EESTI NSV TEADUSTE AKADEEMIA TOIMETISED. KEEMIA
ИЗВЕСТИЯ АКАДЕМИИ НАУК ЭСТОНСКОЙ ССР. ХИМИЯ
PROCEEDINGS OF THE ACADEMY OF SCIENCES OF THE ESTONIAN SSR. CHEMISTRY

1987, 36, 2

https://doi.org/10.3176/chem.1987.2.12

УДК 577.152

Т. КЕСВАТЕРА, Марика КОСК, А. ААВИКСААР

ТИОХОЛИНОВЫЕ ЭФИРЫ КАК СУБСТРАТЫ ХИМОТРИПСИНА

T. KESVATERA, Marika KOSK, A. AAVIKSAAR. TIOKOLIINI ESTRID KÜMOTRÜPSIINI SUBSTRAATIDENA

T. KESVATERA, Marika KOSK, A. AAVIKSAAR. THIOCHOLINE ESTERS AS SUBSTRATES FOR CHYMOTRYPSIN

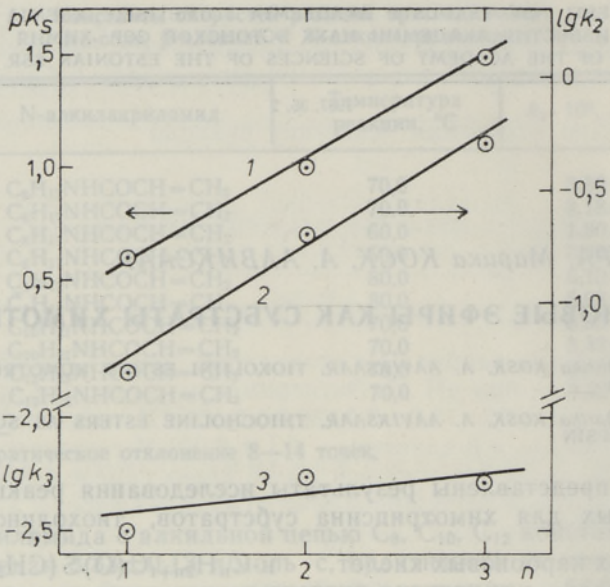
В работе представлены результаты исследования реакционной способности новых для химотрипсина субстратов, тиохолиновых эфиров алифатических карбоновых кислот $н\text{-}C_nH_{2n+1}C(O)S(CH_2)_2\overset{+}{N}(CH_3)_3$ с $n=1$—3. Показано, что при химотрипсиновом гидролизе этих соединений время достижения стационарного состояния в трехстадийной реакции

$$E+S \overset{K_S}{\rightleftharpoons} ES \xrightarrow{k_2} EA \xrightarrow{k_3} E+P_2 \qquad (1)$$
$$\searrow P_1$$

при 25 °C и значениях pH, близких к оптимальным, охватывает минуты, что позволяет регистрировать кинетику предстационарной фазы процесса на обычном спектрофотометре, используя метод Эллмана [1] для определения выделяющегося тиохолина, и получать значения K_S, k_2 и k_3 из прямых измерений, т. е. без добавления в реакционную смесь каких-либо селективных эффекторов или нуклеофильных агентов, как в случае определения этих констант из стационарной кинетики (для обзора см. [2]).

Зависимости pK_S, $\lg k_2$ и $\lg k_3$ от n показаны на рисунке. Видно, что увеличение длины углеводородной цепи в ацильной части соединений приводит к одинаковому увеличению pK_S и $\lg k_2$. Этим тиохолиновые эфиры как субстраты химотрипсина принципиально отличаются от аналогичных n-нитрофениловых эфиров карбоновых кислот, $н\text{-}C_nH_{2n+1}C(O)OC_6H_4NO_2$-п, для которых показано [3–5], что при изменении n от 1 до 3 константа k_2/K_S практически не меняется, а начиная с $n=3$ (до $n=6$) между $\lg(k_2/K_S)$ и n наблюдается линейная зависимость с наклоном около 0,4, который, согласно результатам анализа, проведенного А. А. Клесовым и И. В. Березиным [5], вызван изменением K_S при постоянстве k_2 (собственно значений k_2 и K_S для реакции химотрипсина с серией п-нитрофенилкарбоксилатов определить не удалось).

В случае же тиохолиновых эфиров $н\text{-}C_nH_{2n+1}C(O)S(CH_2)_2\overset{+}{N}(CH_3)_3$ наклон прямой в координатах $\lg(k_2/K_S)$ от n при увеличении n от 1 до 3 составляет 0,93 (значения k_2/K_S для этой корреляции были получены из отдельных опытов как бимолекулярные константы скорости гидролиза при $[S] \ll K_m^{каж}$), а для зависимостей $\lg k_2$ и pK_S от n — 0,50 и 0,44 соответственно. Так как для специфических субстратов химотрипсина, метилов эфиров N-ацетил-L-аминокислот, $н\text{-}C_nH_{2n+1}\text{—}\underset{\underset{NH\text{—}C(O)CH_3}{|}}{\overset{\overset{H}{|}}{C}}\text{—}C(O)OCH_3$,



Зависимость кинетических констант реакции α-химотрипсина с субстратами $[н\text{-}C_nH_{2n+1}C(O)S(CH_2)_2\overset{+}{N}(CH_3)_3]Br^-$ (или I^-) от n, *1* — pK_S, *2* — $\lg k_2$, *3* — $\lg k_3$. Условия опытов: 25 °C, pH 7,5, фосфатный буфер, ионная сила 0,15. Анализ кинетических данных по предстационарной кинетике проведен, как описано в [2].

прямые в координатах $\lg k_2$ и pK_S от n ($n=1$—4) по данным [5] имеют наклоны 0,50 и 0,52, то можно предположить, что взаимодействие ацильной части тиохолиновых эфиров алифатических карбоновых кислот с химотрипсином хорошо моделирует взаимодействие боковой цепи аминокислоты в его специфических субстратах с активным центром фермента, чего нельзя сказать о серии п-нитрофенилкарбоксилатов. Интересно отметить, что линейная зависимость $\lg(k_2/K_S)$ от n с наклоном 0,9 наблюдается также в реакции химотрипсина с имидазольными карбоксилатами, $н\text{-}C_nH_{2n+1}C(O)\text{-}$, с $n=1$, 3, 5 [6], для которых k_2 и K_S отдельно не получены.

Слабая зависимость $\lg k_3$ от n (см. рисунок) согласуется с литературными данными по деацилированию «неспецифических» ацилхимотрипсинов с короткой ацильной частью [4, 5, 7, 8].

Возможность прямого определения констант K_S, k_2 и k_3 из предстационарной кинетики в минутной шкале времени делает тиохолиновые эфиры карбоновых кислот удобными субстратами для исследования влияния реакционной среды на отдельные стадии химотрипсин-катализируемых реакций. Кроме того, бутирилтиохолин с соотношением k_2/k_3 около 80 может быть использован для титрования активных центров химотрипсина: при концентрациях субстрата от 0,005 до 0,01 М ($[S]_0/K_m^{каж}=$ 15—30) величина начального «выброса» тиохолина равна концентрации активных центров фермента. Учитывая значение $\varepsilon_{412}=$ $=13\,600$ для комплекса тиохолина с реагентом Эллмана, наиболее удобным диапазоном концентраций фермента при его титровании можно считать 10^{-6}—10^{-5} М, где величина выброса имеет значения от 0,014 до 0,14 единиц оптической плотности.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres, V., Featherstone, R. M.* A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. — Biochem. Pharmacol., 1961, **7**, N 1, 88—95.
2. *Березин И. В., Мартинек К.* Основы физической химии ферментативного катализа. М., 1977, 171—267.
3. *Milstien, J. B., Fife, T. H.* Steric effects in the acylation of α-chymotrypsin. — Biochemistry, 1969, **8**, N 2, 623—627.
4. *Marshall, T. H., Akgün, A.* The specificity of porcine elastase and α-chymotrypsin. Effect of fatty acid chain length in a homologous series of nitrophenyl esters. — J. Biol. Chem., 1971, **246**, N 19, 6019—6023.
5. *Клесов А. А., Березин И. В.* Ферментативный катализ, I. М., 1980, 111—127.
6. *Kogan, R. L., Fee, J. A., Fife, T. H.* The mechanism of specific acylation of the active site of α-chymotrypsin by N-acyl-imidazoles. — J. Amer. Chem. Soc., 1982, **104**, N 13, 3569—3576.
7. *Fife, T. H., Milstien, J. B.* Steric effects in the deacylation of acyl-chymotrypsins. — Biochemistry, 1967, **6**, N 9, 2901—2907.
8. *Мартинек К., Доровска В. Н., Варфоломеев С. Д.* Стерические, индукционные и специфические эффекты при деацилировании ацил-α-химотрипсинов — производных алифатических карбоновых кислот. — Биохимия, 1972, **37**, вып. 6, 1245—1250.

Институт химической и биологической физики
Академии наук Эстонской ССР

Институт химии
Академии наук Эстонской ССР

Поступила в редакцию
26/XI 1986