



УДК 577.156.3.02

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

III. ГИДРОЛИЗ ЭТИЛОВЫХ ЭФИРОВ N-АЦЕТИЛТИРОЗИНА  
И N-БЕНЗОИЛТИРОЗИНА  $\alpha$ -ХИМОТРИПСИНОМ,  
ИММОБИЛИЗОВАННЫМ НА РАСТВОРИМОМ ДЕКСТРАНЕ

*Хоштария Д.Э., Тополев В.В., Криштáлик Л.И.*

*Институт электрохимии Академии наук СССР, Москва*

*Рейзер И.Л., Торчилин В.П.*

*Всесоюзный кардиологический научный центр  
Академии медицинских наук СССР, Москва*

Показано равенство энергий активации для переноса изотопов  $^1\text{H}$  и  $^2\text{H}$  и тем самым справедливость квантово-механической модели переноса протона (теории реорганизации среды) для систем с участием иммобилизованного на полисахаридном носителе  $\alpha$ -химотрипсина. Показано также, что энергия активации реакции и кинетический изотопный эффект не меняются при иммобилизации данного типа. На основании полученных данных сделано предположение, что при иммобилизации конформация активного центра  $\alpha$ -химотрипсина не изменилась.

В предыдущих работах этой серии [1, 2] сделана попытка распространения представлений квантово-механической модели переноса протона [3, 4] на ферментативные реакции. Для фермент-субстратных систем Ac-Tyr-OEt -  $\alpha$ -химотрипсин, Vz-Tyr-OEt -  $\alpha$ -химотрипсин, Vz-Arg-OEt -  $\beta$ -трипсин было показано практическое равенство энергий активации для переноса изотопов  $^1\text{H}$  и  $^2\text{H}$  и тем самым справедливость квантовой модели.

В дальнейшем нам представилось интересным использование систем с участием иммобилизованных ферментов. Изучение влияния иммобилизации на активационные параметры ферментативной реакции в сочетании с применением метода температурной зависимости кинетического изотопного эффекта может способствовать как выяснению общих закономерностей ферментативного катализа, так и установлению закономерностей, связанных с воздействием иммобилизации на фермент. Кроме того, иммобилизованные ферменты, как правило, обладают повышенной термостабильностью [5], что облегчает проведение и увеличивает возможные температурные интервалы кинетических измерений.

В качестве первого объекта такого рода нами был выбран  $\alpha$ -химотрипсин, иммобилизованный на растворимом декстрани после активирования полисахаридного носителя окислительным введением альдегидных групп,

Таблица 1

Энергии активации (ккал/моль) для реакций гидролиза субстратов  $\alpha$ -химотрипсином в нативной и иммобилизованных формах в  $H_2O$  и  $^2H_2O$

Субстрат	Растворитель	$t, ^\circ C$	Нативный $\alpha$ -химотрипсин	$t, ^\circ C$	Д- $\alpha$ -химотрипсин I	$t, ^\circ C$	Д- $\alpha$ -химотрипсин II
Ac-Tyr-OEt	$H_2O$	5-30	11,14 $\pm$ 0,05	5-40	11,32 $\pm$ 0,09	5-40	10,95 $\pm$ 0,06
	$^2H_2O$		11,16 $\pm$ 0,09		11,20 $\pm$ 0,04		11,16 $\pm$ 0,09
Bz-Tyr-OEt	$H_2O$	5-20	12,30 $\pm$ 0,02	5-20	12,26 $\pm$ 0,05	5-20	12,11 $\pm$ 0,09
	$^2H_2O$		12,40 $\pm$ 0,09		12,51 $\pm$ 0,09		12,23 $\pm$ 0,17
Bz-Tyr-OEt	$H_2O$	30-45	9,29 $\pm$ 0,06	30-45	9,41 $\pm$ 0,08	30-50	9,30 $\pm$ 0,10
	$^2H_2O$		9,32 $\pm$ 0,10		9,27 $\pm$ 0,12		9,34 $\pm$ 0,07

Таблица 2

Каталитические константы для реакции гидролиза этиловых эфиров N-ацетилтирозина и N-бензоилтирозина  $\alpha$ -химотрипсином в нативной и иммобилизованных формах

$k_{кат}, c^{-1} (25^\circ C)$	Нативный $\alpha$ -химотрипсин	Д- $\alpha$ -химотрипсин I	Д- $\alpha$ -химотрипсин II
Ac-Tyr-OEt	198	136	120
Bz-Tyr-OEt	80	63	66

способных легко взаимодействовать с  $\epsilon$ -аминогруппами остатка лизина белковой цепи с образованием шиффовых оснований [6]. Шиффовы основания с целью упрочения связи белок—матрица были восстановлены действием боргидрида натрия [6, 7]. Ранее было показано, что иммобилизованный таким образом  $\alpha$ -химотрипсин сохраняет высокую каталитическую активность и обладает существенно повышенной термостабильностью [6]. Полисахаридный носитель удобен тем, что он не несет зарядов и при его использовании эффект ковалентной пришивки не осложнен электростатическими эффектами, аналогичными описанным в работах [8, 9].

Нами были использованы два типа иммобилизованного на растворимом декстрани  $\alpha$ -химотрипсина. В первом случае, по данным титрования свободных аминогрупп в пересчете на одну молекулу  $\alpha$ -химотрипсина, число групп белка, образовавших ковалентные связи с носителем, составляет  $\sim 6$  (из 16 реакционноспособных аминогрупп химотрипсина), а во втором случае  $\sim 12$  (обозначим соответственно Д- $\alpha$ -химотрипсин I и Д- $\alpha$ -химотрипсин II).

Аррениусовские зависимости для реакции гидролиза Ac-Tyr-OEt производными: Д- $\alpha$ -химотрипсином I и Д- $\alpha$ -химотрипсином II в  $H_2O$  и  $^2H_2O$ , как и в случае гидролиза нативным  $\alpha$ -химотрипсином (см. рис. 1 в [1]), дают четкие прямые с одинаковыми наклонами. Разница в том, что в случае иммобилизованного фермента благодаря его высокой термостабильности удалось расширить интервал температур кинетических измерений с 5-30 до 5-40°. Как видно из табл. 1, энергии активации переноса изотопов  $^1H$  и  $^2H$  практически совпадают при гидролизе ферментом, иммобилизованным двумя способами. Энергия активации практически не изменяется и при переходе от нативного фермента к Д- $\alpha$ -химотрипсину I и II\*.

\* Равенство энергий активации для реакций гидролиза нативным и иммобилизованным как на полиметакриловом теле, так и на полиметакриловой кислоте  $\alpha$ -химотрипсином следует также из работы [10].

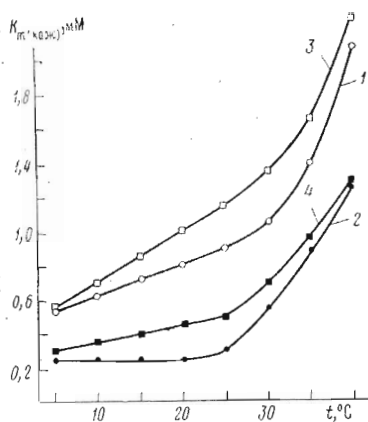


Рис. 1

Рис. 1. Зависимость  $K_{m(\text{наж})}$  от температуры для гидролиза Ac-Tyr-OEt в  $\text{H}_2\text{O}$  (1, 3) и  $\text{D}_2\text{O}$  (2, 4) Д- $\alpha$ -химотрипсином I (1, 2) и Д- $\alpha$ -химотрипсином II (3, 4)

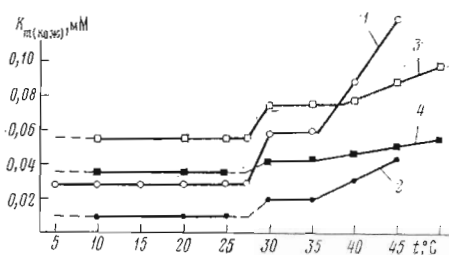


Рис. 2

Рис. 2. Зависимость  $K_{m(\text{наж})}$  от температуры для гидролиза Bz-Tyr-OEt в  $\text{H}_2\text{O}$  (1, 3) и  $\text{D}_2\text{O}$  (2, 4) Д- $\alpha$ -химотрипсином I (1, 2) и Д- $\alpha$ -химотрипсином II (3, 4)

Практически не изменилась и величина кинетического изотопного эффекта. Она составляет 2,94; 2,83 и 2,87 для  $\alpha$ -химотрипсина и фермента, иммобилизованного по типу I и II соответственно. Кинетический изотопный эффект в принципе должен быть чувствительным к расположению частиц в переходном состоянии. Тот факт, что при иммобилизации он не меняется, свидетельствует о неизменности вероятности туннельного переноса протона. Это показывает, что в изученных системах иммобилизация не приводит к сколько-нибудь существенным изменениям в геометрии активного центра фермента в переходном состоянии. Небольшое уменьшение каталитической константы (табл. 2) можно приписать некоторому (порядка 1 э. е.) увеличению энтропии активации переноса протона (точнее, той части энтропии, которая связана с классической подсистемой) при иммобилизации.

Все сказанное выше относительно гидролиза Ac-Tyr-OEt справедливо и для гидролиза Bz-Tyr-OEt в присутствии иммобилизованных форм  $\alpha$ -химотрипсина. Здесь для величин кинетического изотопного эффекта имеем 2,50; 2,55 и 2,57 для нативной формы, Д- $\alpha$ -химотрипсина I и II соответственно. Положение точки перелома на графике аррениусовской зависимости для этого субстрата [1] не изменилось при переходе к иммобилизованному ферменту. Отсюда можно заключить, что иммобилизация  $\alpha$ -химотрипсина на декстране не меняет характер его температурного конформационного перехода.

В случае обоих субстратов  $K_{m(\text{наж})}$  для гидролиза Д- $\alpha$ -химотрипсином I практически совпадает с  $K_{m(\text{наж})}$  нативного  $\alpha$ -химотрипсина (рис. 1, 2). Для Д- $\alpha$ -химотрипсина II величина  $K_{m(\text{наж})}$  и характер ее изменения с температурой несколько иной, что, по-видимому, является следствием тонких изменений факторов внутридиффузионного характера и конформационной подвижности фермента.

Из приведенных экспериментальных данных следует, что квантово-механическая модель переноса протона справедлива также и для фермент-субстратных систем, включающих этиловые эфиры N-ацетилтирозина, N-бензоилтирозина и препараты  $\alpha$ -химотрипсина, иммобилизованного на декстране, отличающихся от аналогичных систем с нативным  $\alpha$ -химотрипсином [1] существенно меньшей конформационной подвижностью фермента.

Практическое совпадение величин кинетического изотопного эффекта и энергий активации для нативного и иммобилизованного указанным способом ферментов свидетельствует о том, что конформация активного центра  $\alpha$ -химотрипсина не изменилась при иммобилизации, хотя возможны незначительные конформационные изменения третичной структуры, сопровождающие характерную вообще для иммобилизации ее стабилизацию [5, 11].

### Экспериментальная часть

В работе использовали  $\alpha$ -химотрипсин (Sigma, США) с уд. акт. 50%, определенной по методу [12]; водорастворимый декстран с  $M$  35 000—50 000 (NBC, США); Ac-Tyr-OEt (Reanal, Венгрия); Bz-Tyr-OEt (Calbiochem, США);  $^2\text{H}_2\text{O}$  99,9%, перегнанную (Всесоюзное объединение «Изотоп»).

Альдегиддекстран двух типов готовили по методике, описанной в [6]. В первом случае число окисленных звеньев на 100 звеньев декстрана было 22 (ДI), в втором — 41 (ДII). Д- $\alpha$ -химотрипсин I получали так, как описано в работе [6]. Д- $\alpha$ -химотрипсин II готовили следующим методом: 40 мг  $\alpha$ -химотрипсина, растворенного в 0,1 М фосфатном буфере (рН 7,8), перемешивали вместе с 80 мг ДII при 4° в течение 15 ч. По данным гель-хроматографии на колонке с сефадексом G-75,  $\alpha$ -химотрипсин в этих условиях с ДII связывается полностью. Количество иммобилизованного фермента определяли спектрофотометрически (Perkin-Elmer, США) по поглощению при 280 нм. Восстановление иминной связи между белком и носителем проводили добавлением избытка  $\text{NaBH}_4$  при рН 8 с последующим разложением непрореагировавшего  $\text{NaBH}_4$  подкислением смеси 0,1 М  $\text{HCl}$  до рН 4 [6, 7]. Полученные растворы Д- $\alpha$ -химотрипсина I и II диализовали против дистиллированной воды.

В случае Д- $\alpha$ -химотрипсина I на 1 г носителя было связано 200 мг белка, в случае Д- $\alpha$ -химотрипсина II — 500 мг. Концентрация активных центров, определенная по методу [12], практически не изменилась после иммобилизации фермента по способу 1, а во втором случае составляла 25% от концентрации активных центров исходного  $\alpha$ -химотрипсина. Число  $\epsilon$ -аминогрупп белка, образовавших ковалентные связи с носителем, определяли по данным титрования свободных аминогрупп тринитробензолсульфокислотой по методу [13]. Для Д- $\alpha$ -химотрипсина I число свободных аминогрупп составляло 56%, а для Д- $\alpha$ -химотрипсина II — 25% от всех реакционноспособных групп нативного фермента.

Концентрированные растворы иммобилизованного фермента хранили в холодильнике при 4°. Нужная концентрация достигалась разбавлением в дистиллированной воде. Рабочая концентрация активных центров иммобилизованного химотрипсина  $(1-10) \cdot 10^{-8}$  М. Все остальные растворы готовили по методике, описанной в работе [1].

Кинетические измерения проводили на рН-стате фирмы Radiometer (Дания) по ранее описанной методике [1]. Для Ac-Tyr-OEt измерения проводили при 8 значениях температуры, для Bz-Tyr-OEt — при 9 (в случае Д- $\alpha$ -химотрипсина I) и при 10 (в случае Д- $\alpha$ -химотрипсина II). Энергия активации и их дисперсии рассчитаны по методу наименьших квадратов.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Хоштария Д. Э., Тополев В. В., Кришталек Л. И. (1978) Биоорган. химия, 4, 1341—1351.
2. Хоштария Д. Э. (1978) Биоорган. химия, 4, 1673—1677.
3. Догондзе Р. Р., Кузнецов А. М. (1973) в сб.: Итоги науки и техники. Серия «Физическая химия. Кинетика», т. 2, с. 7—203, ВИНТИ, М.
4. Догондзе Р. Р., Кришталек Л. И. (1975) Успехи химии, 44, 1987—2000.
5. Иммобилизованные ферменты. Современное состояние и перспективы (1976) т. 2,

- з. 1-17, Березин И. В., Антонов В. К., Мартинек К. (ред.), Изд. Московского ун-та.
6. Торчилин В. П., Рейзер И. Л., Смирнов В. Н., Чазов Е. И. (1976) Биорган. химия, 2, 1252-1257.
  7. Royer G. R., Liberatore F. A., Green G. M. (1975) Biochem. and Biophys. Res. Commun., 64, 478-484.
  8. Торчилин В. П., Рейзер И. Л., Тищенко Е. Г., Ильина Е. В., Смирнов В. Н., Чазов Е. И. (1976) Биорган. химия, 2, 1687-1694.
  9. Torchilin V. P., Tischenko E. G., Smirnov V. N. (1977) J. Solid-Phase Biochem., 2, 19-29.
  10. Martinek K., Klibanov A. M., Goldmacher V. S., Berezin I. V. (1977) Biochim. et biophys. acta, 485, 1-12.
  11. Gabel D., Steinberg I. Z., Katchalsky E. (1971) Biochemistry, 10, 4661-4669.
  12. Bender M. L., Begue-Canton M. R., Bleakeley R. L., Brubacher L. J., Feder J., Gunter C. R., Kezdy F. J., Killheffer J. V., Marshall T. H., Miller C. G., Roeske R. W., Stoops J. R. (1966) J. Amer. Chem. Soc., 88, 5890-5913.
  13. Fields R. (1971) Biochem. J., 124, 581-590.

Поступила в редакцию  
27.XII.1978

INVESTIGATION OF THE PROTON TRANSFER IN ENZYMATIC HYDROLYSIS  
BY THE METHOD OF KINETIC ISOTOPE EFFECT TEMPERATURE DEPENDENCE.  
III. HYDROLYSIS OF N-ACETYL- AND N-BENZOYL-L-TYROSINE ETHYL  
ESTERS BY  $\alpha$ -CHYMOTRYPSIN IMMOBILIZED ON SOLUBLE DEXTRAN

KROSHTARIYA D. E., TOPOLEV V. V., KRISHTALIK L. I.,  
REYZER I. L., TORCHILIN V. P.

*Institute of Electrochemistry, Academy of Sciences of the USSR,  
Moscow; All-Union Cardiology Research Center, Academy  
of Medical Sciences of the USSR, Moscow*

The activation energies for transfer of H and  $^2\text{H}$  isotopes were shown to be equal, thus supporting the applicability of the quantum-mechanical model (the medium reorganization theory) for the systems with  $\alpha$ -chymotrypsin immobilized on a polysaccharide carrier. It was also shown that the activation energy and the kinetic isotope effect were not affected by such immobilization. It was assumed that the conformation of the  $\alpha$ -chymotrypsin active site was not changed by immobilization.