

УДК 577.152.3

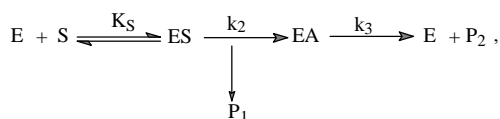
## КИНЕТИЧЕСКАЯ ДЕМОНСТРАЦИЯ ЛОКАЛЬНЫХ КОНФОРМАЦИОННЫХ ИЗМЕНЕНИЙ ВБЛИЗИ АКТИВНОГО ЦЕНТРА $\alpha$ -ХИМОТРИПСИНА В СМЕСЯХ ВОДА – ДИМЕТИЛСУЛЬФОКСИД

Е. А. Беляева, Н. Л. Еремеев\*

(кафедра энзимологии химического факультета Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова; Воробьевы горы, Москва 119899, Россия;  
факс: (095)-939-27-42; e-mail: eremeev@enzyme.chem.msu.ru)

Изучено влияние структуры и скорость-лимитирующей стадии реакции гидролиза субстратов, различающихся между собой N-ацильными заместителями и уходящими группами, на кинетическое поведение  $\alpha$ -химотрипсина в системе вода–диметилсульфоксид (ДМСО) при неденатурирующих концентрациях органического растворителя (менее 30 об.%). Показано, что фактором, определяющим наблюдаемые кинетические закономерности, является структура N-заместителя аминокислотной группы субстрата. Выдвинуто предположение о том, что ДМСО специфическим образом взаимодействует с белковой глобулой  $\alpha$ -химотрипсина, по всей вероятности, в районе сорбционного участка R<sub>1</sub>-группы субстрата. Ковалентная иммобилизация  $\alpha$ -химотрипсина в полиакриламидный гель протектирует белок по отношению как к неспецифическому (денатурирующему), так и к специфическому действию ДМСО. Совокупность полученных данных позволяет утверждать, что специфическое взаимодействие ДМСО с  $\alpha$ -химотрипсином (предположительно в кармане связывания R<sub>1</sub>-группы N-замещенных аминокислотных субстратов) индуцирует локальные конформационные изменения «нативной» структуры активного центра фермента.

Зависимость спектральных свойств растворенных белков от концентрации полярного органического растворителя имеет обычно пороговый характер [1], что, как считается, связано с обратимой денатурацией белковой глобулы при достижении «критической» концентрации органического растворителя (обычно от 10 до 40 об.% в зависимости от конкретной пары белок – растворитель [2]). В то же время литературные данные, описывающие кинетическое поведение ферментов (в частности, сериновых протеиназ) в «докритических» концентрациях органического растворителя, довольно противоречивы. Так, например, для  $\alpha$ -химотрипсина в смесях вода – ДМСО (критическая концентрация 30 об.% [1]) отмечалось как пороговое падение ферментативной активности при увеличении концентрации органического растворителя в системе [1, 2], так и классическая картина неконкурентного ингибирования [3, 4]. При смене растворителя на этанол и N,N-диметилформамид были отмечены весьма значительные активационные эффекты [5, 6]. Анализ литературных данных показал, что в каждом случае использовались субстраты, различающиеся соотношением констант скоростей индивидуальных стадий ферментативного гидролиза. Как известно, кинетика гидролиза  $\alpha$ -химотрипсином различных субстратов описывается трехстадийной схемой [7]



где E – фермент, S – субстрат (в общем виде R<sub>1</sub>NHCH(R<sub>2</sub>)C(O)R<sub>3</sub>), ES – фермент-субстратный комплекс, EA – ацил-фермент, P<sub>1</sub> и P<sub>2</sub> – продукты ферментативной реакции на стадии образования ацил-фермента и его гидролиза соответственно. В зависимости от уходящей группы (R<sub>3</sub>) скорость-лимитирующей стадией может являться либо образование ацил-фермента (k<sub>2</sub>, амидные и нитроанилидные субстраты), либо его распад (k<sub>3</sub>, эфирные субстраты).

Резкое падение активности в относительно небольших концентрациях органического растворителя отмечалось в работах с использованием эфирных субстратов  $\alpha$ -химотрипсина [3, 4], в то время как при использовании нитроанилидных субстратов наблюдалась пороговая зависимость [1, 2] или активационные эффекты [5, 6].

Целью настоящей работы явилось выявление влияния структуры и скорость-лимитирующей стадии реакции гидролиза субстрата (использованные субстраты приведены в таблице) на кинетическое поведение  $\alpha$ -химотрипсина в системе вода – ДМСО при неденатурирующих концентрациях ДМСО в смеси (менее 30 об.%).

### Материалы и методы

В экспериментах использовали кристаллический  $\alpha$ -химотрипсин марки А (ОАО «Самсон», Россия); акриламид (АА), N,N'-метилден-бисакриламид (МБА), N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин (ТЕМЕД), персульфат аммония (Reanal, Венгрия); диметилсульфоксид (ОАО «Химреактивкомплект», Россия), акрилоилхлорид (Merk, Германия). Субстраты: этиловый эфир N-ацетил-L-тирозина

\*Адресат для переписки.

(АТЭЭ), этиловый эфир N-бензоил-L-тирозина (БТЭЭ), p-нитроанилид N-ацетил-L-тирозина (АТНА), p-нитроанилид N-бензоил-L-тирозина (БТНА) синтезированы группой органической химии кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова (чистота не менее 99%). Соли и компоненты буферных растворов марки не ниже «ч.д.а.» (Реахим, Россия).

**Получение препаратов иммобилизованного α-химотрипсина.** Препараты иммобилизованного α-химотрипсина получали по методике, описанной в [9]. К 5 мл раствора α-химотрипсина (концентрация от 0,2 до 0,8 мМ) в 0,1 М аммиачно-ацетатном буфере (0,05 М CaCl<sub>2</sub>, pH 8,0) при 0° и перемешивании добавляли три порции акрилоилхлорида по 10 мкл с интервалом в 15 мин и инкубировали при комнатной температуре еще 30 мин. К полученному раствору акрилоилхимотрипсина добавляли мономер (AA, 1 г), сшивающий агент (МБА, 100 мкл водного раствора концентрации 18 мг/мл), вводили инициаторы (100 мкл водного 0,78 М раствора персульфата аммония и 50 мкл ТЕМЕД) и проводили сополимеризацию в блоке. Полученный блок-сополимер измельчали в гомогенизаторе до частиц размером 20–150 мкм и промывали солевым раствором (0,2 М NaCl, 0,02 М CaCl<sub>2</sub>) или фосфатным буфером (0,05 М, pH 9,0) до исчезновения ферментативной активности в промывных водах (обычно 3–4 раза).

**Определение ферментативной активности нативного и иммобилизованного α-химотрипсина.** Активность нативного и иммобилизованного α-химотрипсина определяли по начальным скоростям гидролиза субстратов в pH-оптimumе их действия (pH 8,0 и 9,0 для нативного и иммобилизованного соответственно) при температуре 20°. В реакции гидролиза АТНА и БТНА активность определяли спектрофотометрически, в реакции гидролиза АТЭЭ и БТЭЭ – потенциометрически.

**Спектрофотометрический метод.** Активность определяли на спектрофотометре EPS-124 (Hitachi, Япония) при длине волны 390 нм (0,05 М Na-фосфатный буфер). Концентрации субстратов варьировали от 0,025 до 0,32 мМ. Коэффициент экстинкции продукта (p-нитроанилида) определяли независимо для каждой использованной концентрации ДМСО в водно-органической смеси.

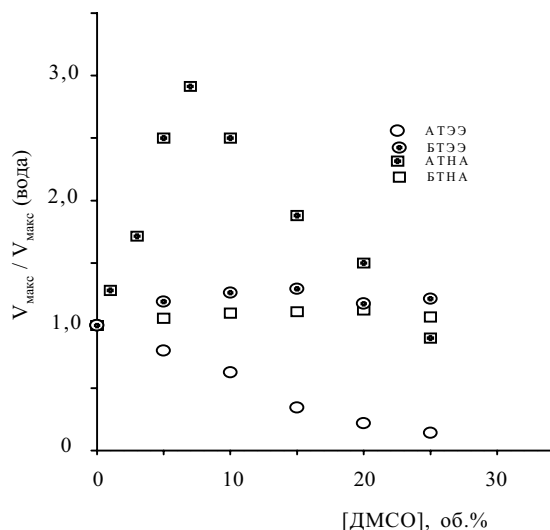


Рис. 1. Зависимость относительных максимальных скоростей реакции гидролиза АТЭЭ, БТЭЭ, АТНА и БТНА нативным α-химотрипсином от концентрации ДМСО в смеси (20°, pH 8,0)

**Константы индивидуальных стадий гидролиза α-химотрипсином субстратов, использованных в работе**

Субстрат	k <sub>2</sub> , с <sup>-1</sup>	k <sub>3</sub> , с <sup>-1</sup>	k <sub>кат</sub> , с <sup>-1</sup>
Этиловый эфир N-ацетил-L-тирозина [8]	5000	200	192
Этиловый эфир N-бензоил-L-тирозина [8]	249	131	85,9
p-Нитроанилид N-ацетил-L-тирозина	k <sub>2</sub> << k <sub>3</sub>		0,041
p-Нитроанилид N-бензоил-L-тирозина [5]	k <sub>2</sub> << k <sub>3</sub>		0,100

**Потенциометрический метод.** Активность определяли на pH-стате RTS-822 (Radiometer, Дания). Объем ячейки 5 мл, ионная сила создавалась 0,2 М NaCl и 0,02 М CaCl<sub>2</sub>. Концентрации субстратов варьировали от 2,5 до 10 мМ.

Максимальные скорости реакций и константы Михаэлиса для реакций гидролиза различных субстратов нативным и иммобилизованным α-химотрипсином определяли из зависимостей начальных скоростей гидролиза от концентрации субстрата в координатах Лайнуивера–Берка.

**Результаты и их обсуждение**

Данные по изменению относительных максимальных скоростей реакции гидролиза различных субстратов нативным α-химотрипсином в зависимости от концентрации ДМСО в смеси приведены на рис. 1, где показано, что кинетическое поведение α-химотрипсина в смесях вода – ДМСО сильно зависит от используемого субстрата. Определяющим фактором здесь являются вовсе не природа гидролизуемой связи (рис. 1) и не скорость-лимитирующая стадия гидролиза субстрата (таблица), а структура N-заместителя аминокруппы L-тирозина. Если кинетические данные по гидролизу эфирного и нитроанилидного N-бензоил-замещенных субстратов практически идентичны, то смена N-заместителя на ацетильную группу приводит к появлению существенных различий в наблюдаемой кинетической картине (резкое падение активности уже в низких концентрациях ДМСО для эфирного субстрата и значительная активация в тех же концентрациях ДМСО для нитроанилидного субстрата).

Очевидно, что подобное различие в поведении нативного α-химотрипсина при гидролизе разных субстратов является следствием того, что ДМСО специфическим образом взаимодействует с белковой глобулой, по всей вероятности, в районе сорбционного участка R<sub>1</sub>-группы субстрата. Известно, что связывание R<sub>1</sub>-остатка расщепляемого субстрата в активном центре α-химотрипсина происходит за счет гидрофобных взаимодействий с остатками Ile99 и (или) Trp215 [10]. При этом субстраты, имеющие более гидрофобный N-бензоильный заместитель, связываются α-химотрипсином значительно более эффективно (уменьшение уровня стандартной свободной энергии фермент-субстратного комплекса при переходе от N-ацетильных к N-бензоильным производным аминокислот составляет 2,7–2,9 ккал/моль [11]). Таким образом, если молекула ДМСО способна занимать карман сорбции R<sub>1</sub>-группы субстрата, то можно предположить, что на стадии

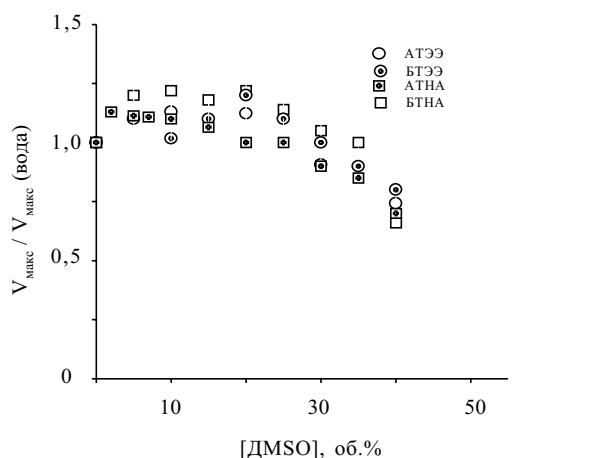


Рис. 2. Зависимость относительных максимальных скоростей реакции гидролиза АТЭЭ, БТЭЭ, АТНА и БТНА  $\alpha$ -химотрипсином, иммобилизованным в поли-АА гель, от концентрации ДМСО в смеси (20°, pH 9,0)

образования фермент-субстратного комплекса N-бензоильный заместитель способен к вытеснению этой молекулы (структуры образованных в воде и смесях вода – ДМСО фермент-субстратных комплексов идентичны), в то время как для существенно менее гидрофобной ацетильной группы такое вытеснение энергетически невыгодно.

Косвенным подтверждением данного вывода является характер изменения значения констант Михаэлиса использованных субстратов. Если для N-бензоил-замещенных субстратов величины  $K_m$  в пределах ошибки эксперимента не зависят от концентрации ДМСО в смеси, то для N-ацетил-замещенных производных уже в минимальных концентрациях ДМСО происходит примерно двукратное увеличение величины  $K_m$ , после чего значение константы вновь становится постоянным. Это говорит о том, что ДМСО не влияет на связывание N-бензоил-замещенных субстратов, но ухудшает взаимодействие их N-ацетил-содержащих аналогов с активным центром  $\alpha$ -химотрипсина.

Таким образом, в смесях вода – ДМСО  $\alpha$ -химотрипсин, предположительно, катализирует гидролиз N-бензоил-замещенных субстратов из «нативной» структуры фермент-субстратного комплекса, в то время как при использовании N-ацетил-замещенных субстратов гидролиз осуществляется из некоей его структурной модификации, образовавшейся в результате взаимодействия белковой глобулы с молекулами ДМСО. Как видно из зависимостей максимальных скоростей реакций гидролиза N-ацетил-за-

мещенных субстратов от концентрации ДМСО в реакционной смеси (рис. 1), такое изменение структуры активного центра фермента (или фермент-субстратного комплекса) вызывает возникновение двух параллельных процессов – уменьшение величины  $k_3$  (АТЭЭ, рис. 1) и увеличение величины  $k_2$  (АТНА, рис. 1). Результатом является смена скорость-лимитирующей стадии гидролиза АТНА  $\alpha$ -химотрипсином.

Для проверки предположения о возникновении конформационных изменений в районе активного центра фермента в смесях вода – ДМСО было исследовано кинетическое поведение  $\alpha$ -химотрипсина, ковалентно иммобилизованного в поли-акриламидный (поли-АА) гель (многоочечная ковалентная иммобилизация белков – один из наиболее широко применяемых методов протектирования ферментов против конформационных изменений). Как видно из рис. 2, ужесточение нативной конформации  $\alpha$ -химотрипсина в результате многоочечного связывания с носителем действительно стабилизирует белковую глобулу от разворачивания (напомним, что нативный  $\alpha$ -химотрипсин денатурирует уже при 30 об.% ДМСО в смеси, в то время как иммобилизованный препарат демонстрирует достаточно большой процент сохранения активности вплоть до 40 об.% ДМСО). Самое интересное, однако, заключается в том, что для иммобилизованного фермента зависимости максимальных скоростей гидролиза от концентрации ДМСО абсолютно идентичны для всех использованных субстратов. Более того, ход этих зависимостей повторяет ход аналогичных зависимостей для гидролиза N-бензоил-замещенных субстратов нативным  $\alpha$ -химотрипсином. Отсюда можно сделать вывод о том, что, во-первых, взаимодействие молекул ДМСО с белковой глобулой действительно вызывает конформационные изменения в активном центре  $\alpha$ -химотрипсина и, во-вторых, высокая энергия сорбции N-бензоильного заместителя субстрата, как и ужесточение конформации белка в результате многоочечной ковалентной иммобилизации, протектирует «нативную» конформацию активного центра фермента (фермент-субстратного комплекса) от специфического влияния ДМСО. Совокупность полученных данных позволяет утверждать, что специфическое взаимодействие ДМСО с  $\alpha$ -химотрипсином (предположительно в кармане связывания  $R_1$ -группы N-замещенных аминокислотных субстратов) индуцирует локальные конформационные изменения «нативной» структуры активного центра фермента.

Авторы выражают благодарность В.В. Рыжовой и Н.А. Усковой за синтез субстратов, использованных в данной работе.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке РФФИ (грант № 98-03-32204а).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Белова А.Б., Можяев В.В., Левашов А.В., Сергеева М.В. и др. // Биохимия. 1991. **56**. С. 1923.
- Mojaev V.V., Khmelniisky Yu.L., Sergeeva M.V., Belova A.B. // Eur. J. Biochem. 1989. **184**. P. 597.
- Moresoli Ch., Zaza Ph., Flaschel E., Renkel A. // Biocatalysis. 1992. **5**. P. 203.
- Еремеев Н.Л., Беляева Е.А., Казанская Н.Ф. // Биоорг. химия. 1999. **25**. С. 444.
- Gladilin A.K., Kudryashova E.V., Vakurov A.V. // Biotechnol. Lett. 1995. **17**. P. 1329.
- Kudryashova E.V., Gladilin A.K., Vakurov A.V. // Biotechnol. Bioeng. 1997. **55**. P. 267.
- Клесов А.А., Березин И.В. Ферментативный катализ. М., 1980. С. 107.
- Клесов А.А., Березин И.В. Ферментативный катализ. М., 1980. С. 115.
- Еремеев Н.Л., Сиголаева Л.В., Казанская Н.Ф. // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. 1992. **33**. С. 511.
- Segal D., Powers J.C., Cohen G.H. // Biochemistry. 1971. **10**. P. 3728.
- Клесов А.А., Цетилин В.И. // Биоорг. химия. 1977. **3**. С. 1523.

Поступила в редакцию 20.06.00