

Член-корреспондент АН СССР И. В. БЕРЕЗИН, Р. Б. АЙСИНА,
С. Д. ВАРФОЛОМЕЕВ, Н. Ф. КАЗАНСКАЯ

ИНИЦИИРОВАНИЕ СВЕТОМ ГИДРОЛИЗА НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНОГО СУБСТРАТА ПРИ АВТОКАТАЛИТИЧЕСКОМ РАЗМНОЖЕНИИ ФЕРМЕНТА

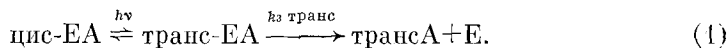
В соответствии с законом фотохимической эквивалентности Штарга — Эйнштейна квантовый выход первичной фотохимической реакции не может быть больше единицы. Это означает, что для создания системы с квантовым выходом больше единицы необходимо иметь сопряженный темновой процесс, который мог бы эффективно усилить первичный световой сигнал за счет протекания химической реакции. Таким образом, эффективность усиления будет зависеть от кинетики и механизма сопряженного темнового процесса.

Использование фотоиницированной каталитической, например ферментативной, реакции дает возможность безгранично усиливать квантовый выход первичного процесса. В таком процессе эффективный квантовый выход продукта прямо пропорционален первичному квантовому выходу катализатора, константе скорости каталитической реакции и времени ее протекания (¹⁻³). Зарожда светом реакцию автокаталитического размножения катализатора (⁴), можно перейти от линейной к экспоненциальной зависимости эффективного квантового выхода продукта от времени протекания темнового процесса и достичь чрезвычайно высоких эффективностей усиления действия светового импульса при низких квантовых выходах первичного процесса. В работе обсуждается инициированный светом процесс автокаталитического размножения катализатора — трипсина и параллельно протекающей реакции гидролиза низкомолекулярного субстрата — *m*-нитроанилида *N*-карбобензоксиг-*L*-аргинина. *m*-Нитроанилид *N*-карбобензоксиг-*L*-аргинина был синтезирован по методу, описанному в работе (⁵). Методика получения цис-циннамоил-трипсина (цис-ЦТр) описана в работе (⁶). За кинетикой автокаталитической реакции активации трипсиногена в присутствии *m*-нитроанилида *N*-карбобензоксиг-*L*-аргинина следили спектрофотометрически по выделению *m*-нитроанилина (λ 400 нм; рН 8,0; 25°). Реакция инициировалась добавлением циннамоилтрипсина к смеси трипсиногена и *m*-нитроанилида *N*-карбобензоксиг-*L*-аргинина. Кинетика выделения *m*-нитроанилина регистрировалась в присутствии облученного и необлученного растворов цис-ЦТр. Раствор цис-ЦТр облучался монохроматическим светом с λ 313 нм, интенсивность лампы $1,25 \cdot 10^{16}$ квант/сек. Остальные используемые реагенты и методы аналогичны описанным ранее (¹⁻⁴, ⁶⁻⁷).

В работах (¹⁻⁴, ⁶) было показано, что каталитическая активность α -хитрипсина и трипсина может быть инициирована светом. Это можно осуществить благодаря такому стерическому окружению активного центра этих ферментов, которое приводит к преимущественному превращению одного из стереоизомеров субстратов β -арилакриловых кислот. Если раствор фермента инкубируется с соответствующим производным, ацилирующим его активный центр, фермент теряет свою каталитическую активность и образующийся ацилфермент, в свою очередь, гидролизуется с различными скоростями в зависимости от стереоконфигурации ацильной части. Так,

значения констант скоростей гидролиза цис- и транс-ЦТр равны $2,6 \cdot 10^{-5} \text{ сек}^{-1}$ и $1,2 \cdot 10^{-2} \text{ сек}^{-1}$ соответственно (6).

Когда цис-ЦТр поглощает свет при длине волны β -акрилоильного хромофора, происходит цис \rightarrow транс-изомеризация хромофора и стабильный цис-изомер ацилфермента превращается в лабильный в условиях опыта транс-изомер, который быстро гидролизуеться с образованием активного фермента и β -арилакриловой кислоты (1-4, 6)



Образовавшийся под действием света фермент может в присутствии субстрата вызвать его химическое превращение, усилив тем самым световой сигнал



Мерой усиления светового сигнала будет квантовый выход продукта Р темновой стадии реакции (2), фотоиницированной светом (2, 3). Зависимость квантового выхода (γ_1) продукта Р описывается следующим соотношением:

$$\gamma_1 = \frac{[\text{P}]}{n} = \varphi_0 \cdot k_{\text{кат}} \cdot t, \quad (3)$$

где $k_{\text{кат}}$ и t — константа скорости и время протекания темновой реакции (2). При этом должны выполняться условия: а) фермент «насыщен» субстратом, т. е. $[\text{S}]_0 \gg K_M$; б) количеством прореагировавшего субстрата можно пренебречь; в) время облучения много меньше времени протекания темнового процесса; г) концентрация катализатора, образовавшегося под действием света, линейно зависит от дозы поглощенного света (φ_0 — квантовый выход фотозарождения катализатора).

Если механизм темновой каталитической стадии реакции автокаталитический, то чувствительность системы в целом к свету будет значительно выше, поскольку выход катализатора резко увеличивается.

Индукированная светом автокаталитическая реакция будет иметь место, если за реакцией (1) следует стадия автокаталитического размножения катализатора. Для этой цели в данном случае следует ввести в систему неактивный предшественник катализатора трипсина — трипсиноген (Тг). Тогда молекулы трипсина, возникшие под действием света по реакции (1), будут вызывать темновую реакцию активации трипсиногена



Эффективный квантовый выход образования трипсина (γ_2) в системе реакций (1, 4) будет описываться уравнением

$$\gamma_2 = \varphi_0 \cdot e^{vt}, \quad (5)$$

где

$$v = \frac{k'_{\text{кат}} [\text{Тг}]_0}{K_M' + [\text{Тг}]_0}, \quad (6)$$

K_M' и $k'_{\text{кат}}$ — константа Михаэлиса и константа скорости образования трипсина в реакции автоактивации зимогена.

Оценка величины γ_2 за время полной активации трипсиногена трипсином, инициированным светом, когда в необлученном растворе нет больших изменений концентрации трипсиногена, приводит к величине $10^5 - 10^7$ (при условии $[\text{Тг}]_0 \gg K_M'$ и $t \gg t_{\text{обл}}$). Практически условие $[\text{Тг}]_0 \gg K_M'$ невыполнимо из-за высокой величины K_M' , и реализуется условие $[\text{Тг}]_0 \gg [\text{Е}]_0$ и $[\text{Тг}]_0 \approx K_M'$; γ_2 достигает значения 10^3 , что на несколько порядков выше φ_0 .

Если в системе (1, 4) одновременно с автокаталитической реакцией размножения катализатора проходит реакция гидролиза субстрата (2), то

анализ кинетической схемы реакций (1), (2), (4) приводит к следующей зависимости, если пренебречь превращением субстрата и трипсиногена:

$$[P] = \frac{\alpha}{\beta} \cdot [E]_0 \cdot e^{\beta t}. \quad (7)$$

Здесь $[E]_0$ — начальная концентрация фермента, образовавшегося под действием света. Значения параметров α и β представлены ниже:

$$\alpha = \frac{k_{\text{нат}}[S]_0}{K_M \left(1 + \frac{[TГ]_0}{K_M'} \right) + [S]_0}, \quad (8)$$

$$\beta = \frac{k_{\text{нат}}'[TГ]_0}{K_M' \left(1 + \frac{[S]_0}{K_M} \right) + [TГ]_0}. \quad (9)$$

В соответствии с уравнением (7) и в предположении, что концентрация зарожжденного светом трипсина линейно зависит от дозы поглощенного света, а также, если время облучения заметно ниже времени темновой реакции, общий квантовый выход продукта P может быть представлен уравнением

$$\gamma_s = \varphi_0 \cdot \frac{\alpha}{\beta} \cdot e^{\beta t}. \quad (10)$$

На рис. 1 иллюстрируется процесс фотоиницирования автокаталитической реакции активации трипсиногена в присутствии субстрата. Кинетическая кривая описывает процесс накопления *m*-нитроанилина в системе,

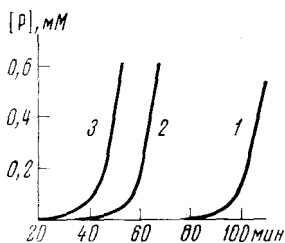


Рис. 1

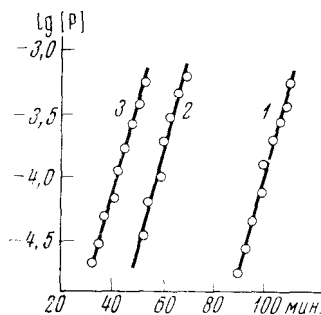


Рис. 2

Рис. 1. Кинетическая кривая выделения *m*-нитроанилина в результате фотоиницирования автокаталитической активации трипсиногена в присутствии субстрата *m*-нитроанилида *N*-карбобензоксиг-*L*-аргинина. Условия: концентрация дис-циннамолтрипсина $0,24 \text{ мкМ}$, *m*-нитроанилида *N*-карбобензоксиг-*L*-аргинина 10^{-3} М , трипсиногена $0,34 \text{ мМ}$; $0,1 \text{ М}$ трис- HCl -буфер; $0,05 \text{ М}$ CaCl_2 , $\text{pH } 8,0$, 25° . Время облучения (λ 313 нм): 1 — 0; 2 — 30; 3 — 300 сек.

Рис. 2. Данные рис. 1, представленные в координатах $\lg [P]$ от времени. 1—3 — то же, что на рис. 1

содержащей трипсиноген и дис-ЦТр. Кривая 1 соответствует случаю необлученного раствора. Присутствие следовых количеств трипсина в системе ацилфермент — профермент приводит к тому, что после некоторого периода индукции (здесь около 2 час.) концентрация трипсина в системе начинает быстро нарастать и образуется продукт реакции гидролиза субстрата. Кривые 2 и 3 соответствуют различным временам облучения раствора дис-ЦТр. Гидролиз субстрата в случае облученных растворов заканчи-

вается за времена, при которых в необлученном растворе не обнаруживаются детектируемые количества *m*-нитроанилина.

Зависимость (7) действительно имеет место на опыте. На рис. 2 представлены кинетические данные рис. 1 как функция $\lg [P]$ от времени *t*.

Расчитанное значение коэффициента β равно для всех кинетических кривых $0,18 \pm 0,02$ мин⁻¹, что хорошо согласуется с кинетическими данными по автоактивации трипсиногена (8). Представляет интерес вычислить концентрацию зарождаемого светом фермента. Это может быть сделано подстановкой соответствующих значений в уравнение (7). Значение α при этом определяется по формуле (8), учитывая, что K_M равно $1,75 \cdot 10^{-3}$ *M*, а $k_{кат}$ в нашем эксперименте равняется примерно 8 сек⁻¹ (так как $k_{кат}$ для реакции гидролиза *m*-нитроанилида *N*-карбобензокси-*L*-аргинаина равно 0,74 сек⁻¹ при рН 6 (5)). Оказывается, что для наблюдаемого эффекта в случае 2 и 3 (рис. 1) достаточно зародить светом очень небольшую концентрацию трипсина, а именно 10^{-12} *M*.

Описанная выше система сопряженных реакций автоактивации и гидролиза субстрата дает возможность в короткий промежуток времени достичь исключительно высоких квантовых выходов в фотохимических процессах при низких первичных квантовых выходах.

Московский государственный университет
им. М. В. Ломоносова

Поступило
23 VII 1974

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ И. В. Березин, С. Д. Варфоломеев, К. Мартишек, ДАН, т. 193, 932 (1970). ² I. V. Berezin, S. D. Varfolomejev, K. Martinek, Europ. J. Biochem., v. 19, 242 (1971). ³ И. В. Березин, Н. Ф. Казанская, Р. В. Айсина, ДАН, т. 207, 1383 (1972). ⁴ Р. В. Айсина, Т. Е. Васильева и др., Биохимия, т. 38, 601 (1973). ⁵ С. Е. Бреслер, Г. П. Власов, В. М. Крутяков, Молек. биол., т. 3, 15 (1969). ⁶ И. В. Березин, Р. В. Айсина и др., Биоорганическая химия, т. 1, № 3 (1975). ⁷ Р. В. Айсина, Н. Ф. Казанская, И. В. Березин, Биохимия, т. 39, 577 (1974). ⁸ J. P. Abita, M. Delaage, M. Lazdunski, Europ. J. Biochem., v. 8, 314 (1969).