



УДК 577.156

О СТАБИЛИЗИРУЮЩЕМ ВЛИЯНИИ ХЛОРИСТОГО КАЛИЯ НА АКТИВНУЮ КОНФОРМАЦИЮ α -ХИМОТРИПСИНА

Хоштярия Д.Э., Топслев В.В.

Институт электрохимии Академии наук СССР, Москва

Исследовано влияние повышения концентрации хлористого калия на температурную зависимость каталитических констант и кажущихся констант Михаэлиса для реакций гидролиза специфических субстратов α -химотрипсином. Сделано заключение о стабилизирующем влиянии ионов одновалентной соли на активную конформацию α -химотрипсина. Предложена модель стабилизации фермента мостиками молекул воды, включающими ионы соли. На основе кинетических и рентгеноструктурных данных рассмотрена роль активного центра в денатурации α -химотрипсина. Указывается на вероятное значение двух лизиновых групп, расположенных в районе активного центра, для стабилизации активной конформации.

Согласно литературным данным, каталитические константы ($k_{\text{кат}}$) и кажущиеся константы Михаэлиса (K_m) для реакций гидролиза специфических субстратов α -химотрипсином обнаруживают характерную зависимость от концентрации одновалентной соли [1, 2]. При приближении концентрации соли к нулю наблюдается резкое увеличение K_m , как и в случае повышения температуры выше определенного уровня при постоянной концентрации соли [3]. При постепенном увеличении концентрации соли K_m понижается все в меньшей степени и в области 1–2 н. растворов выходит на плато. Характер изменения $k_{\text{кат}}$ при росте ионной силы противоположен — ее значения растут с увеличением концентрации соли. Однако в области 1–2 нормальности $k_{\text{кат}}$ также становится независимой от концентрации.

Из данных работы [3а] следует, что такое поведение каталитических свойств фермента является прямым отражением изменения стабильности его активной конформации. Форма кривых этих зависимостей от концентрации соли говорит о том, что высаливание фермента (изменение коэффициентов активности его незаряженных частей) в рассматриваемом интервале концентраций (0–2,0 н.) не может являться причиной наблюдаемого эффекта*.

Таким образом, стабильность активной конформации α -химотрипсина при фиксированном значении pH зависит от двух анализируемых факторов: температуры и концентрации соли. При меньшей концентрации соли

* При приближении концентрации соли к нулю коэффициенты активности гидрофобных и пептидных групп асимптотически стремятся к единице. Если бы стабилизация активной конформации фермента определялась высаливающим фактором, ее уменьшение при этом также носило бы характер асимптотического приближения к предельному значению, тогда как экспериментально наблюдается все более резкое ее падение.

**Влияние различных факторов на кинетические константы реакций гидролиза
Ac-Tyr-OEt (I) и Bz-Tyr-OEt (II) α -химотрипсином**

Фермент	Среда	Субстрат	Δt , °C *	$k_{кат}$, с ⁻¹	K_m , мм	Лит-ра
Нативный	1,0 н. KCl, H ₂ O	I	5-40	257	0,56	
		II	5-50	96	0,022	
»	0,1 н. KCl, H ₂ O	I	5-30	198	0,91	[3]
		II	5-45	80	0,029	
»	0,1 н. KCl, D ₂ O	I	5-30	67	0,23	[3]
		II	5-45	32	0,010	
Иммобили- зованный	0,1 н. KCl, H ₂ O	I	5-40	120	1,16	[4]
		II	5-50	66	0,054	

* Температурный интервал сохранения линейности аррениусовской зависимости; данные для $k_{кат}$ и K_m приведены для 25° C.

потеря активности (денатурация) под влиянием температуры наступает при более низких значениях температуры. Резкое увеличение K_m и уменьшение $k_{кат}$ при этом должны быть следствием сильных конформационных колебаний молекулы α -химотрипсина под влиянием температуры перед ее разворачиванием. Как было нами ранее показано, в случае иммобилизованного на растворимом декстрани α -химотрипсина [4] увеличение термостабильности сопровождается расширением температурного интервала, в котором аррениусовская зависимость представляет прямую. Это следствие того, что при стабилизации молекулы фермента он денатурирует при более высокой температуре. Разность температур, при которых начинается отклонение от прямолинейной аррениусовской зависимости, может служить мерой стабилизации (или дестабилизации) активной конформации фермента.

Нами исследовано влияние одновалентной соли на каталитические свойства α -химотрипсина. Кинетические измерения проводили в 1 н. KCl. Изучена температурная зависимость K_m и $k_{кат}$ для двух специфических субстратов: Ac-Tyr-OEt и Bz-Tyr-OEt. Аррениусовская зависимость для гидролиза Ac-Tyr-OEt α -химотрипсином в 1 н. KCl дает прямую в температурном интервале 5-40° C, который на 10° C шире, чем для той же реакции, протекающей в 0,1 н. растворе KCl [3]. Это свидетельствует о возросшей термостабильности активной конформации α -химотрипсина. Величина энергии активации при переходе от 0,1 н. раствора [3] к 1 н. раствору не изменилась в пределах ошибки эксперимента. В то же время мы наблюдали некоторое увеличение (в 1,3 раза) каталитической константы для реакции, протекающей в 1 н. растворе KCl (таблица). Это согласуется с данными для зависимости $k_{кат}$ от концентрации NaCl [1, 2].

Температурная зависимость K_m для 1 н. раствора KCl (H₂O) приведена на рис. 1. Для сравнения там же приведена температурная зависимость K_m для 0,1 н. KCl (H₂O и D₂O) [3], а также для иммобилизованного на растворимом декстрани α -химотрипсина в 0,1 н. KCl, H₂O [4]. Как видно, температурный ход K_m в случае 1 н. KCl (H₂O) отличается от такового для 0,1 н. KCl (H₂O). Во всем температурном интервале эта константа меньше в растворе 1 н. KCl, что согласуется с опубликованными ранее данными [1, 2]. При этой концентрации соли, как и в случае 0,1 н. KCl (D₂O), появляется независимый от температуры участок. Нам представляется, что наиболее вероятной причиной увеличения с ростом температуры величины K_m и особенно резкого ее возрастания после некоторого температурного уровня (различного для разных систем) является затруднение сорбции ферментом субстрата из-за температурных колебаний молекулы α -химотрипсина. Поэтому появление независимого от температуры участка для K_m может быть связано со стабилизацией α -химотрипсина [3].

Тяжелая вода тоже несколько стабилизирует ферменты (эффект порядка $2-4^{\circ}\text{C}$ [5, 6]).

Учитывая, что при отсутствии ионов соли в растворе молекула α -химотрипсина нестабильна, а связанная вода играет существенную роль в образовании и поддержании нативной структуры ферментов [5-7], можно предложить модель, объясняющую с единой точки зрения стабилизацию активной конформации α -химотрипсина при увеличении ионной силы и замене H_2O на D_2O . На поверхности молекулы α -химотрипсина имеется около 50 заряженных групп [8]. Между разноименно заряженными группами согласно модели концентрированных растворов электролитов должны располагаться цепочки молекул воды с усиленными водородными связями [9], образуя сетку так называемой связанной воды. Однако эта сетка при отсутствии ионов соли не может обеспечить сколько-нибудь ощутимую стабильность активной конформации молекулы α -химотрипсина даже при наличии других стабилизирующих факторов, проанализированных в работах [6, 10]. Картина меняется при добавлении соли. Энергетически выгодно, чтобы ионы добавляемой соли располагались между заряженными группами, образуя дополнительные водные цепочки. При этом водородные связи вдоль таких «комплексных» цепочек должны быть существенно усилены (на десятки килокалорий) по сравнению с обычными [9]. В итоге получаются образования типа сшивок или мостиков, которые при повышении концентрации соли становятся прочнее. Такая модель должна давать более сильную зависимость стабильности фермента от ионной силы раствора при малых концентрациях соли (0-0,5 н.), что и наблюдается [3а].

При замене H_2O на D_2O (при неизменной ионной силе) мостики водородных связей также должны становиться прочнее [11]. Отсюда закономерно увеличение термостабильности фермента в тяжелой воде.

В предложенную схему стабилизации укладываются данные, полученные нами ранее для иммобилизованного на растворимом декстране α -химотрипсина [4]. Однако в сравнении с результатами 1 н. KCl при иммобилизации термостабилизация сопровождается некоторым ухудшением связывания субстратов (увеличение K_m) и уменьшением каталитической константы. Это понятно, если учесть, что иммобилизация более жестко ограничивает конформационную подвижность, чем увеличение концентрации соли или замена H_2O на D_2O . Иммобилизация на растворимом декстране, хотя и не разрушает конформацию активного центра молекулы α -химотрипсина, вызывает некоторое ее искажение, что отражается в соответствующих значениях констант связывания и энтропии активации реакции [4]*. Интересно, что в случае иммобилизации связывание субстратов почти во всем температурном интервале хуже, чем для нативного фермента, однако выше определенной температуры (когда температурные колебания для нативного фермента становятся слишком большими) в сравнимых условиях наблюдается обратная картина (см. рис. 1, 2, а также [4]). Это подтверждает предположение о влиянии температурных колебаний молекулы фермента на сорбцию субстрата.

Следует отметить, что в литературе упоминаются два типа конформационных колебаний ферментов [12, 13]: относительно малые (локальные), слабо зависящие от температуры, и температурно зависимые. Температурные колебания становятся ощутимыми только при относительно высоких температурах, близких к температуре денатурации фермента. Стабилизация фермента должна ограничить оба типа конформационных колебаний. Ограничение локальных колебаний должно вызывать понижение энтропии активации реакции, ограничение температурных колебаний — повышение температуры денатурации фермента.

* Экспериментально наблюдается статистически усредненная картина по всем активным иммобилизованным молекулам фермента, которые могут существенно различаться по степени искажения нативной структуры.

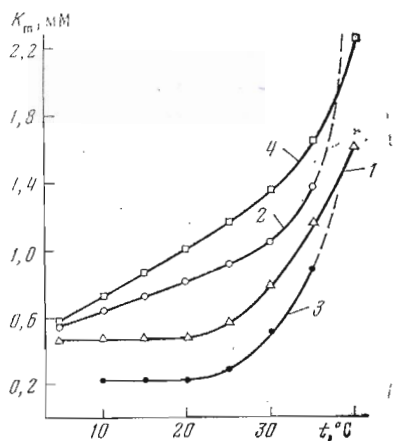


Рис. 1

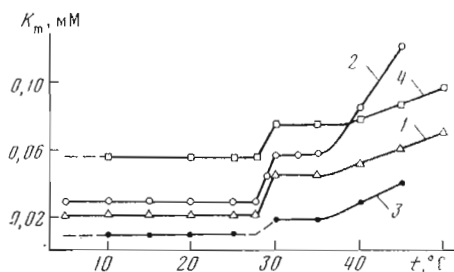


Рис. 2

Рис. 1. Зависимость K_m от температуры для гидролиза Ac-Tyr-OEt нативным α -химотрипсином в 1,0 н. KCl в H_2O (1), в 0,1 н. KCl в H_2O (2) и в D_2O (3) [3] и α -химотрипсином, иммобилизованным на растворимом декстране (~40 активированных звеньев декстрана на 100; из 16 реакционноспособных групп молекулы α -химотрипсина ковалентно связаны с декстраном ~12) в 0,1 н. KCl в H_2O (4) [4]

Рис. 2. Зависимость K_m от температуры для гидролиза Bz-Tyr-OEt нативным α -химотрипсином в 1,0 н. KCl в H_2O (1), в 0,1 н. KCl в H_2O (2), в D_2O (3) [3] и α -химотрипсином, иммобилизованным на растворимом декстране, в 0,1 н. KCl в H_2O (4) [4]

Наши рассуждения относятся к случаю гидролиза α -химотрипсином Ac-Tyr-OEt. В случае гидролиза Bz-Tyr-OEt все обсуждаемые эффекты влияния высокой концентрации KCl и иммобилизации сохраняются, но выражены в меньшей степени (рис. 2 и таблица). Особенностью Bz-Tyr-OEt является то, что этот субстрат сам стабилизирует α -химотрипсин. Это следует как из данных по зависимости K_m от температуры (более широкий температурный интервал измерений, наличие больших участков, независимых от температуры), так и из аррениусовских зависимостей, где всегда для Bz-Tyr-OEt наблюдается прямолинейная зависимость до более высоких температур [3, 4]. Стабилизация за счет Bz-Tyr-OEt по сравнению с Ac-Tyr-OEt для разных случаев дает эффект 10–15° C (таблица). Соответственно дополнительная стабилизация при увеличении концентрации соли, при иммобилизации или при переходе к D_2O для Bz-Tyr-OEt меньше, чем для Ac-Tyr-OEt.

Сопоставляя этот результат с результатами рентгеноструктурных исследований α -химотрипсина [8], можно конкретизировать предложенную нами модель стабилизации молекул фермента мостиками водородных связей. Bz-Tyr-OEt отличается от Ac-Tyr-OEt наличием ароматической бензильной группы. При рассмотрении модели молекулы α -химотрипсина, построенной согласно опубликованным ранее данным [8], видно, что эта группа должна взаимодействовать с ароматическим кольцом Trp-215, расположенным на поверхности выемки рядом с полостью, связывающей специфическую боковую группу субстрата (Tyr). За счет этого взаимодействия константа связывания (K_s) для Bz-Tyr-OEt на ~2,5 порядка меньше, чем для Ac-Tyr-OEt [14]*. Таким образом, можно думать, что наиболее важным для денатурации молекулы α -химотрипсина местом является район сорбции бензильной группы Bz-Tyr-OEt. Такое представление согласуется с выводами Антонова и др. [15] о том, что стабильность всей глобулы

* В случае гидролиза Bz-Tyr-OEt наблюдается перелом на кривой аррениусовской зависимости при ~25° C, что также является отражением взаимодействия бензильной группы с ферментом, вызывающего температурный конформационный переход фермент-субстратного комплекса [3].

и адсорбционного участка активного центра молекулы α -химотрипсина идентичны.

Активный центр расположен в ложбине между двумя относительно монопольными частями молекулы, не скрепленными между собой вплоть до места образования тетраэдрического производного. При денатурации молекула α -химотрипсина должна разворачиваться в первую очередь вдоль этой ложбины. Стабилизация субстратом (Bz-Tyr-OEt), видимо, следствие того, что ароматическая бензильная группа, взаимодействуя с Trp-215 фермента, дополнительно связывает стенки ложбины*.

Предположение о важности сорбционного участка для стабилизации молекулы α -химотрипсина подтверждается при дальнейшем рассмотрении модели. В районе активного центра на поверхности молекулы находится несколько заряженных групп, в основном лизиновых. Следует выделить из них две группы, Lys-175 и Lys-177, находящиеся на близких краях ложбин, на расстоянии 8—10 Å друг от друга, около места, где предположительно сорбируется бензильная группа субстрата. Нам представляется, что в отсутствие субстрата эти две группы определяют стабильность активного центра и всей молекулы α -химотрипсина. При отсутствии ионов KCl (или других солей) эти группы должны взаимно отталкиваться, что может уменьшать стабильность активной конформации молекулы. Ионы соли экранируют положительно заряженные остатки лизина, что способствует образованию водно-солевых мостиков с усиленными водородными связями между ними и приводит к стабилизации молекулы α -химотрипсина.

Указанные две лизиновые группы (Lys-175 и Lys-177) в основном должны обеспечивать стабилизацию α -химотрипсина как в случае иммобилизации белка на растворимом декстране [4, 16], так и при ковалентной модификации заряженных групп α -химотрипсина бифункциональными реагентами различной длины [17]. В пользу такого утверждения свидетельствуют следующие экспериментальные факты, описанные в работе Торчилина и др. [17]: при ковалентном сшивании α -химотрипсина, затрагивающем только отрицательно заряженные группы, достигается незначительная стабилизация белка, тогда как при вовлечении положительно заряженных групп стабилизация возрастает во много раз. К тому же максимальная стабилизация достигается при длине шивков, соответствующей расстоянию между Lys-175 и Lys-177, т. е. 8—10 Å.

В заключение следует отметить, что некоторые авторы (см. обзор в [6]) склонны объяснять кинетический изотопный эффект при замене H_2O на D_2O для ферментативных реакций не первичным водородным кинетическим изотопным эффектом, а уменьшением конформационной подвижности фермента в тяжелой воде. Из данной работы следует, что по крайней мере в случае α -химотрипсина наблюдаемые кинетические изотопные эффекты (k_{H_2O}/k_{D_2O} порядка 2,5—3) трудно объяснить изменением конформационной подвижности. Вследствие стабилизирующего влияния D_2O (при отсутствии первичного водородного кинетического изотопного эффекта) можно было бы ожидать не уменьшения, а небольшого увеличения $k_{кат}$, так как стабилизация с помощью мягкого воздействия (к тому же, судя по увеличению температуры денатурации, небольшая) должна действовать в этом направлении (таблица). Отсюда вытекает, что истинные первичные кинетические изотопные эффекты водорода для исследованных реакций могут быть даже несколько больше, чем экспериментально наблюдаемые. Это обстоятельство, разумеется, не влияет на выводы, сделанные нами ранее о механизме переноса протона в ферментативных реакциях [3, 4, 18].

* Расчет показывает, что в условиях нашего эксперимента [3] концентрация свободного фермента в ходе реакции в случае Bz-Tyr-OEt всего в 1,5 раза меньше, чем в случае Ac-Tyr-OEt, что при отсутствии указанного эффекта вряд ли могло бы быть причиной стабилизирующего эффекта в 10—15° С.

Использованная в данной работе методика эксперимента была описана нами ранее [3].

Авторы выражают благодарность проф. Л. И. Кришталику за постоянный интерес к работе и ценные замечания.

ЛИТЕРАТУРА

1. Martin R. B., Niemann K. (1957) J. Amer. Chem. Soc., **79**, 4814.
2. Kahana L., Shalitin Y. (1974) Israel J. Chem., **12**, 573-589.
3. Хоштария Д. Э., Тополев В. В., Кришталик Л. И. (1978) Биоорг. химия, **4**, 1341-1351.
- 3а. Torchilin V. P., Maksimenko A. V., Smirnov V. N., Berezin I. V., Klibanov A. M., Martinek K. (1979) Biochim. et biophys. acta, **567**, 1-11.
4. Хоштария Д. Э., Тополев В. В., Кришталик Л. И., Рейзер И. Л., Торчилин В. П. (1979) Биоорг. химия, **5**, 1243-1247.
5. Лобышев В. И., Шноль С. Э. (1975) в сб.: Конформационные изменения биополимеров в растворах (Андроникашвили Э. Л., ред.), с. 323-329, «Медицина», Тбилиси.
6. Лобышев В. И., Калинин Л. П. (1978) Изотопные эффекты D₂O в биологических системах, с. 107-113, 119-145, «Наука», М.
7. Хургин Ю. И., Росляков В. Я., Клячко-Гурвич А. Л., Бруева Т. Р. (1972) Биохимия, **37**, 485-492.
8. Birktoft F. F., Blow D. M. (1972) J. Mol. Biol., **68**, 187-240.
9. Гордон Дж. (1979) Органическая химия растворов электролитов, с. 279-282, «Мир», М.
10. Ламри Р., Билтонен Р. (1973) в сб.: Структура и стабильность биологических макромолекул (Волькенштейн М. В., ред.), с. 7-173, «Мир», М.
11. Whalley E. (1957) Trans. Faraday Soc., **53**, 1578-1588.
12. Абатуров Л. В. (1976) в сб.: Итоги науки и техники. Серия «Молекулярная биология», с. 111-126, ВИНТИ, М.
13. Абатуров Л. В., Варшавский Я. М. (1978) Молекуляр. биология, **12**, 36-46.
14. Berezin I. V., Kazanskaya N. F., Klyosov A. A. (1971) FEBS Lett., **15**, 121-124.
15. Антонов В. К., Воротынцева Т. Н., Коган Г. А. (1970) Молекуляр. биология, **4**, 240-245.
16. Торчилин В. П., Рейзер И. Л., Смирнов В. Н., Чазов Е. И. (1976) Биоорг. химия, **2**, 1252-1257.
17. Torchilin V. P., Maksimenko A. V., Smirnov V. N., Berezin I. V., Klibanov A. M., Martinek K. (1978) Biochim. et biophys. acta, **522**, 277-283.
18. Хоштария Д. Э. (1978) Биоорг. химия, **4**, 1673-1677.

Поступила в редакцию
3.VIII.1979

ON STABILIZING EFFECT OF KCL ON THE ACTIVE CONFORMATION OF α -CHYMOTRYPSIN

KHOSHTRIYA D. E., TOPOLEV V. V.

Institute of Electrochemistry, Academy of Sciences of the USSR, Moscow

The influence of the increase in KCl concentration on the temperature dependence of the catalytic constants and the apparent Michaelis constants for α -chymotrypsin catalyzed hydrolysis of specific substrates has been studied. It is concluded that monovalent ions stabilize the active conformation of α -chymotrypsin. A model is suggested which attributes such a stabilization to the bridges made of water molecules and salt ions. Based on kinetic and X-ray data, the active site role in the α -chymotrypsin denaturation is considered. It is suggested that two charged lysines situated in the active site region may be implicated in stabilization of the active conformation.