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.1987.2.09

УДК 577.152.344.02

М. ПАБЕРИТ

СВЯЗЫВАНИЕ ИНДОЛА ЩЕЛОЧНОЙ ФОРМОЙ *n*-N, N, N-ТРИМЕТИЛАММОНИЙ-*транс*-ЦИННАМОИЛ-α-ХИМОТРИПСИНА

(Представил Э. Липпмаа)

В щелочной области pH α-химотрипсин переходит в неактивную конформацию. Равновесие между активной и неактивной конформациями зависит от протонизованности концевой аминогруппы Ile-16 (см. обзоры в [1, 2]), некоторую роль могут играть и другие ионогенные группы [3,4]; для кажущегося pK_a приводится значение 8,8 [1, 5]. Модифицирование функциональных групп активного центра повышает значение pK_a перехода: у метилсульфонил-α-химотрипсина оно составляет 9,67 [5], а в случае фенилметилсульфонил-α-химотрипсина, где влияние модифицирования Ser-195 усиливается введением фенильной группы в центр гидрофобного связывания (гидрофобную щель), основная доля фермента сохраняет активную конформацию еще при pH 11 [5].

Недавно обнаружено [6, 7], что деацилирование ацил-α-химотрипсинов (в них также модифицирован Ser-195) в щелочной области pH зависит от протонизованности какой-то группы. Так, анализ солевых зависимостей константы скорости деацилирования *n*-N, N, N-триметиламмоний-*транс*-циннамоил-α-химотрипсина (ТМАЦ-ХТ) при разных значениях pH выявил переход ацилфермента в другую конформационную форму; экстраполированное к нулевой концентрации соли значение pK_a^0 перехода составляло 11,31±0,09 [6]. Тем же методом было установлено, что циннамоил-α-химотрипсин, в котором, в отличие от ТМАЦ-ХТ, ацильная группа связывается в гидрофобной щели, переходит в другую форму с pK_a^0 12,18±0,12 [7]. При рассмотрении этих значений pK_a возникает предположение, что переход ацил-α-химотрипсинов в другую форму может соответствовать конформационному изменению α-химотрипсина при pH 8,8: 1) значение pK_a^0 ТМАЦ-ХТ, по-видимому, сравнимо с pK_a фенилметилсульфонил-α-химотрипсина (к сожалению, авторы [5] не приводят точного значения последнего); 2) как у сульфонилпроизводных. так и у ацил-α-химотрипсинов введение лиганда в гидрофобную щель приводит к повышению pK_a перехода.

Характерным для конформационного изменения α-химотрипсина при pH 8,8 является ухудшение связывания гидрофобных лигандов. С целью дальнейшего выявления сходства между конформационным изменением α-химотрипсина при pH 8,8 и переходом ацил-α-химотрипсинов в другую конформационную форму при pH>11 в настоящей работе изучалось, как повышение pH влияет на связывание индола с ТМАЦ-ХТ. Опыты проводили в концентрированных солевых растворах, чтобы с помощью эффекта солезависимого промотирования [8] регистрировать взаимодействие индола с ТМАЦ-ХТ.

Экспериментальная часть

Аппаратура, реактивы, методика эксперимента и обработка кинетических кривых описаны в [6]. Запасные растворы индола приготовляли в растворах KCl, содержащих буферные компоненты или KOH [6]; предварительно эти растворы пропускали через стеклянный фильтр и доводили их pH до нужного значения. В мерной колбе на 50 мл взвешивали нужное количество индола, вводили около 30 мл солевого раствора, при постоянном перемешивании растворяли индол и заполняли колбу солевым раствором до метки. Промежуточные концентрации индола получали смешиванием солевого раствора и запасного раствора индола.

Результаты экспериментов и их обсуждение

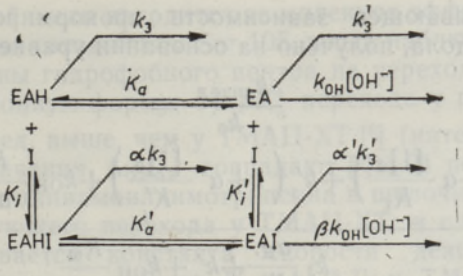
Полученные данные приведены в таблице. Если при pH 9,1 добавление индола вызывает почти трехкратное (при 3 M KCl) увеличение константы скорости деацилирования ТМАЦ-ХТ вследствие эффекта солезависимого промотирования [8], то при более высоких значениях pH увеличение константы скорости в присутствии индола не превышает 30% (таблица).

Влияние индола на константу скорости деацилирования ТМАЦ-ХТ при 25,0 °C, 2,98 M KCl и различных значениях pH*

$c_{индол} \cdot 10^4$, M	$k \cdot 10^4$, c^{-1}	$c_{индол} \cdot 10^4$, M	$k \cdot 10^4$, c^{-1}
pH 11,49			
0	5,62±0,03	15,5	6,63±0,03
2,74	5,78±0,03	18,2	6,69±0,03
6,37	6,43±0,17	21,0	6,76±0,07
9,13	6,53±0,09	24,6	7,19±0,15
pH 12,18			
0	13,6±0,2	13,1	14,0±0,3
2,39	14,1±0,2	16,7	15,2±0,2
5,97	14,5±0,2	20,3	15,0±0,1
9,55	14,9±0,4	23,9	14,7±0,4
pH 12,92			
0	36,5±1,0	16,3	41,6±0,6
2,87	37,3±0,8	19,2	41,9±1,5
6,72	39,7±0,9	23,0	44,9±0,3
9,59	39,6±1,3	25,9	38,3±0,7
12,5	38,7±0,8		
pH 13,33			
0	63,1±1,6	12,6	73,0±1,1
1,94	64,9±1,1	16,5	73,7±1,7
6,80	72,0±0,9	19,4	77,8±1,9
9,71	73,6±0,8	23,3	78,1±0,7

* Приведены взвешенные средние 2—4 измерений вместе с среднеквадратичной ошибкой; pH поддерживали 0,05 M KH_2PO_4, оттитрованным щелочью (pH 11,49), и избытком щелочи (pH≥12,18).

На основании [6, 8] для описания данных таблицы можно предложить кинетическую схему



(1)

где EAH и EA — протонизованная и депротонизованная формы ацилфермента, EAHI и EAI — их комплексы с индолом, I, K_i и K_i' — константы диссоциации этих комплексов, k_3 и k_3' — константы скорости деацилирования форм EAH и EA, k_{OH} — константа скорости щелочного гидролиза EA, а множители α, α' и β показывают, насколько при введении индола в гидрофобную щель меняются константы скорости реакций. Схема (1) дает для наблюдаемой константы скорости деацилирования выражение

$$k=\frac{k_3\frac{a_{H^+}}{K_a}\left(1+\alpha\frac{[I]_0}{K_i}\right)+k_3'\left(1+\alpha'\frac{[I]_0}{K_i'}\right)+k_{OH}\frac{K_w}{a_{H^+}}\left(1+\beta\frac{[I]_0}{K_i'}\right)}{1+\frac{a_{H^+}}{K_a}\left(1+\frac{[I]_0}{K_i}\right)+\frac{[I]_0}{K_i'}}, \quad (2)$$

где K_w — ионное произведение воды. Значения большинства параметров уравнения (2) в присутствии KCl (все параметры являются функциями концентрации соли [6–9]) можно рассчитать на основании работ [6, 8, 9], неизвестными являются только α', β и K_i' (константу K_a' в схеме (1) можно вычислить, зная значение K_i', так как $K_i'K_a'=K_iK_a$ [10]).

Форма EAI в схеме (1) выписана как гипотетическая, она может и не образоваться (тогда $K_i'\to\infty$ и уравнение (2) значительно упрощается, в частности, исчезают все члены с неизвестными параметрами). В таком случае при добавлении индола ацилфермент должен «перекачиваться» из формы EA в комплекс EAHI (подобное «перекачивание» фермента из депротонизованной формы, не связывающей лиганды, в комплекс протонизованной формы с лигандом при наличии высоких концентраций субстрата или конкурентного ингибитора исследовалось на примере δ-химотрипсина [11, 12]). Кинетически это выражалось бы в замедлении реакции по мере роста концентрации индола при высоких значениях pH, так как форма EAHI деацилируется медленнее, чем EA. На основании [6, 8] можно по уравнению (2) вычислить, например, что добавление индола в концентрации 2,5 мМ должно понизить при pH 12,18 константу скорости в 2,7 раза. Из таблицы видно, однако, что никакого замедления индол не вызывает. Отсутствие «перекачивания» ацилфермента в комплекс EAHI показывает, что форма EA тоже связывает индол, образуя комплекс EAI. Данные таблицы позволяют определить значения K_i', α' и β при 2,98 М KCl.

Из таблицы видно, что слабая зависимость константы скорости деацилирования от концентрации индола сочетается с ее сильной зависимостью от pH. Чтобы уменьшить влияние ошибок, происходящих от неточности измерения pH, данные таблицы были пронормированы: константы $k_{индол}$, измеренные в присутствии индола, были поделены на константу в отсутствие индола k_0 при том же значении pH. Кинетическое

уравнение, описывающее зависимость пронормированных данных от концентрации индола, получено на основании уравнения (2):

$$\frac{k_{\text{индол}}}{k_0}=$$

$$=\frac{k_3\frac{a_{\text{H}\cdot}}{K_a}\left(1+\alpha\frac{[\text{I}]_0}{K_i}\right)+k'_3\left(1+\alpha'\frac{[\text{I}]_0}{K'_i}\right)+k_{\text{OH}}\frac{K_w}{a_{\text{H}\cdot}}\left(1+\beta\frac{[\text{I}]_0}{K'_i}\right)}{k_3\frac{a_{\text{H}\cdot}}{K_a}+k'_3+k_{\text{OH}}\frac{K_w}{a_{\text{H}\cdot}}}\times$$

$$\times\frac{1+\frac{a_{\text{H}\cdot}}{K_a}}{1+\frac{a_{\text{H}\cdot}}{K_a}\left(1+\frac{[\text{I}]_0}{K_i}\right)+\frac{[\text{I}]_0}{K'_i}}. \qquad (3)$$

Используя солевые зависимости, установленные в [6, 8, 9]*, для параметров в присутствии 2,98 М KCl были рассчитаны или найдены интерполяцией и подставлены в уравнение (3) следующие значения: $k_3=1{,}05\cdot10^{-4}\cdot\text{с}^{-1}$; $pK_a=11{,}80$; $\alpha=2{,}94$; $K_i=1{,}86\cdot10^{-4}$ М; $k'_3=1{,}57\cdot10^{-3}\cdot\text{с}^{-1}$; $k_{\text{OH}}=2{,}78\cdot10^{-2}\ \text{М}^{-1}\cdot\text{с}^{-1}$. Обработка пронормированных данных методом нелинейной регрессии с итерированием [13] согласно уравнению (3) (в логарифмированном виде) дала следующие значения (± среднеквадратичные ошибки) для искомых параметров (в присутствии 2,98 М KCl): $K'_i=(2{,}05\pm0{,}31)\cdot10^{-4}$ М; $\alpha'=1{,}02\pm0{,}08$; $\beta=1{,}23\pm0{,}03$; рассчитанное значение $pK'_a=11{,}84\pm0{,}07$. Эта кинетическая модель хорошо описывает экспериментальные данные, стандартное отклонение составляет 0,0184 лог. ед. (4,3%). Исходными значениями для итерирования служили различные оценки искомых параметров, варьирование исходных значений не влияло на результат.

Наибольший интерес представляет равенство K_i и K'_i. Оно означает, что в отличие от α-химотрипсина ТМАЦ-ХТ связывает индол при pH 13 не хуже, чем при pH 9. Если $K'_i=K_i$, то $K'_a=K_a$ [10], т. е. при связывании индола pK_a этой группы не меняется. В случае же α-химотрипсина связывание гидрофобных лигандов значительно повышает pK_a его конформационного перехода (см. [14] и ссылки там же).

Полученное значение α' означает, что после депротонизации этой группы исчезает эффект солезависимого промотирования реакции деацилирования ТМАЦ-ХТ, хотя различие во влиянии соли на деацилирование ацилхимотрипсинов со свободной и заполненной гидрофобными щелями, лежащее в основе возникновения солезависимого промотирования [8], сохраняется (ср. значения $\Delta\varkappa_{k_3}$ и $\Delta\varkappa_{k'_3}$ для ТМАЦ-ХТ и циннамоилхимотрипсина [6, 7, 9]). Поскольку этот эффект является кинетическим последствием введения эффектора в гидрофобную щель [8], то можно заключить, что в исчезновении солезависимого промотирования проявляется связь между протонизованностью этой группы и функционированием гидрофобной щели в процессе реакции.

---

* В [6] зависимость k_3 от молярной концентрации KCl c в интервале 1,2—3,5 М была описана уравнением $\lg k_3=-3{,}733-0{,}116c+0{,}0112c^2$. В [9] показано, что в более широком интервале c 0,1—3,5 М она описывается уравнением $\lg k_3=-3{,}663-0{,}204c+0{,}047c^2-0{,}0048c^3$. Используя последнее уравнение, данные о влиянии KCl на деацилирование ТМАЦ-ХТ при высоких значениях pH [6] были пересчитаны. Выяснилось, что зависимости параметров от c в интервале 1,0—3,4 М описываются уравнениями $\lg k_3'=-(3{,}058\pm0{,}065)+(0{,}151\pm0{,}044)c-(0{,}0220\pm0{,}0084)c^2$; $pK_{c^2}=(11{,}34\pm0{,}09)+(0{,}156\pm0{,}035)c$ и $\lg k_{\text{OH}}=-(0{,}974\pm0{,}018)-(0{,}195\pm0{,}009)c$; коэффициенты этих уравнений мало отличаются от коэффициентов, приведенных в [6].

Если в гидрофобной щели находится не молекула эффектора, а ацильная группа, ковалентно связанная с Ser-195, тогда наблюдается и обратное влияние со стороны гидрофобного центра на переход ацилфермента в другую конформационную форму: 1) pK_a^0 перехода у циннамоилхимотрипсина на 0,9±0,2 ед. выше, чем у ТМАЦ-ХТ [6] (интересно отметить, что в то же время значения $\Delta\varkappa_{pK_a}$ совпадают [6]); 2) по кинетическим последствиям переход циннамоилхимотрипсина в щелочную форму отличается от соответствующего перехода у ТМАЦ-ХТ: в случае ТМАЦ-ХТ значительно увеличивается константа скорости деацилирования [6] ($k_3' > k_3$), у циннамоилхимотрипсина $k_3' \approx k_3$ [6, 7]; у ТМАЦ-ХТ уже при pH<12 заметен щелочной гидролиз ацилфермента [6], в то время как у циннамоилхимотрипсина его нет даже при pH 13,4 [7].

Итак, можно сделать вывод, что функционирование центра гидрофобного связывания и депротонизация группы с $pK_a>11$ в ацил-α-химотрипсинах взаимосвязаны. В этом исследуемый конформационный переход в ацил-α-химотрипсинах аналогичен конформационному изменению α-химотрипсина при pH 8,8, и можно заключить, что предположение о соответствии этих процессов друг другу обосновано. Тогда, видимо, они и вызваны депротонизацией одной и той же группы (одних и тех же групп). Поскольку причиной конформационного перехода в α-химотрипсине считают депротонизацию одной или двух α-аминогрупп [1–3], то высокие значения pK_a в ацилхимотрипсинах (12,7 в циннамоилхимотрипсине при 3,5 М KCl [7]) показывают, в каких широких пределах может меняться при модифицировании фермента и изменении состава среды значение pK_a группы, связанной с конформационным состоянием белка (в модельных соединениях pK_a α-аминогруппы 7,8 [10]).

Выводы

При переходе ТМАЦ-ХТ в щелочную форму полностью сохраняется его способность связывать индол. Если связывание индола с протонизованной формой ТМАЦ-ХТ приводит к солезависимому промотированию реакции деацилирования, то в случае депротонизованной формы такой эффект отсутствует. Показано, что функционирование центра гидрофобного связывания и переход ацил-α-химотрипсинов в щелочную форму взаимосвязаны и что этот переход соответствует конформационному изменению α-химотрипсина при pH 8,8.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Fersht, A. R.* Conformational equilibria in α- and δ-chymotrypsin. — J. Mol. Biol., 1972, **64**, N 2, 497—509.
2. *Stoesz, J. D., Lumru, R. W.* Refolding transition of α-chymotrypsin: pH and salt dependence. — Biochemistry, 1978, **17**, N 18, 3693—3699.
3. *Sharma, S. K., Hopkins, T. R.* The role of aminoterminal alanine in the control of conformation and activity of α-chymotrypsin. — Eur. J. Biochem., 1982, **129**, N 1, 87—92.
4. *Fojo, A. T., Whitneu, P. L., Awad, W. M., Jr.* Effects of acetylation and guanidination on alkaline conformations of chymotrypsin. — Arch. Biochem. Biophys., 1983, **224**, N 2, 636—642.
5. *Stoesz, J., Lumru, R. W.* The effects of chemical modification on the refolding transition of α-chymotrypsin. — Biophys. Chem., 1979, **10**, N 1, 105—112.
6. *Паберит М., Аавиксаар А.* Кинетическое проявление двух форм фермента в деацилировании *n*-N, N, N-триметиламмоний-циннамоилхимотрипсина. — Изв. АН ЭССР. Хим., 1983, **32**, № 4, 273—280.
7. *Paberit, M., Peips, M., Aaviksaar, A.* Salting effects in cinnamoyl-chymotrypsin deacylation. — Biochim. Biophys. Acta, 1984, **789**, N 3, 257—265.

8. *Паберит М. Ю., Пейпс М. М., Аавиксаар А. А.* Солезависимое промотирование реакции деацилирования *n*-N, N, N-триметиламмоний-*транс*-циннамоилхимотрипсина. — Реакц. способн. орг. соед., 1986, **23**, № 1 (81), 57—62.
9. *Паберит М.* Особенности проявления кинетического эффекта высаливания при деацилировании *n*-N, N, N-триметиламмоний-*транс*-циннамоилхимотрипсина. — Изв. АН ЭССР. Хим., 1987, **36**, № 1, 68—73.
10. *Фёршт Э.* Структура и механизм действия ферментов. М., 1980, гл. 5.
11. *Garel, J.-R., Labouesse, B.* Binding interactions between two ligands and a monomeric protein. Study on indole, protons and chymotrypsin. — J. Mol. Biol., 1970, **47**, N 1, 41—56.
12. *Garel, J.-R.* Change in the conformation of δ-chymotrypsin upon binding a specific substrate at high pH. — FEBS Lett., 1975, **50**, N 3, 339—345.
13. *Wilkinson, G. N.* Statistical estimations in enzyme kinetics. — Biochem. J., 1961, **80**, N 2, 324—332.
14. *Olm, L. M., Glick, D. M.* A comparison of anisole and formanilide binding to chymotrypsin by potentiometric difference titrimetry. — J. Biol. Chem., 1970, **245**, N 4, 814—817.

Институт химической и биологической физики
Академии наук Эстонской ССР

Поступила в редакцию
3/VII 1986

M. PABERIT

INDOOLI SIDUMINE *p*-N,N,N-TRIMETÜÜLAMMOONIUM-*trans*-TSINNAMOÜÜL-α-KÜMOTRÜPSIINI LEELISESE VORMIGA

On uuritud indooli mõju *p*-N,N,N-trimetüülammoonium-*trans*-tsinnamoüül-α-kümotrüpsiini (TMAT-KT) deatsülatsioonile KCl 2,98 M kontsentratsiooni juuresolekul 25 °C juures pH-vahemikus 11,5—13,3. Leiti, et üleminekul leelisesse vormi (pK_a nendes tingimustes 11,8) säilitab TMAT-KT täielikult oma võime siduda indooli. Kui TMAT-KT protoniseeritud vormi deatsülatsioon soola lahuses kiireneb indooli sidumisel soolast sõltuva promoteerimisefekti tõttu, siis deprotoniseeritud vormi deatsülatsiooni kiiruskonstanti indooli juuresolek ei muuda. On näidatud, et hüdrofoobse sidumise tsentri funktsioneerimine atsüül-α-kümotrüpsiinides ja nende üleminek leelisesse vormi on vastastikku seotud ning et see üleminek vastab α-kümotrüpsiini konformatsioonimuutusele pH 8,8 juures.

M. PABERIT

INDOLE BINDING WITH THE ALKALINE FORM OF *p*-N,N,N-TRIMETHYLAMMONIUM *trans*-CINNAMOYL-α-CHYMOTRYPSIN

The influence of indole on the *p*-N,N,N-trimethylammonium *trans*-cinnamoyl-α-chymotrypsin (TMAC-CT) deacylation at 2.98 M KCl concentration and 25 °C over the pH range from 11.5 to 13.3 has been studied. It has been established that on the conversion of TMAC-CT into the alkaline form (in these conditions, pK_a of the transition has a value of 11.8) TMAC-CT fully retains its ability to bind indole. While, in salt solution, the binding of indole to the protonated form of TMAC-CT causes an increase in its deacylation rate constant due to the salt-dependent promotional effect, the deacylation rate constant of the deprotonated form does not change in the presence of indole. It is shown that the functioning of the hydrophobic binding site in acyl-α-chymotrypsins and their transition to the alkaline form are interdependent and that this transition corresponds to the conformational change of α-chymotrypsin at pH 8.8.