



УДК 577.156

ИЗУЧЕНИЕ ПЕРЕНОСА ПРОТОНА
ПРИ ФЕРМЕНТАТИВНОМ ГИДРОЛИЗЕ
МЕТОДОМ ТЕМПЕРАТУРНОЙ ЗАВИСИМОСТИ КИНЕТИЧЕСКОГО
ИЗОТОПНОГО ЭФФЕКТА

II. ГИДРОЛИЗ Vz-Arg-OEt β -ТРИПСИНОМ*Хоштария Д. Э.**Институт электрохимии Академии наук СССР, Москва*

В работе получены данные по температурной зависимости каталитической константы ($k_{\text{кат}}$) и кажущейся константы Михаэлиса ($K_{\text{m(каж)}}$) для реакции ферментативного гидролиза Vz-Arg-OEt β -трипсином, протекающего в легкой (H_2O) и тяжелой (D_2O) воде. Как и для реакций, катализируемых α -химотрипсином, установлено практическое равенство энергий активации для процессов переноса H и D. Кинетический изотопный эффект обусловлен в основном изменением предэкспоненциального фактора при переходе от H_2O к D_2O . Полученные результаты, как и результаты предыдущей работы, противоречат классической модели элементарного акта переноса протона и согласуются с квантово-механической теорией переноса заряда (теорией реорганизации среды).

В предыдущей работе [1] обсуждались данные по температурной зависимости кинетического изотопного эффекта для ферментативного гидролиза некоторых сложнэфирных субстратов α -химотрипсином. В рамках представлений о переносе протона в стадии, определяющей скорость реакции, были сопоставлены две модели элементарного акта переноса протона: классическая модель Хорнучи — Поляши [2,3], приписывающая энергию активации растяжению связи протона с его донором, и квантово-механическая модель, основанная на теории реорганизации среды Догонадзе — Кузнецова — Левича [4, 5]. Результаты эксперимента свидетельствовали в пользу квантовой модели, согласно которой энергия активации элементарного акта переноса протона в основном определяется реорганизацией среды, а предэкспоненциальный фактор — вероятностью туннелирования протона.

В качестве второго объекта исследования нами был выбран также протеолитический фермент — трипсин (КФ 3.4.21.4). Этот панкреатический фермент отличается от химотрипсина по специфичности, но по каталитическим свойствам и механизму действия очень близок к нему. Это обусловлено одинаковым составом функциональных групп активного центра и некоторым различием строения участка специфического связывания [6, 7].

Как показано в ряде работ, коммерческие препараты трипсина содержат набор активных форм этого фермента [8—10], в основном α и β . Эти формы обладают различными кинетическими константами, разной чувствительностью к активации субстратом [9, 10], разной стабильностью по отношению к автолизу [11], к термоинактивации [12] и несколько разли-

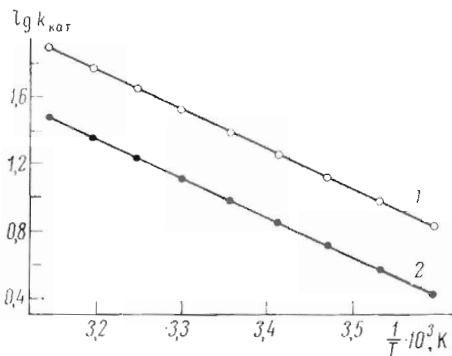


Рис. 1

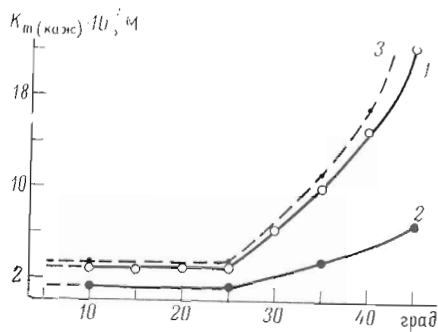


Рис. 2

Рис. 1. Аррениусовские зависимости гидролиза Vz-Arg-OEt β -трипсином в H_2O (1) и D_2O (2)

Рис. 2. Зависимость $K_m(\text{каж})$ от температуры для гидролиза Vz-Arg-OEt β -трипсином в H_2O (1) и D_2O (2) и гидролиза Vz-Arg-OMe в H_2O (3)

чающимися активационными параметрами при гидролизе специфических субстратов [13]. Основываясь на перечисленных фактах, разные авторы пришли к выводу, что α -трипсин имеет более гибкую и рыхлую структуру, являющуюся результатом расщепления пептидной связи в непрерывной последовательности β -трипсина [7, 11, 13].

Учитывая вышеизложенное, нам представилось разумным проводить кинетические измерения по возможности с очищенной β -формой трипсина.

На рис. 1 изображены аррениусовские зависимости для гидролиза Vz-Arg-OEt β -трипсином, протекающего в H_2O и D_2O . Энергии активации для данных реакций совпадают с точностью $0,04 \pm 0,05$ ккал/моль. Кинетический изотопный эффект (в среднем 2,57 во всем интервале температур 5—45°) определяется в основном изменением предэкспоненциального фактора A в кинетическом уравнении при переходе от H_2O к D_2O (см. таблицу).

Как известно, для данной реакции $k_2 \gg k_3$, $k_{\text{кат}} \approx k_3$, т. е. лимитирующей стадией является дезацилирование [6, 10]. В пользу такого утверждения говорит и то, что полученные из дополнительного эксперимента гидролиза Vz-Arg-OMe β -трипсином в H_2O значения для $k_{\text{кат}}$ и E_a совпали в пределах ошибки эксперимента с величинами, найденными в случае Vz-Arg-OEt ($k_{\text{кат}} = 24,5 \pm 0,5$; $E_a = 10,65 \pm 0,03$ ккал/моль для Vz-Arg-OEt и $k_{\text{кат}} = 24,0 \pm 0,5$; $E_a = 10,66 \pm 0,08$ ккал/моль для Vz-Arg-OMe)*. Рассуждая так же, как в работе [1], можно предположить, что измеренные энергии активации относятся к переносу протона и дейтрона при дезацилировании α -N-бензоил-L-аргинил- β -трипсина. Поведение $K_m(\text{каж})$ (рис. 2) во многом напоминает поведение этой константы в случае гидролиза α -химотрипсином.

Из полученных результатов следует, что разность энергий активации для переноса легкого и тяжелого изотопов водорода с 95%-ной надежностью не превышает 0,15 ккал/моль. Исходя из классической модели, как было показано в [4], для данной реакции переноса протона можно было бы ожидать $E_a^{D_2O} - E_a^{H_2O} \approx 1,5$ ккал/моль. По оценкам, основанным на квантово-механической теории (теории реорганизации среды), эта разность должна находиться в пределах от нуля до немногих десятых долей килокалорий на моль [1]. Таким образом, как и в случае гидролиза химотрипсином, результаты эксперимента согласуются с квантово-механической теорией переноса заряда, которая объясняет равенство энергий активации пере-

* $K_m(\text{каж})$ для этих двух субстратов несколько различаются (см. рис. 2).

Активационные параметры гидролиза Vz-Arg-OEt β -трипсином, протекающего в легкой и тяжелой воде

Среда	E_a , ккал/моль	$E_a^{D_2O} - E_a^{H_2O}$	$A \cdot 10^{-9}$, с ⁻¹	A^{H_2O}/A^{D_2O}	ΔH^\ddagger , ккал/моль	$-\Delta S^\ddagger$, э. е.
H ₂ O	10,65±0,03	0,04±0,05	1,58±0,01	2,43±0,02	10,1	18,5
D ₂ O	10,69±0,04		0,65±0,01		10,1	20,2

носа протона и дейтрона при наличии существенного кинетического изотопного эффекта туннелированием протона. Значительный изотопный эффект при равенстве энергий активации можно попытаться объяснить другими причинами (например, конформационными изменениями белка в D₂O, обсуждавшимися в работе [1]). Однако маловероятно, чтобы для каждого из двух ферментов разной конформационной устойчивости конформационные сдвиги или другие изменения вызывали изменение только энтропийного фактора, не отражаясь на активационном барьере.

Совпадение основного результата для двух разных ферментов служит серьезным подтверждением применимости квантово-механической теории переноса заряда (теории реорганизации среды) к ферментативным реакциям.

Экспериментальная часть

В работе использовали исходный трипсин, кристаллический препарат (Spofa, ЧССР); трипсиновый ингибитор из бобов сои (СТИ), лиофилизированный; Vz-Arg-OEt, Vz-Arg-OMe, а также Ac-Tyr-OEt (Reanal, Венгрия); сефароза бромцианистая (Pharmacia. Fine Chemicals, Швеция); D₂O, 99,8%, перегнанная (Всесоюзное объединение «Изотоп»); КОН, ч. д. а. (Chemapol, ЧССР); KCl, ч. д. а., перекристаллизованный и прокаленный.

β -Трипсин получали, следуя в основном методике, описанной в работе [12]. 10—15% раствор коммерческого препарата (0,05 н. KCl, 0,02 н. CaCl₂) с pH 4,4 выдерживали ~40 мин в термостатированной ячейке при 48°. После этого раствор охлаждали до 0°, фильтровали от нерастворимого материала на стеклянном фильтре и смешивали с СТИ-сефарозой* и 0,1 н. боратным буфером, pH 8,0. Полученную суспензию взбалтывали ~15 мин в колбе при 0° и промывали на стеклянном фильтре тем же буфером для удаления неактивного белка. Активный β -трипсин элюировали 0,01 н. HCl (pH 2) при 0°. Полученный раствор лиофилизировали. Промывку и выход активного белка контролировали спектрофотометрически. В связи с сильным ингибирующим действием бензамидина [12] мы воздержались от его применения во избежание влияния следов ингибитора на кинетику. Это могло несколько увеличить количество неактивного белка, а также α -формы фермента, однако для нас важнее было получить неискаженную кинетическую картину. По той же причине мы не добавляли ионов кальция на заключительном этапе очистки. Количество активного фермента в полученном препарате, определенное по титрованию *n*-нитрофениловым эфиром *n'*-гуанидинобензойной кислоты [14], составляло 65% от всего белка. Около 3% составляли примеси химотрипсина, количество которого определяли по реакции с Ac-Tyr-OEt**. По нашим оценкам, в полученном

* СТИ-сефарозу получали, согласно инструкции фирмы «Pharmacia. Fine Chemicals», с той разницей, что на 1 г активированной бромцианом сефарозы брали ~ 100 мг трипсинового ингибитора. Этианолами для нейтрализации непрореагировавших групп не добавляли ввиду большого избытка СТИ. Такое соотношение обеспечивает выход β -трипсина примерно 30 мг на 1 г сефарозы.

** При использовании вышеописанной методики получения β -трипсина мы наблюдали некоторое обогащение препарата химотрипсином (около 3% против ~ 0,5% в коммерческом препарате), однако для наших целей это было несущественно, так как химотрипсин по отношению к специфическим субстратам трипсина не проявляет ощутимой активности.

препарате β -трипсин составлял не менее 80% от всего активного белка (в работе [12] эта цифра составляла 90%). Это подтверждается и полученной нами величиной константы Михаэлиса $K_{m(\text{кат})} = (3,0 \pm 0,5) \cdot 10^{-6}$ М (при 25°); для β - и α -форм $(3,0 \pm 0,5) \cdot 10^{-6}$ и $(6,0 \pm 2,0) \cdot 10^{-6}$ М соответственно [9, 10].

Раствор β -трипсина (сначала концентрацией 5 мг/мл) готовили из лиофилизованного препарата в день эксперимента. Нужная концентрация достигалась вторичным разбавлением. Все растворы β -трипсина приготавливались на 10^{-3} н. HCl и DCl, так как в этих условиях трипсин, как и химотрипсин, наиболее устойчив. В D_2O трипсин сохраняет свою активность. В этом мы убедились, проведя титрование активных центров β -трипсина по методу [14] в буфере, приготовленном на D_2O , а также мгновенным вводом раствора β -трипсина в D_2O в водный (H_2O) раствор субстрата. 10^{-3} н. концентрацию DCl достигали разбавлением 2,5 н. HCl в D_2O . Рабочая концентрация β -трипсина $(5-50) \cdot 10^{-7}$ М.

Растворы Vz-Arg-OEt и Vz-Arg-OMe готовили сначала концентрированными в H_2O и D_2O . Рабочую концентрацию субстратов $(1-5) \cdot 10^{-4}$ М выбирали из условия $[S]_0 < 10^{-3}$ М, так как, по данным [15], при $[S]_0 \geq 10^{-3}$ М происходит некоторая активация этими субстратами.

Растворы KOH, KOD (титрант) готовили растворением твердой KOH в H_2O , D_2O . Концентрация KCl (фоновая соль) 0,1 н. Конечный объем рабочего раствора в кювете 3,0 мл, при определении константы Михаэлиса — 10,0 мл.

Ошибка при кинетических измерениях, вызванная присутствием некоторого количества H_2O , вносимого с реактивами в D_2O , не превышает 0,8% (см. [1]).

Кинетические измерения проводили на рН-стате фирмы Radiometer (Дания). Для измерения скорости реакции использовали начальные участки кинетических кривых (первые 0,5—1 мин). Глубина превращения для субстратов составляла 10—15%, в отдельных случаях достигала 25%. Раствор с субстратом перед вводом β -трипсина термостатировали с точностью $\pm 0,1^\circ$ и продували азотом. Фермент в количестве 0,1 мл быстро вводили в ячейку в последнюю очередь. После ввода β -трипсина поддерживали азотную атмосферу. Кинетические измерения проводили в рН (pD)-независимой области при рН 8,5 (согласно нашим измерениям, $k_{\text{кат}}$ неизменна в области рН 8,3—10,0).

Данные взяты из двух-трех серий экспериментов для каждой зависимости $\lg k_{\text{кат}}$ от $1/T$. Все серии проводили с контролем активности фермента в начале и конце серии в стандартных условиях. Измерения вели при 9 значениях температуры. Для каждого значения температуры получено расхождение величин $k_{\text{кат}}$ не более 2%. Энергии активации, предэкспоненциальные факторы и их дисперсии рассчитаны по методу наименьших квадратов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Хоптария Д. Э., Тополев В. В., Кришталик Л. И. (1978) Бюорган. химия, 4, 1341—1351.
2. Horiuti L., Polanyi M. (1935) Acta physicoch. USSR, 2, 505—532.
3. Richards T. H. (1970) in: The Enzymes (Boyer P. D., ed.), Third Edition, vol. 2, pp. 321—333, Acad. Press, N. Y.
4. Догонадзе Р. Р., Кузнецов А. М. (1973) в сб.: Итоги науки и техники. Сер. «Физическая химия. Кинетика», т. 2, с. 7—203, ВИНТИ, М.
5. Догонадзе Р. Р., Кришталик Л. И. (1975) Успехи химии, 44, 1987—2000.
6. Bender M. L., Kézdy F. J. (1965) Ann. Rev. Biochem., 34, 49—76.
7. Keil B. (1971) in: The Enzymes (Boyer P. D., ed.), Third Edition, vol. 3, pp. 249—275, Acad. Press, N. Y.
8. Schroeder D. D., Shaw E. (1968) J. Biol. Chem., 243, 2943—2949.
9. Березин И. В., Казанская Н. Ф., Ларионова Н. И. (1970) Биохимия, 35, 983—988.
10. Казанская Н. Ф., Ларионова Н. И., Филиппова Н. Ю., Баратова Л. А., Беляева Л. П. (1977) Вестн. Моск. ун-та. Сер. «Химия», 18, 299—303.

11. Nureddin A., Inagami T. (1975) *Biochem. J.*, **147**, 71—81.
12. Beardslee R. A., Zahnley J. C. (1973) *Arch. Biochem. and Biophys.*, **158**, 806—811.
13. Roberts D. V., Elmore D. T. (1974) *Biochem. J.*, **141**, 545—554.
14. Chase T., Jr., Shaw E. (1967) *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, **29**, 508—514.
15. Trowbridge C. G., Krehbiel A., Laskowski M., Jr. (1963) *Biochemistry*, **2**, 843—850.

Поступила в редакцию
12.VI.1978

INVESTIGATION OF THE PROTON TRANSFER IN ENZYMATIC HYDROLYSIS
BY THE METHOD OF TEMPERATURE DEPENDENCE OF KINETIC
ISOTOPE EFFECT II. β -TRYPSIN CATALYZED HYDROLYSIS OF Bz-Arg-OEt

KHOSHTARIYA D. E.

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

Temperature dependences of the catalytic constant and the apparent Michaelis constant of the β -trypsin catalyzed hydrolysis of Bz-Arg-OEt were measured for H₂O and D₂O solutions. The activation energy of H and D isotope transfer at the deacylation step was practically equal (10.65 ± 0.03 and 10.69 ± 0.04 , respectively, over the 5—45° temperature range). The reason for observed kinetic isotope effect of 2.57 lies mainly in the preexponential factor changes upon transition from H₂O to D₂O. These results, along with those obtained earlier for α -chymotrypsin catalyzed hydrolysis, are inconsistent with the classical model of the elementary act of proton transfer, but are in accord with the quantum-mechanical theory which states that a proton is tunnelled and the activation is the result of a polar medium reorganization.
