

Г. Л. ГРИГОРЯН

ИЗУЧЕНИЕ СТРУКТУРНЫХ ПЕРЕСТРОЕК В АКТИВНОМ ЦЕНТРЕ α -ХИМОТРИПСИНА

(Представлено академиком С. И. Севериным 12 I 1971)

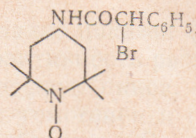
Механизм гидролиза α -химотрипсином сложных эфиров изучен довольно подробно. Данные рентгеноструктурного анализа (^{1,2}) показали наличие в активном центре гидрофобной полости, связывающей ароматические остатки субстратов. Известно, что в процессе катализа происходит промежуточное ацилирование спиртовой группы серина-195 (^{3,4}). Как в ацилировании, так и в деацилировании пространственно сближенный с серином-195 имидазол гистидина-57 выступает в качестве акцептора и донора протона (⁵).

Применение субстратов и ингибиторов, содержащих иминоксильные радикалы (⁶), позволило получить некоторые дополнительные сведения о механизме действия этого фермента (⁷⁻¹⁰).

В настоящей работе * проведено изучение активного центра α -химотрипсина с помощью нового «спин-меченого» ингибитора 2, 2, 6, 6-тетраметил-пиперидин-1-оксил-4-амида бромминдальной кислоты (¹¹).



Рис. 1. Спектры э.п.р.: *a* — «спин-меченый» ингибитор, связанный с α -химотрипсином; *б* — то же в присутствии бензамида



Ингибитор солюбилизируется α -химотрипсином (0,2M фосфатно-цитратный буфер pH 7,8—8). При этом в спектре э.п.р. появляются широкие компоненты, соответствующие сильному ограничению подвижности радикального фрагмента спин-метки, т. е. такой ситуации, когда радикальный фрагмент не имеет свободного вращения относительно макромолекулы фермента (рис. 1*a*). Таким обра-

зом, спектр э.п.р. на рис. 1*a* представляет собой наложение двух сигналов: широкого анизотропного сигнала э.п.р. радикалов, связанных с ферментом, и узкого изотропного сигнала радикалов в растворе. Характер сигнала э.п.р. комплекса ингибитора с ферментом подтверждает гидрофобную природу их связи. Ассоциация «спин-меченого» ингибитора с α -химотрипсином происходит значительно быстрее, если добавляемый к раствору фермента ингибитор предварительно растворить в минимальном количестве этанола.

Конкурентные ингибиторы α -химотрипсина бензамид и 2,4-дибромфенол (¹³) вытесняют «спин-меченый» ингибитор из комплекса с ферментом

* Основные результаты работы докладывались на 7-м Международном симпозиуме по химии природных соединений (¹²)

(рис. 1б); это свидетельствует в пользу того, что «спин-меченый» ингибитор связывается с «арильным» участком активного центра, т. е. участком, который связывает ароматическую часть молекулы субстрата, определяя субстратную специфичность α -химотрипсина. На рис. 2 представлена зависимость способности α -химотрипсина связывать «спин-меченый» ингибитор от pH. Отложенное по оси ординат отношение площадей анизотропного сигнала э.п.р. (S_1) к сумме площадей анизотропного и изотропного сигналов выражает долю радикалов, ассоциированных с ферментом. Расчет доли радикалов, связанных с ферментом $S_1/(S_1 + S_2)$ производился при допущении, что форма как анизотропного, так и изотропного сигналов не изменяется в зависимости от pH. Максимум кривой на рис. 2 совпадает с максимумом pH зависимости активности α -химотрипсина, которая представляет собой колоколообразную кривую с максимумом при pH 8 и, как предполагается, отражение влияние на активность фермента двух групп — имидазола гистидина-57 (pK 6,9) и α -аминогруппы изолейцина-16 (pK 9) (¹⁴⁻¹⁶).

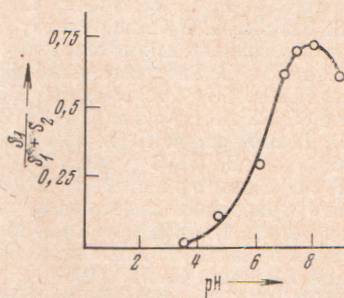


Рис. 2. pH-зависимость способности спин-метки ассоциироваться с α -химотрипсином

Известно, что карбоксильная группа аспарагиновой кислоты 194 способна образовывать солевую связь с α -аминогруппой изолейцина-16 (¹)

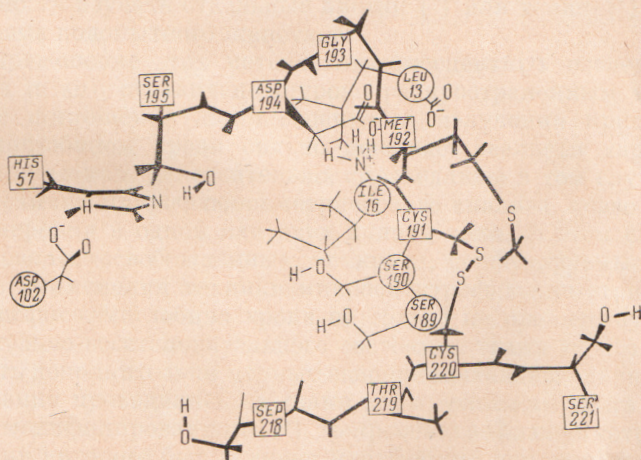


Рис. 3. Наиболее важные аминокислотные остатки в активном центре α -химотрипсина (¹⁶)

(рис. 3). По гипотезе Сиглера (¹⁷), при ионизации изолейцина-16 происходит конформационный переход, что согласуется с тем, что ацетилирование α -аминогруппы изолейцина-16 приводит к инактивации фермента (¹⁸).

Уменьшение сродства α -химотрипсина к «спин-меченому» ингибитору при переходе к кислым pH указывает на наличие другой конформационной перестройки, связанной, вероятнее всего, с ионизацией гистидина-57.

Автор выражает благодарность В. И. Сускиной за предоставление препарата спин-меченого ингибитора, Э. Г. Розанцеву и В. А. Яковлеву за ценные замечания и интерес к работе.

Институт химической физики
Академии наук СССР
Москва

Поступило
4 XII 1970

- ¹ B. W. Matthews, P. B. Sigler et al., *Nature*, **214**, 652 (1967). ² D. M. Blow, J. J. Birktoft, B. S. Hartley, *Nature*, **221**, 337 (1969). ³ R. A. Oosterbaan, P. Kunst et al., *Biochim. et biophys. acta*, **27**, 556 (1968). ⁴ F. J. Kezdy, G. E. Clement, M. L. Bender, *J. Am. Chem. Soc.*, **86**, 3690 (1964). ⁵ T. Inagami, S. S. York, A. Patchornik, *J. Am. Chem. Soc.*, **87**, 126 (1965). ⁶ Э. Г. Розанцев, Свободные иминоксильные радикалы, М., 1970. ⁷ L. J. Berliner, H. M. McConnell, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **55**, 708 (1966). ⁸ J. C. Hsia, D. J. Kosman, L. H. Piette, *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, **36**, 75 (1969). ⁹ J. D. Morrisett, C. A. Broomfield, B. E. Hackley, *J. Biol. Chem.*, **244**, 5758 (1969). ¹⁰ D. J. Kosman, I. C. Hsia, L. H. Piette, *Arch. Biochem. and Biophys.*, **133**, 29 (1969). ¹¹ В. И. Сускина, Кандидатская диссертация, ИХФ АН СССР, 1970. ¹² Г. Л. Григорян, Т. П. Гусовская и др., VII Международн. симпозиум по химии природных соединений, тез., Рига, 1970, стр. 136. ¹³ К. Мартинек, А. В. Левашев, И. В. Березин, *Молек. биол.*, **4**, 339 (1970). ¹⁴ M. L. Bender, G. E. Clement et al., *J. Am. Chem. Soc.*, **86**, 3680 (1964). ¹⁵ H. Kaplan, K. J. Leider, *Canad. J. Chem.*, **45**, 547 (1967). ¹⁶ H. P. Kasserra, K. J. Leider, *Canad. J. Chem.*, **47**, 4031 (1969). ¹⁷ P. B. Sigler, D. M. Blow et al., *J. Mol. Biol.*, **35**, 143 (1968). ¹⁸ H. L. Oppenheimer, B. Labouesse, G. P. Hess, *J. Biol. Chem.*, **241**, 2720 (1966).