha$ -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  $\alpha$ -химотрипсин марки Б («Союзреактив»). Концентрацию активных центров фермента определяли при помощи *N*-гранцинамидоимидазола [12] на автоматическом анализаторе «Gemsaeec» (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 $\alpha$ -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  $\alpha$ -chymotrypsin catalyzed hydrolysis of N-benzyl (I) and N-benzylidenetryptophan ethyl esters (II) was observed. The hydrolysis rate constants  $k_{\text{cat}}$  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.