

УДК 577.155.5

КИНЕТИКА КАТАЛИЗИРУЕМОГО α -ХИМОТРИПСИНОМ ГИДРОЛИЗА В СОСТОЯНИИ РАВНОВЕСИЯ.

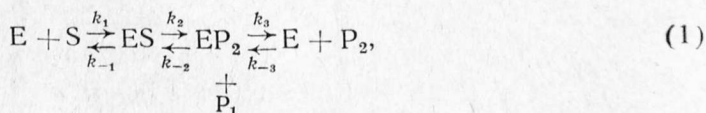
III. КОНСТАНТЫ СКОРОСТИ ИНДИВИДУАЛЬНЫХ СТАДИЙ И ТЕРМОДИНАМИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ ПРИ РАЗЛИЧНЫХ pH

В. К. АНТОНОВ, Л. М. ГИНОДМАН, А. Г. ГУРОВА

Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина Академии наук СССР, Москва

На основании данных о скоростях катализируемого α -химотрипсином обмена между N-ацетил-L-фенилаланилглициномидом, а также метиловым эфиром N-ацетил-L-фенилаланина, и соответствующими продуктами их гидролиза в состоянии термодинамического равновесия, и данных по кинетике гидролиза этих веществ в условиях стационарности определены константы скорости отдельных стадий обратимого процесса гидролиза пептида при pH 5,5, 7,3 и 8,2 и эфира при pH 5,5. Вычислены свободные энергии образования промежуточных комплексов в свободные энергии активации отдельных стадий. Таким образом, дано полное кинетическое и термодинамическое описание процесса химотрипсинового катализа при различных значениях pH.

Исследование кинетики катализируемого ферментом обмена между субстратом и продуктами реакции в состоянии термодинамического равновесия [1] в сочетании с методами стационарной кинетики позволяет определить константы скоростей отдельных стадий ферментативного процесса. В реакциях катализируемого α -химотрипсином гидролиза эфиров и пептидов, протекающего по упорядоченному механизму:



где E — фермент, S — субстрат, ES — комплекс Михаэлиса, EP_2 — ацил-фермент, P_1 и P_2 соответственно спиртовый (аминный) и ацильный продукты реакции, методами стационарной кинетики довольно легко определить величины k_2 и k_3 . Однако, значения k_{-2} и k_{-3} этим путем определить нельзя. Изучение скоростей обмена между S и P_1 и P_2 в состоянии равновесия дает дополнительную информацию, позволяющую определить значение константы скорости k_{-2} . Действительно, для процесса, описываемого схемой (1), отношение скорости включения продукта $P_1(R')$ к скорости включения продукта $P_2(R)$ в субстрат (S) дается уравнением [2]:

$$\frac{R'}{R} = 1 + \frac{k_{-1}k_{-2}}{k_3(k_{-1} + k_2)} [P_1]. \quad (2)$$

Строя зависимость R'/R от $[P_1]$ и полагая, что $k_{-1} \gg k_2$ [3], можно по наклону полученной прямой определить отношение k_{-2}/k_3 и, зная k_3 , вычислить k_{-2} .

Наконец, константу скорости второго порядка k_{-3} можно найти, пользуясь уравнением Холдена [4]:

$$K_p = \frac{k_{-3}k_{-2}K_S}{k_3k_2}, \quad (3)$$

где $K_S = k_{-1}/k_1$, а K_p — константа равновесия системы. Если известна константа ингибирования фермента ацильным продуктом реакции K_i , то из равенства $k_{-3} = k_{-3}^*/K_i$ можно рассчитать константу первого порядка k_{-3}^* , характеризующую скорость превращения комплекса фермент-продукт ($E \cdot P_2$) в ацил-фермент ($E-P_2$).

Таким образом, зная все константы индивидуальных стадий, можно рассчитать концентрации, свободные энергии образования промежуточных комплексов и свободные энергии активации в многостадийной реакции ферментативного гидролиза.

В предыдущих сообщениях [2, 5] были приведены данные о значениях R и R' для обратимых реакций катализируемого α -химотрипсином гидролиза N-ацетил-L-фенилаланилглицинамида при pH 5,5; 7,3 и 8,2 и гидролиза метилового эфира N-ацетил-L-фенилаланина при pH 5,5. Дополнив эти данные результатами определения кинетических констант в условиях стационарности, мы получили возможность дать полное описание процесса химотрипсинового катализа при различных значениях pH.

МЕТОДИКА

Характеристики использованного α -химотрипсина, N-ацетил-L-фенилаланилглицинамида и метилового эфира N-ацетил-L-фенилаланина приведены ранее [2, 5].

Гидролиз N-ацетил-L-фенилаланилглицинамида при pH 5,5 изучали, измеряя нарастание во времени числа свободных аминогрупп при помощи 2,4,6-тринитробензолсульфокислоты [6]. При pH 7,3 и 8,2 гидролиз этого субстрата регистрировали на pH-стате TTT-60 («Radiometer», Дания). При расчете вводили поправку на степень ионизации выделяющегося основания [7]. Гидролиз метилового эфира N-ацетил-L-фенилаланина при pH 5,5, 7,3 и 8,2 регистрировали на pH-стате.

Величины K_m и $k_{кат}$ рассчитывали по Лайнуиверу — Берку с использованием метода наименьших квадратов.

Условия гидролиза, концентрации фермента и субстрата приведены в табл. 1.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные значения констант катализируемого α -химотрипсином гидролиза N-ацетил-L-фенилаланилглицинамида и метилового эфира N-ацетил-L-фенилаланина приведены в табл. 1, а в табл. 2 даны полученные ранее [2, 5] значения скоростей включения глицинамида (R') и N-ацетил-L-фенилаланина (R) в N-ацетил-L-фенилаланилглицинамид при pH 5,5, 7,3 и 8,2, а также скоростей включения метанола (R') и N-ацетил-L-фенилаланина (R) в метиловый эфир N-ацетил-L-фенилаланина при pH 5,5. Эти данные при условии, что известна величина k_3 , позволяют во всех случаях, за исключением гидролиза пептидного субстрата при pH 5,5 (при этом $R'/R \approx 1$ [5]), рассчитать величины k_{-2} по графикам зависимости R'/R от $[P_i]$ (уравнение (2)). Значения k_3 для эфирного и пептидного субстратов вычисляются из данных по гидролизу AcPheOMe при соответствующих значениях pH, так как для субстратов, имеющих одинаковые ацильные остатки, $k_{кат}$ (эфира) = k_3 (эфира) = k_3 (пептида).

Чтобы определить величину k_{-2} в случае гидролиза пептидного субстрата при pH 5,5 сначала рассчитывали величину k_{-3} для эфира при

Таблица 1

Константы катализируемого α -химотрипсином гидролиза
 N-ацетил-L-фенилаланилглицинамида и метилового эфира N-ацетил-L-фенилаланина
 Условия: 20°; амид (рН 5,5), 0,1 М ацетатный буфер; в остальных случаях 0,1 М KCl

рН	AcPheGlyNH ₂				AcPheOMe			
	[E] ₀ ·10 ⁶ , М	[S] ₀ ·10 ³ , М	K _m ·10 ³ , М	κ _{кат} · мин ⁻¹	[E] ₀ ·10 ⁷ , М	[S] ₀ ·10 ³ , М	K _m ·10 ³ , М	κ _{кат} · мин ⁻¹
5,5	8,0	4—100	60±10	0,3±0,02	1,0	0,95—16,5	12±1,5	190±8
7,3	0,5	4—40	40±5	7,2±0,5	5,0	0,5—10,0	15±1,4	3300±200
8,2	0,45	4—35	50±5	10,0±0,4	0,2	0,625—13,0	10±1,2	5000±300

Таблица 2

Скорость обмена субстрата и продуктов при химотрипсиновом гидролизе [2, 5]

Субстрат	рН	[E] ₀ ·10 ⁶ , М	[S] ₀ ·10 ³ , М	[P ₁] ₀ , М	[P ₂] ₀ , М	R _{экс} ·10 ⁵ , М·мин ⁻¹	R _{выч} ·10 ⁵ , М·мин ⁻¹	R' _{экс} ·10 ⁵ , М·мин ⁻¹	R' _{выч} ·10 ⁵ , М·мин ⁻¹
AcPheGlyNH ₂	8,2	1,6	0,85	0,125	0,04	0,30	0,28	0,7*	0,63
			1,7	0,250		0,45	0,36	1,10	1,25
			3,4	0,500		0,40	0,40	2,40	2,42
			5,0	0,750		0,40	0,40	3,00	3,45
			6,8	1,000		0,35	0,41	4,40	4,56
	7,3	8,0	2,0	0,125	0,04	1,00	1,55	2,10	2,70
			4,0	0,250		1,70	2,05	3,80	5,20
			8,0	0,500		2,20	2,35	8,20	9,70
			10,0	0,625		2,30	2,38	10,0	11,50
			12,0	0,750		2,40	2,38	13,0	13,50
			16,0	1,000		2,47	2,37	17,5	16,50
	5,5	56,0	1,6	0,080	0,04	0,36	0,42	0,40	0,42
			2,5	0,125		0,65	0,64	0,65	0,64
			5,0	0,250		1,40	1,23	1,30	1,23
			10,0	0,500		2,60	2,31	2,40	2,31
			20,0	1,000		4,20	4,06	4,00	4,06
AcPheOMe	5,5	0,01	0,0425	0,250	0,10	0,06	0,05	0,06	0,07
			0,085	0,500		0,09	0,08	0,14	0,14
			0,170	1,000		0,12	0,11	0,23	0,28
			0,255	1,500		0,11	0,13	0,40	0,40
			0,340	2,000		0,13	0,13	0,51	0,50
			0,425	2,500		0,14	0,14	0,65	0,59

* В работе Лякишевой и соавт. [2] приведены завышенные значения скоростей R' для AcPheGlyNH₂ при рН 8,2.

этом значении рН, используя уравнение Холдена (3) и, затем, учитывая, что k_{-3} (эфира) = k_{-3} (пептида), рассчитывали по тому же уравнению величину k_{-2} пептидного субстрата, вводя в это уравнение константы, характеризующие обратимый гидролиз последнего. Значения констант равновесия (K_p), входящие в это уравнение, были определены ранее [2, 5], а величины k_2 и K_s для пептида получены из данных стационарной кинетики, так как известно [8], что для пептидов $K_m = K_s$, а $k_{кат.} = k_2$. Что касается величины k_2 и k_s для эфира, то мы использовали данные Хааса и сотр. [9], измерявших методом остановленного потока скорость гидролиза этилового эфира N-ацетил-L-фенилаланина при рН 5,0. Эти данные были пересчитаны для рН 5,5 по методу Фроста и Парсона [10] и скорректированы на различия в скоростях гидролиза этилового и метилового эфиров.

Таким образом, были определены все индивидуальные константы, характеризующие процесс химотрипсинового гидролиза пептидного субстрата при трех значениях рН и гидролиза эфира при рН 5,5 (табл. 3).

Кинетические и термодинамические константы химотрипсинового гидролиза

Субстрат	pH	$K_S \cdot 10^3$, М	k_2 , мин ⁻¹	k_3 , мин ⁻¹	k_{-2} , М ⁻¹ ·мин ⁻¹	k_{-3}^* , мин ⁻¹	$K_I^a \cdot 10^3$, М	K_p , М ⁻¹
AcPheGlyNH ₂	5,5	60	0,3	190	2,14	15,54	70	0,5
	7,3	40	7,2	3300	20 000	0,84	70	0,4
	8,2	50	10,0	5000	50 000	0,238	70	0,17
AcPheOMe	5,5	12 [9]	2550 [9]	190	310	15,54	70	$1,7 \cdot 10^{-3}$

^a Константа ингибирования N-ацетил-L-фенилаланина

Полученные данные представляют определенный интерес для анализа ряда вопросов химотрипсинового катализа. Прежде всего, используя приведенные в табл. 3 величины констант, по формулам, описывающим зависимости скоростей обмена продуктов реакции и субстрата в состоянии равновесия от концентрации реагирующих компонентов [2],

$$R = \frac{[E]_0}{\left(\frac{1}{k_{-1}} + \frac{k_2 + k_{-2}[P_1]}{k_2 k_3}\right) \left(1 + \frac{K_1}{[S]} + \frac{K_2}{[P_1]}\right)}, \quad (4)$$

$$R' = \frac{[E]_0}{\left(\frac{1}{k_{-1}} + \frac{1}{k_2}\right) \left(1 + \frac{K_1}{[S]} + \frac{K_2}{[P_1]}\right)}, \quad (5)$$

где $K_1 = (k_{-1}/k_1) = K_S$, $K_2 = (k_2/k_{-2})$, $[E]_0$ — полная концентрация фермента, были вычислены теоретические значения скоростей обмена пептидного и эфирного субстратов с продуктами гидролиза. Как видно из табл. 2, экспериментальные и вычисленные значения удовлетворительно совпадают. Это обстоятельство является важным аргументом, подтверждающим ацил-ферментный механизм реакций гидролиза — синтеза пептидов и эфиров при всех исследованных значениях pH.

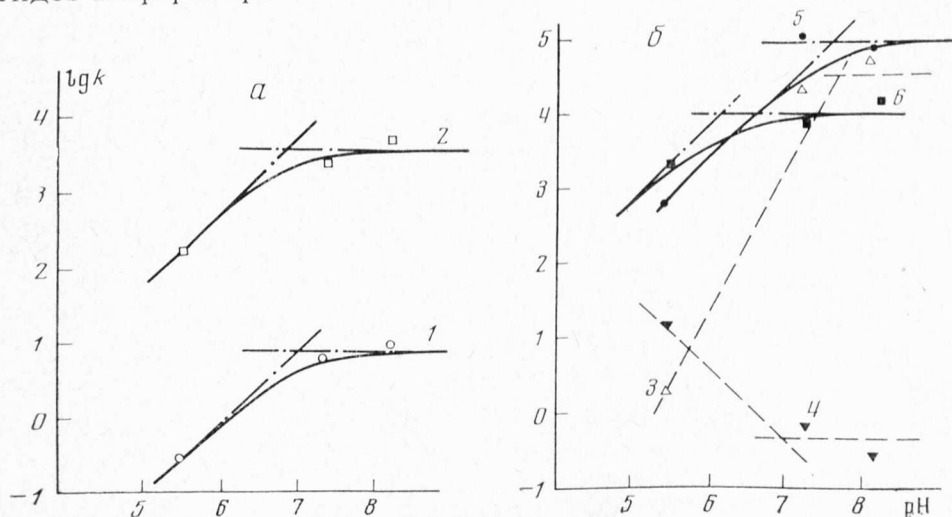


Рис. 1. Зависимость каталитических констант отдельных стадий от pH. Сплошные линии — теоретические зависимости. а: k_2 (1), k_3 (2); б: k_{-2} (3), k_{-3}^* (4) — константы, рассчитанные по выражениям (2) и (3) соответственно; k_{-2} (5), k_{-3}^* (6) — константы, рассчитанные для неонизированных форм продуктов

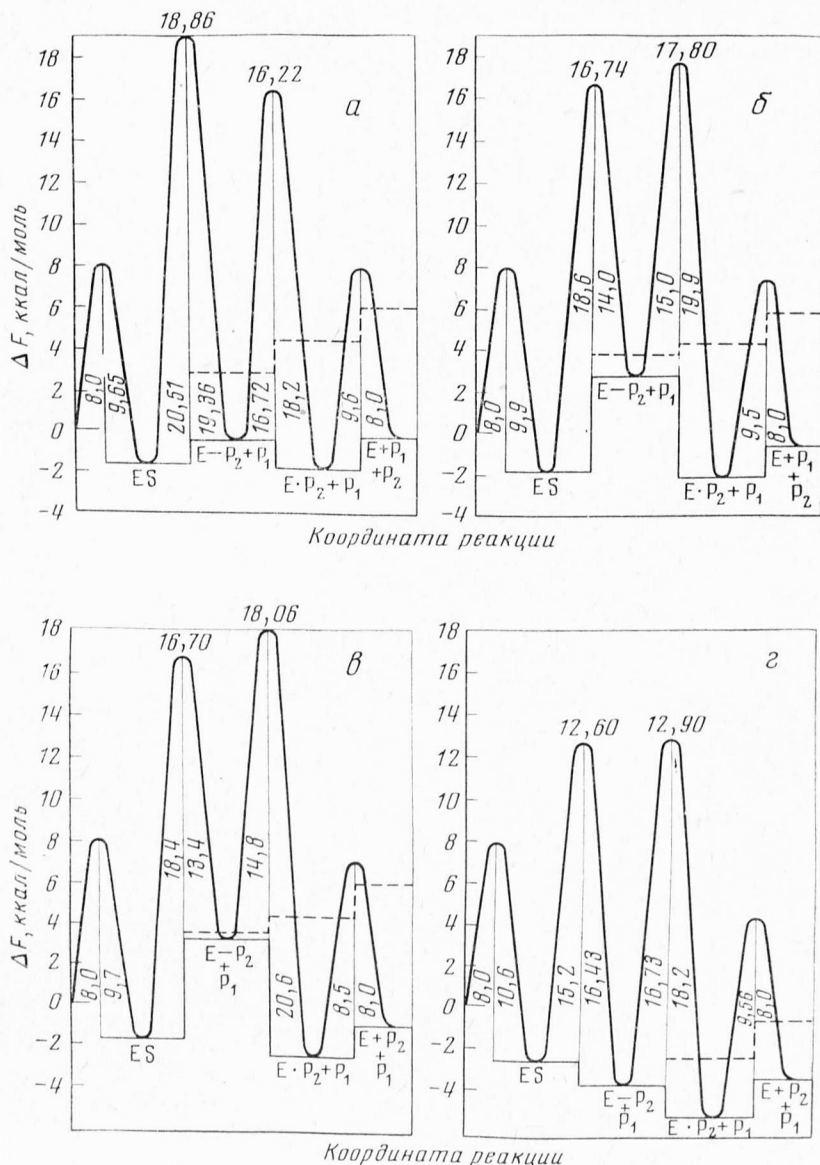


Рис. 2. Энергетические профили системы катализируемого α -химотрипсинном гидролиза AcPheGlyNH₂ при pH 5,5 (а), 7,3 (б) и 8,2 (в) и гидролиза AcPheOMe при pH 5,5 (г) в стандартных условиях. Пунктир — уровни энергий системы в расчете на ненонизированные формы продуктов

Несмотря на ограниченное число значений pH, для которых получены индивидуальные константы, можно попытаться проанализировать зависимость последних от pH. На рис. 1 приведены зависимости логарифмов констант скоростей отдельных стадий гидролиза пептидного субстрата от pH. Как видно, зависимости величин k_2 и k_3 соответствуют теоретическим, если исходить из наличия в активном центре фермента каталитически активной группы с $pK_a \sim 7$, функционирующей в непротонированной форме. Что же касается зависимостей от pH констант k_{-2} и k_{-3} , то в этих случаях наблюдаются аномалии, а именно, восходящая ветвь для k_{-2} имеет наклон ~ 2 , а величина k_{-3} вместо ожидае-

мого увеличения при переходе от рН 5,5 к 8,2 уменьшается. Легко видеть, что константы k_{-2} и k_{-3} относятся к стадиям процесса, в которых участвуют продукты гидролиза, находящиеся как в ионизированной, так и в неионизированной формах. Если пересчитать значения констант k_{-2} и k_{-3} на неионизированные формы продуктов реакции, то в этом случае зависимости логарифмов констант скорости от рН согласуются с теоретическими. Таким образом, имеются веские основания считать, что истинными формами продуктов, которые вступают в реакцию, являются неионизированные формы.

Имеющиеся теперь в нашем распоряжении данные позволяют построить энергетические профили реакций для рассматриваемых систем (рис. 2). Графики изменения свободной энергии системы по координате реакции были построены для стандартных условий, в которых концентрации всех компонентов (за исключением воды) равны 1 М. За нулевой уровень принята энергия субстрата. На графиках также нанесено изменение свободной энергии системы в расчете на неионизированные формы продуктов. Величины свободной энергии активации на стадиях образования комплекса Михаэлиса и комплекса фермент—продукт вычислены с использованием константы скорости образования комплексов, равной $1 \cdot 10^7 \text{ сек}^{-1} \cdot \text{М}^{-1}$ [11].

Рассмотрение полученных зависимостей позволяет, во-первых, заключить, что уровни свободной энергии системы для состояния ацил-фермент+глицинамид (в расчете на неионизированную форму последнего) практически одинаковы для всех значений рН и составляют 3—4 ккал/моль. Таким образом, уровни энергии на этой стадии, полученные на основании экспериментальных значений констант (т. е. в расчете на суммарные концентрации ионизированных и неионизированных форм глицинамида), зависят от рН, в основном, в силу того, что отщепляемый продукт при разных рН содержит разное соотношение ионизированной и неионизированной форм. Как видно, для стандартных условий уже при рН 5,5 образование ацил-фермента из продуктов реакции не сопровождается заметным изменением свободной энергии.

Во-вторых, сравнение величин свободной энергии активации на стадии ацилирования фермента в случае эфира и пептида показывает, что различие здесь составляет ~ 5 ккал/моль. Эта величина близка к разности свободных энергий гидролиза эфирной и пептидной связи при рН 5,5 ($\Delta F \sim 4,5$ ккал) [12], что подтверждает высказанное нами ранее утверждение [13, 14] о том, что причины различия в скоростях гидролиза химотрипсина пептидных и эфирных субстратов обусловлены практически полностью различиями в свободных энергиях гидролиза [15].

Наконец, при гидролизе пептида при рН 7,3 и 8,2 кажущейся скоростью лимитирующей стадией является стадия деацилирования. Это обусловлено тем, что в качестве стандартных условий при построении диаграмм принята 1 М концентрация глицинамида. В реальных условиях при низких концентрациях глицинамида лимитирующей стадией является ацилирование фермента.

ЛИТЕРАТУРА

1. Boyer P. D., Silverstein E. (1963) Acta Chem. Scand., **17**, 195—212.
2. Лякишева А. Г., Гиодман Л. М., Антонов В. К. (1973) Мол. биол., **7**, 810—816.
3. Zerner B., Bender M. L. (1964) J. Am. Chem. Soc., **86**, 3669—3674.
4. Haldane J. B. S. (1930) Enzymes, London, Longmans, Green & Co.
5. Гурова А. Г., Гиодман Л. М., Антонов В. К. (1977) Мол. биол., **11**, 1155—1159.
6. Козлов Л. В., Завада Л. Л. (1975) Мол. биол., **9**, 735—741.
7. Bizozero S. A., Baumann W. Z., Dutler H. (1970) FEBS Letters, **8**, N 5, 257—260.
8. Zerner B., Bender M. L. (1964) J. Am. Chem. Soc., **86**, 3674—3679.
9. McConn J., Ku E., Himoe A., Brandt K. G., Hess G. P. (1971) J. Biol. Chem., **246**, 2918—2925.
10. Frost A. A., Pearson P. G. (1961) Kinetics and Mechanism, p. 49, N. Y.

11. Hess G. P., Ku J., McConn E., McConkey G. (1970) *Phil. Trans. Roy. Soc. London, Sec. B*, **257**, 89—93.
12. Козлов Л. В., Гинодман Л. М., Орехович В. Н. Валуева Т. А. (1966) *Биохимия*, **31**, 315—321.
13. Kozlov L. V., Antonov V. K., Djachenko E. D. (1971) *Abstracts 7th Meeting FEBS, Varna, N 181*, p. 110.
14. Козлов Л. В., Дьяченко Е. Д., Антонов В. К. (1977) *Биооргани. химия*, **3**, 105—110.
15. Fastres J., Fersht A. R. (1973) *Biochemistry*, **12**, 2025—2034.

Поступила в редакцию
2.XI.1976

EQUILIBRIUM KINETICS OF THE α -CHYMOTRYPTIC HYDROLYSIS

III. RATE CONSTANTS AND THERMODYNAMIC PARAMETERS AT VARIOUS pH

V. K. ANTONOV, L. M. GINODMAN and A. G. GUROVA

*M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, USSR Academy of Sciences,
Moscow*

The rate constants of the individual steps of the reversible chymotryptic hydrolysis of N-acetyl-L-phenylalanylglycinamide and methyl N-acetyl-L-phenylalaninate have been calculated on the basis of data on the velocity of the exchange between these substrates and products of their hydrolysis at equilibrium and also on the basis of steady-state kinetics of their cleavage. This was done for peptide substrate at pH 5.5, 7.3 and 8.2 and for ester substrate at pH 5.5. The free energy of the formation of intermediate complexes and free energy of activation were calculated. Thus a complete kinetic and thermodynamic description of chymotryptic catalysis of various pH is performed.
