



УДК 577.156;577.150.3

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ПОЛИАНИОНОВ
НА КАТАЛИТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА α -ХИМОТРИПСИНА *

Стрельцова З. А., Браудо Е. Е., Толстогозов В. Б.

Институт элементоорганических соединений Академии наук СССР, Москва

Исследовано влияние различных полианионов на кинетические параметры катализируемого ХТ гидролиза АТЭЭ. Показано, что взаимодействие полианионов с α -химотрипсином вызывает эффекты, которые могут быть полностью объяснены изменением констант ионизации ионогенных групп фермента, участвующих в каталитической реакции. Это явление, по-видимому, общее для различных полиэлектролитов. Величина наблюдаемых эффектов зависит от природы полианиона и определяется величиной его электростатического потенциала ψ . Если ψ известен, можно предсказать степень влияния полианиона на ферментативную реакцию.

В организме процессы расщепления белков протеолитическими ферментами протекают в присутствии большого числа веществ небелковой природы, многие из которых могут оказывать влияние на действие ферментов. К их числу относятся полианионы (кислые полисахариды, нуклеиновые кислоты и т. д.). В ряде работ [1–6] отмечается влияние полианионов на активность ферментов, однако природа этих эффектов не исследовалась.

Статья посвящена изучению влияния полианионов, главным образом кислых полисахаридов, на действие ХТ (КФ 3.4.4.5). Наиболее подробно исследована система ХТ – А.

На рис. 1 представлена зависимость отношения v/v' (v и v' – скорости ферментативного гидролиза АТЭЭ в отсутствие и присутствии А) от концентрации А. Из рисунка видно, что в условиях опыта А является ингибитором ферментативной реакции, причем с увеличением его концентрации ингибирующий эффект возрастает лишь до некоторого предельного значения, а затем перестает зависеть от концентрации А. Подобные результаты получены для всех исследованных полианионов.

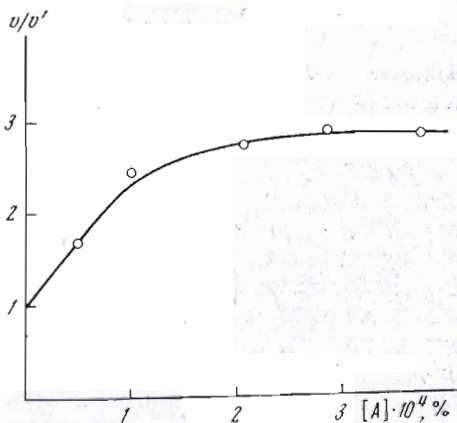


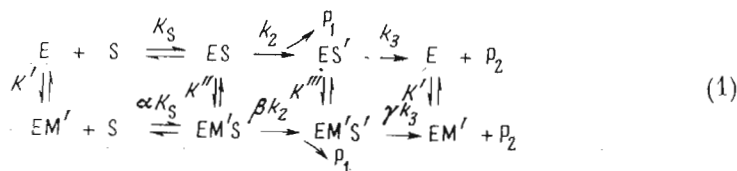
Рис. 1. Зависимость v/v' от $[A]$ (условия опыта: pH 6,5; 0,01 М КСl; $[E]_0 = 5 \cdot 10^{-7}$ М; $[S]_0 = 1 \cdot 10^{-3}$ М, 22°)

* Сокращения: ХТ – α -химотрипсин, АТЭЭ – этиловый эфир N-ацетил-L-тирозина, А – альгинат натрия, М – модификатор (полианион).

По-видимому, влияние полианионов на скорость ферментативной реакции является следствием их взаимодействия с ХТ. Вид зависимости, представленной на рис. 1, легко объяснить, если предположить, что комплекс фермент — полианион обладает ферментативной активностью, хотя и несколько меньшей, чем свободный фермент.

В дальнейшем для обозначения А и других полианионов будем использовать символ М (модификатор).

Предположим, что механизм ферментативной реакции не изменяется в результате взаимодействия фермента с полианионом, т. е. ферментативный гидролиз субстрата S в присутствии М протекает согласно схеме:



где М' — часть молекулы полианиона, с которой взаимодействует независимо от остальных ее частей молекула фермента [7]. Тогда можно вывести уравнение, описывающее зависимость скорости ферментативной реакции в присутствии М от концентрации субстрата:

$$v' = \frac{(k_{кат})' [E]_0 [S]_0}{(K_{m(кат)})' + [S]_0}, \quad (2)$$

где $(k_{кат})'$ и $(K_{m(кат)})'$ зависят от [М]. При условиях $\beta = \gamma$ и $[M] = [M]_0$, где $[M]_0$ — исходная концентрация полианиона, $(k_{кат})'$ и $(K_{m(кат)})'$ определяются соотношениями, линеаризация которых в виде

$$\frac{1}{[k_{кат}'/(k_{кат})'] - 1} = \frac{\alpha}{K[M]_0(1-\beta)} + \frac{1}{(1/\beta - 1)}, \quad (3)$$

$$\frac{1}{[K_{m(кат)}/(K_{m(кат)})'] - 1} = \frac{1}{K[M]_0(1/\alpha - 1)} + \frac{1}{(1/\alpha - 1)} \quad (4)$$

позволяет получить значения α и β . К в уравнениях (3) и (4) определяется соотношением

$$K = K' [M']_0 / [M]_0. \quad (5)$$

В случае АТЭЭ $k_{кат} = k_3$ [8]. Следовательно, с помощью (3) можно определить величину константы скорости деацилирования комплекса $EM'S'$ k_3' ($k_3' = \beta k_3$).

На рис. 2, а представлены в координатах Лайнуивера — Бёрка [9] данные, полученные для ферментативного гидролиза АТЭЭ при рН 7,0 при различных концентрациях А. $k_{кат}$ и $(k_{кат})'$, определенные из рис. 2, а, приведены на рис. 2, б в координатах уравнения (3). Отрезок, отсекаемый полученной прямой на оси ординат, позволяет рассчитать значение β и, следовательно, k_3' . Величины k_3 и k_3' , определенные таким способом для различных значений рН, представлены на рис. 3 и в табл. 1. Экспериментальные данные на рис. 3 хорошо совпадают с теоретическими кривыми, построенными по уравнению [10, 11]

$$k_3 = \frac{(k_3)_{lim}}{1 - [H^+]/K_a}. \quad (6)$$

Кривая 1 рассчитана при использовании значений $pK_a = 6,8$ [10, 11] и $(k_3)_{lim}$, равного k_3 , полученному при рН 9,0; кривая 2 — с помощью значения $(k_3')_{lim}$, равного $(k_3)_{lim}$ для реакции в отсутствие А и значения $pK_a = 7,45$, т. е. предполагалось, что изменение k_3 под действием А обусловлено

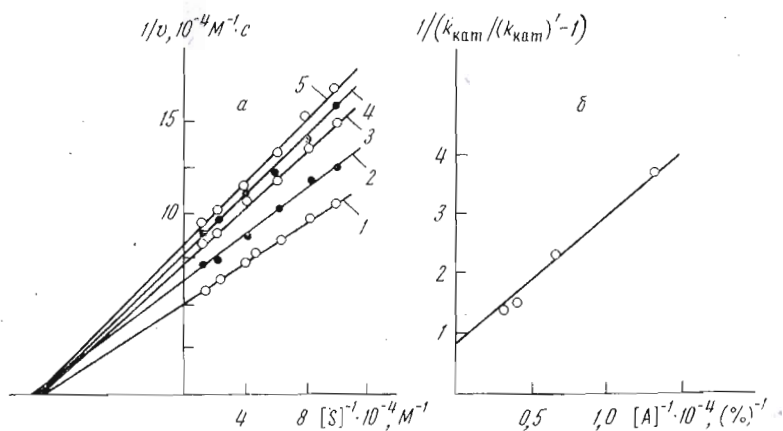


Рис. 2. Определение кинетических параметров ферментативной реакции (а) при различных концентрациях А (1 — 0; 2 — $7,70 \cdot 10^{-5}$; 3 — $1,54 \cdot 10^{-4}$; 4 — $2,5 \cdot 10^{-4}$; 5 — $3,10 \cdot 10^{-4}$ %) и определение β (б) в координатах уравнения (3) по данным рис. 2, а (условия опыта: рН 7,0; 0,01 М КСl; 22°; $[E]_0 = 1 \cdot 10^{-7}$ М; $[S]_0 = 5 \cdot 10^{-4} - 5 \cdot 10^{-3}$ М)

только сдвигом pK_a ионогенной группы фермента, контролирующей деацилирование, на 0,65 в щелочную область.

При условии $\beta = \gamma$ выполняется следующее соотношение:

$$(K_{m(\text{каж})})'_0 / K_{m(\text{каж})} = K_s' / K_s = \alpha. \quad (7)$$

Следовательно, зная $K_{m(\text{каж})}$ и определяя α из отрезка, отсекаемого на оси ординат прямой, полученной при представлении экспериментальных дан-

Таблица 1

Кинетические параметры ферментативной реакции в присутствии и в отсутствие А

Значения констант рассчитаны методом наименьших квадратов из экспериментальных данных, представленных в координатах рис. 2. Каждая экспериментальная точка являлась средним арифметическим двух-трех измерений, отличающихся друг от друга не более чем на 5%. Условия опыта см. в подписи к рис. 3

рН	$k_3, \text{с}^{-1}$	$k_3', \text{с}^{-1}$	$K_m(\text{каж}) \cdot 10^3, \text{М}$	$(K_m(\text{каж}))'_0 \cdot 10^3, \text{М}$
9,0	240 ± 10	210 ± 30	$4,0 \pm 0,6$	$1,5 \pm 0,3$
8,5	210 ± 10	150 ± 20	$1,5 \pm 0,2$	$1,0 \pm 0,2$
8,0	200 ± 6	140 ± 20	$1,1 \pm 0,1$	$0,8 \pm 0,1$
7,5	180 ± 5	140 ± 20	$1,0 \pm 0,1$	$0,9 \pm 0,1$
7,0	122 ± 2	54 ± 10	$1,05 \pm 0,05$	$0,95 \pm 0,05$
6,5	70 ± 1	22 ± 4	$0,92 \pm 0,05$	$0,88 \pm 0,05$
6,0	$32 \pm 0,5$	8 ± 1	$0,91 \pm 0,05$	$0,91 \pm 0,05$
5,5	$11 \pm 0,5$	$2,5 \pm 0,5$	$0,93 \pm 0,05$	$0,92 \pm 0,05$
5,0	$3,6 \pm 0,2$	$0,70 \pm 0,1$	$0,90 \pm 0,05$	$0,90 \pm 0,05$

ных в координатах уравнения (4), можно вычислить значение константы Михаэлиса для комплекса EM' $(K_{m(\text{каж})})'_0$.

Значения $K_{m(\text{каж})}$ и $(K_{m(\text{каж})})'_0$ представлены на рис. 4 и в табл. 1 как функции рН. Кривые, приведенные на этом рисунке, являются теоретическими. Они были рассчитаны с помощью уравнения [10, 11]

$$K_{m(\text{каж})} = (K_{m(\text{каж})})_{\text{нм}} \cdot (1 + K_a / [H^+]). \quad (8)$$

Для построения кривой 1 были использованы значения $pK_a = 8,8$ [10, 11] и $(K_{m(\text{каж})})_{\text{нм}} = 0,9 \cdot 10^{-3}$ М. Кривая 2 была построена в предположении, что влияние А на $K_{m(\text{каж})}$, так же как и влияние А на k_3 , является следствием сдвига на 0,65 в щелочную область pK_a ионогенной группы фермента,

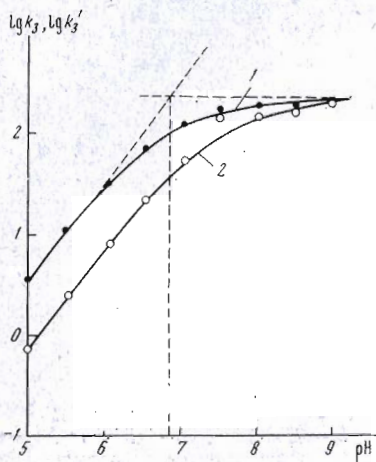


Рис. 3. Зависимость $\lg k_3$ (1) и $\lg k_3'$ (2) от pH (условия опыта: 0,01 M KCl, 22°, $[E]_0 = 1 \cdot 10^{-7}$ M, $[S]_0 = 5 \cdot 10^{-4} - 5 \cdot 10^{-3}$ M)

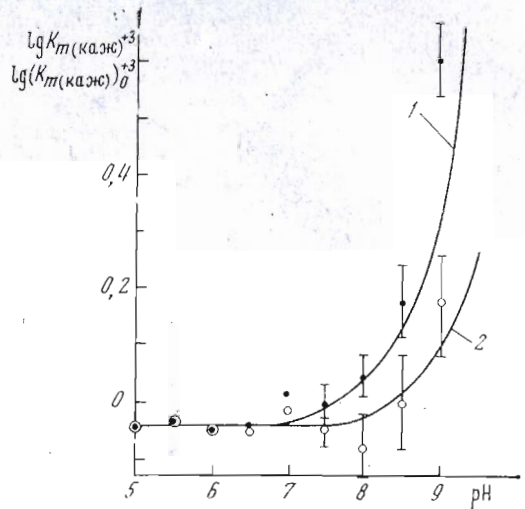


Рис. 4. Зависимость $\lg K_{m(\text{кат.})}$ (1) и $\lg (K_{m(\text{кат.})})'$ (2) от pH (условия опыта см. в подписи к рис. 3)

контролирующей $K_{m(\text{кат.})}$, т. е. были использованы значения $(K_{m(\text{кат.})})'_{\text{lim}} = 0,9 \cdot 10^{-3}$ M и $pK_a = 9,45$. Как видно из рис. 4, экспериментальные данные удовлетворительно совпадают с теоретическими кривыми.

Влияние А на рК ионогенных групп фермента, участвующих в каталитической реакции, вызывает сдвиг pH-оптимума ферментативной реак-

Таблица 2

Влияние природы полианиона на параметры ферментативной реакции

(Условия опыта см. в подписи к рис. 3)

Полианион *	$1/\beta$ (при pH 6,0)	pK_a	ΔpK_a
Декстрасульфат натрия	9,3	7,85	1,05
Пектин	2,25	7,18	0,38
Каррагинан	4,3	7,48	0,68
Полиметакриловая кислота	5,25	7,63	0,83
Альгинат натрия	4,2	7,45	0,65

*Концентрации всех исследованных полианионов варьировались в пределах $5 \cdot 10^{-3} - 5 \cdot 10^{-2}\%$.

ции. Это явление иллюстрирует рис. 5, на котором представлены зависимости от pH параметров $\beta k_2/\alpha K_s$ и k_2/K_s , соответствующих константам скорости второго порядка ферментативной реакции в присутствии и в отсутствие А соответственно при условии $[S]_0 \ll K_{m(\text{кат.})}$. Как видно из рис. 5, при $pH < 8$ А ингибирует ферментативную реакцию, а при $pH > 8$ ускоряет ее.

Было также исследовано влияние на катализируемый ХТ гидролиз АТЭЭ декстрасульфата натрия, пектина, каррагинана и полиметакрило-

вой кислоты. Полученные результаты показывают, что эти вещества, так же как А, вызывают сдвиг рН-оптима ферментативной реакции в щелочную область. В табл. 2 представлены величины сдвига pK_a ионной группы ХТ, контролирующей k_s , определенные для всех использованных полианионов.

Все описанные выше эффекты уменьшаются с увеличением ионной силы (I) и полностью исчезают при $I > 0,04$.

Явление сдвига pK ионных групп ферментов под действием полиэлектролитов, ковалентно связанных с ферментом, описано в работах [12–17]. Согласно [13], фермент, связанный ковалентно с соединением, содержащим заряженные группы, подвергается воздействию электростатического поля этого соединения. Это приводит к кажущемуся сдвигу pK ионных групп фермента в щелочную область, если фермент связан с полианионом, и в кислую область, если микроокружение создается заряженными группами поликатиона. Подобное явление наблюдалось также под действием «собственного» электростатического поля фермента, приобретающего дополнительный заряд в результате химической модификации его ионных групп [18–20]. Все описанные эффекты уменьшаются с увеличением ионной силы и не наблюдаются при $I > 0,1$.

Влияние полианионов на константы ионизации функциональных групп ХТ, по-видимому, также связано с действием электростатического поля, образованного их заряженными группами. На электростатическую природу исследованных в данной работе эффектов указывает их чувствительность к величине ионной силы. В работе [13] для расчета величины сдвига pK ионных групп фермента под действием электростатического поля микроокружения используется уравнение

$$\Delta pK = 0,43 \psi \epsilon / kT, \quad (9)$$

где ψ — электростатический потенциал полиэлектролита. При использовании значения ΔpK_a из табл. 2 было вычислено с помощью уравнения (9) значение ψ для полиметакриловой кислоты. Найденная величина ψ , равная $1,6 \cdot 10^{-4}$ э.с.е. удовлетворительно совпадает с величиной $\psi = -2,5 \cdot 10^{-4}$ э.с.е. для этого полиэлектролита, измеренной при аналогичных условиях [21].

Зависимость величины сдвига pK от природы полианионов, по-видимому, связана с различной величиной их электростатического потенциала. В отличие от А декстрансульфат натрия является сильным полиэлектролитом. Плотность заряда пектина по сравнению с А значительно ниже, так как его карбоксильные группы частично этерифицированы. Следовательно, при одинаковом значении рН величина ψ для декстрансульфата натрия будет выше, а для пектина — ниже, чем для А. С этим согласуется полученное нами большее по сравнению с А значение ΔpK_a для декстрансульфата натрия и меньшее для пектина (см. табл. 2).

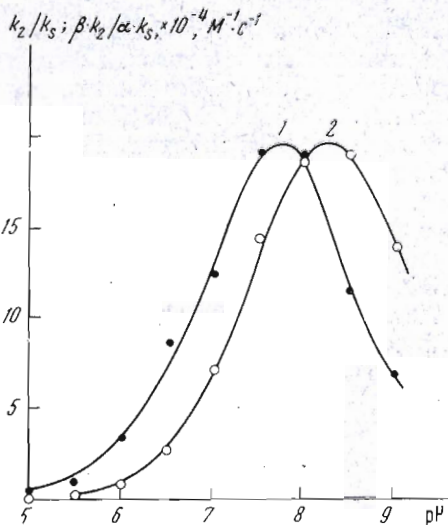


Рис. 5. Зависимость k_2/K_s (1) и $\beta k_2/\alpha K_s$ (2) от рН (условия опыта см. в подписи к рис. 3)

Экспериментальная часть

Материалы и методы. Кристаллический ХТ получен с Олайнского завода химических реактивов. Концентрацию активных центров определяли по методу [22]. В работе использовали альгинат натрия производства BDH (Англия), M_w 150 000 [23], пектин цитрусовый и каррагинан типа KWG производства «Copenhagen Pectin Factory» (Дания), декстрансульфат натрия, M_w 500 000 (по данным фирмы) производства «Pharmacia» (Швеция). Полиметакриловая кислота M_w 120 000 была любезно предоставлена кафедрой высокомолекулярных соединений Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова. В качестве субстрата использовали АТЭЭ («Reanal», Венгрия). Ионную силу создали с помощью KCl (х.ч.).

Кинетические измерения. Начальную стационарную скорость ферментативной реакции измеряли на рН-стате ТТТ1с («Radiometer»), титруя щелочью (KOH) кислоту, выделяющую при гидролизе субстрата. Для предотвращения адсорбции полисахаридов, искажающей показания прибора, стеклянный электрод, в соответствии с рекомендацией фирмы «Radiometer», был обработан раствором триметилхлорсилана в бензоле. Все измерения проводили при 22°. Экспериментальные результаты анализировали, исходя из представлений о трехстадийном механизме реакций, катализируемых ХТ [24].

ЛИТЕРАТУРА

1. Spensley P. C., Rogers H. J. (1954) *Nature*, **173**, 1190–1191.
2. Kornguth S. E., Stahmann M. A. (1960) *Arch. Biochem. and Biophys.*, **91**, 32–38.
3. Кольцова С. В., Гликина М. В., Илларионова Н. Г., Самсонов Г. В. (1971) *Молекулярн. биология*, **5**, 225–231.
4. Кольцова С. В., Гликина М. В., Самсонов Г. В. (1970) *Изв. АН СССР, сер. хим.*, **8**, 1895–1896.
5. Gatfield I. L., Stute R. (1972) *FEBS Lett.*, **28**, 29–31.
6. Hofstee B. H. J. (1962) *Biochim. et biophys. acta*, **55**, 440–454.
7. Nakagaki M., Sano Y. (1972) *Bull. Chem. Soc. Jap.*, **45**, 1011–1018.
8. Shine H. J., Niemann C. J. (1955) *J. Amer. Chem. Soc.*, **77**, 4275–4279.
9. Уэбб Л. (1966) *Ингибиторы ферментов и метаболизма*, стр. 34, «Мир», М.
10. Bender M. L., Clement G. E., Kezdy F. J., Heck H. (1964) *J. Amer. Chem. Soc.*, **86**, 3680–3690.
11. Kaphan H., Laidler K. J. (1967) *Can. J. Chem.*, **45**, 539–565.
12. Goldstein L. (1972) *Biochemistry*, **11**, 4072–4084.
13. Goldstein L., Levin Y., Katchalski E. (1964) *Biochemistry*, **3**, 1913–1919.
14. Patel R. P., Lopiex D. V., Brown S. P., Price S. (1967) *Biopolymers*, **5**, 577–582.
15. Pecht M., Levin Y. (1972) *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, **46**, 2054–2061.
16. Levin Y., Pecht M., Goldstein L., Katchalski E. (1964) *Biochemistry*, **3**, 1905–1913.
17. Westman T. L. (1969) *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, **35**, 313–317.
18. Valenzuela P., Bender M. L. (1971) *Biochim. et biophys. acta*, **250**, 538–548.
19. Sri Ram J., Terminiello L., Bier M., Word F. F. (1954) *Arch. Biochem. and Biophys.*, **52**, 464–477.
20. Sri Ram J., Bier M. (1962) *Advan. Enzymol.*, **24**, 105–160.
21. Katchalsky A., Shavit N., Eisenberg H. (1954), *J. Polymer Sci.*, **14**, 69–84.
22. Schonbaum G. R., Zerner B., Bender M. (1961) *J. Biol. Chem.*, **236**, 2930–2935.
23. Wajnerman E. S., Grinberg W. Ja., Tolstoguzov W. B. (1972) *Kolloid — Z. und Z. Polym.*, **250**, 945–949.
24. Bender M. L., Kezdy F. J. (1965) *Annual Rev. Biochem.*, **34**, 49–76.

Поступила в редакцию
12.VII.1974

EFFECT OF POLYANIONS ON α -CHYMOTRYPSIN CATALYTIC PROPERTIES

Z. A. STRELTSOVA, E. E. BRAUDO, V. B. TOLSTOGUZOV

Institute of Organoclement Compounds, Academy of Sciences of the USSR, Moscow

The effect of various polyanions on kinetic parameters of the α -chymotrypsin-catalysed hydrolysis of N-acetyl-L-tyrosine ethyl ester has been studied. The polyanion: α -chymotrypsin interaction leads to the effect which can be accounted for by changes in ionization constants of the enzyme ionic groups involved in the catalysis. This phenomenon is probably common for various polyelectrolytes. The magnitude of the effects is dependent on the value of electrostatic potential (ψ) produced by polyanion. Provided ψ is known, a degree of polyanion effect on enzymic reaction can be predicted.