

С. Д. ВАРФОЛОМЕЕВ, А. М. КЛИБАНОВ, К. МАРТИНЕК,
член-корреспондент АН СССР И. В. БЕРЕЗИН

СВЕТОЧУВСТВИТЕЛЬНЫЕ КАТАЛИЗАТОРЫ

4-НИТРОЦИННАМОИЛЬНАЯ ГРУППА КАК ХРОМОФОРНАЯ МЕТКА АКТИВНОГО ЦЕНТРА α -ХИМОТРИПСИНА

В последнее время были найдены подходы к созданию каталитических систем, активность которых можно регулировать при помощи света (¹⁻³). Такие катализаторы служат высокоэффективным средством для усиления воздействия света на химическую систему за счет сопряженного каталитического процесса. Так, фотоиницирование каталитической реакции, протекающей с участием биологических катализаторов — ферментов, позволяет получить на каждый первоначально поглощенный квант света 10^2 — 10^7 молекул продуктов каталитического превращения за 1 сек. протекания сопряженной каталитической реакции (⁴). С другой стороны, очевидно, что при помощи «светочувствительной метки», введенной в активный центр фермента, можно получить дополнительную информацию о механизме действия катализатора и строении его активного центра (⁵).

В работах (^{1, 2}) нами показано, что каталитическую активность протеолитического фермента α -химотрипсина можно регулировать при помощи света, используя фотохимическую цис-транс-изомеризацию ацилферментного промежуточного соединения, образующегося при ферментативном превращении некоторых производных коричной кислоты. Настоящее исследование посвящено рассмотрению вопроса о том, каким образом введение в активный центр хромофорной циннамоильной метки и ее фотохимическая изомеризация могут быть использованы для получения сведений о природе и специфичности действия активного центра фермента.

Нами были изучены спектральные свойства 4-нитро-цис-циннамоил- α -химотрипсина (цис-НЦХТ) и pH-зависимость квантового выхода его цис-транс-фотостероизомеризации. Цис-НЦХТ получали реакцией ацилирования активного центра фермента *n*-нитрофениловым эфиром 4-нитро-цис-коричной кислоты по методике, описанной в (⁴). Ацилфермент отделяли от низкомолекулярных продуктов реакции методом гельфильтрации на сефадексе G-25 в 10^{-3} М HCl. Критерием чистоты препарата служило отсутствие поглощения *n*-нитрофенолят-иона при щелочных значениях pH ($\lambda > 400$ мμ), а также совпадение спектров поглощения одно- и двукратно очищенного препарата. Фотоизомеризацию исследовали при освещении раствора ацилфермента ($\sim 1 \cdot 10^{-5}$ М) монохроматическим светом (313 мμ). При определении интенсивности источника света использовали ферриоксалатный актинометр. Квантовый выход изомеризации определяли по образованию свободного фермента из лабильного транс-изомера. Для определения ферментативной активности использовали методику (⁶). Значения pH устанавливали с помощью pH-метра Radiometer TTT-1с.

pH-Зависимость спектра поглощения цис-НЦХТ
На рис. 1 приведен у.-ф. спектр поглощения цис-НЦХТ. Видно, что спектр поглощения цис-НЦХТ (рис. 1А, в) существенно отличается от спектра поглощения свободного фермента (рис. 1А, а) за счет наличия в первом соединении нитроциннамоильной группы. Это позволяет на длинах волн $\lambda > 310$ мμ спектрофотометрически следить за поглощением этой группы избегая наложения спектра поглощения белка.

При изменении концентрации ионов водорода от pH 3 до pH 9 происходит существенное изменение спектра поглощения цис-НЦХТ на длинах волн поглощения нитроциннамоильной группы (рис. 1А, Б, В). На рис. 2А представлена зависимость от pH молярного поглощения цис-НЦХТ на длине волны 320 мμ (аналогичная зависимость оптической плотности раствора ацилфермента от pH имеет место и на других длинах волн в диапа-

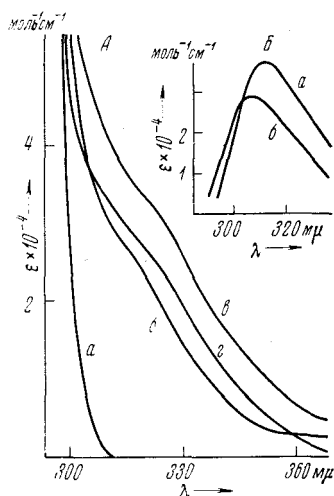


Рис. 1

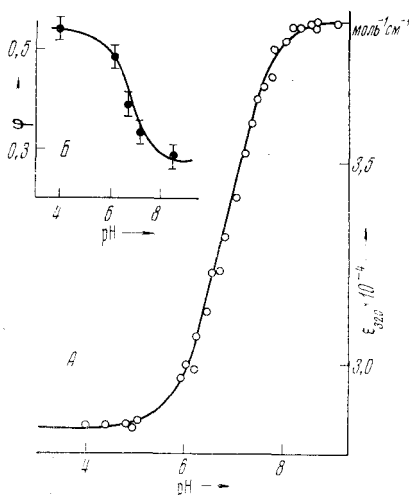


Рис. 2

Рис. 1. Спектральные характеристики цис-НЦХТ. Условия 25°, 0,1 M KCl; 0,01 M KH_2PO_4 ; концентрации фермента или цис-НЦХТ составляли $\sim 2 \cdot 10^{-5}$ M. Спектры сняты на двухлучевом спектрофотометре Hitachi-124. А — молярное поглощение: а — α-химотрипсин pH 3; б, в, г — цис-НЦХТ pH 3 и pH 9 соответственно, г — pH 3 или 9 в растворе 8 M мочевины. Б — разностный спектр поглощения цис-НЦХТ по отношению к свободному ферменту: а — pH 9, б — pH 3

Рис. 2. Зависимость молярного поглощения цис-НЦХТ (λ 320 мμ) от pH (А) и квантового выхода фотоизмеризации этого ацилфермента (Б). Условия те же, что на рис. 1. Кривые рассчитаны теоретически, предполагая значения pK_a ионогенной группы фермента равными 6,8 (А) и 6,7 (Б) соответственно

зоне 310—350 мμ). Видно, что спектральные изменения обусловлены протонизацией ионогенной группы с $pK_a = 6,8 \pm 0,2$. Поскольку сама хромофорная метка не содержит групп, способных присоединять или отдавать протон в изученном диапазоне pH, следует заключить, что наблюдаемое спектральное изменение контролируется ионогенной группой белка.

Нитроциннамоильный хромофор изменяет свой у.-ф. спектр поглощения в зависимости от концентрации ионов водорода в растворе лишь в нативной форме ацилфермента. Если разрушить третичную структуру ацилфермента действием 8 M раствора мочевины, то изменение pH раствора не оказывает влияния на спектр поглощения хромофорной метки (рис. 1А, г).

pH-зависимость квантового выхода цис-транс-фотоизмеризации цис-НЦХТ. При освещении цис-НЦХТ у.-ф. светом в области длин волн, соответствующих по поглощению введенного в молекулу хромофора, происходит фотохимическая изомеризация циннамоильной группы. В результате фотостереоизомеризации образуется лабильный ацилфермент (транс-НЦХТ), который практически мгновенно гидролизуетс с образованием свободного α-химотрипсина (4). На рис. 2Б приведена зависимость квантового выхода (φ) фотоизмеризации цис-НЦХТ от pH среды. Видно, что квантовый выход фотоизмеризации зависит от ионогенной группы белка с $pK_a = 6,7$, причем изомеризация «кислой» формы

ацилфермента протекает в ~ 2 раза более эффективно, чем изомеризация «щелочной формы».

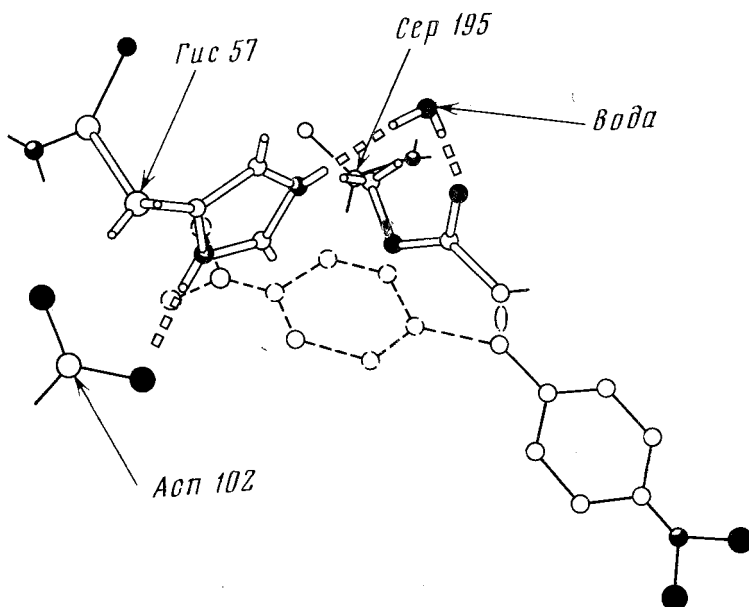
Механизм наблюдаемых рН-эффектов. На основании найденного значения $pK_a = 6,7-6,8$ можно полагать, что группой, ионогенное равновесие которой оказывает влияние на хромофорную метку, является имидазол гистидина-57. Эта группа выполняет, как полагают, роль общесосновного катализатора в активном центре α -химотрипсина (^{7, 8}). Близкие значения pK_a были найдены для этой группы при исследовании зависимости ферментативной активности от рН (⁷), а также при обратимом ингибировании каталитической активности ионами Ag^+ (⁹).

Влияние ионизации каталитически активного имидазола на хромофорную метку (см. рис. 2) может быть объяснено по крайней мере при помощи двух альтернативных механизмов: 1) в результате ионизации каталитически активного имидазола происходит изменение условий сольватации арилакрилоильного хромофора. У.-ф. спектры поглощения арилакрилоильных хромофоров действительно чувствительны к свойствам среды (¹⁰); 2) возможно, что происходит образование специфического внутримолекулярного комплекса хромофора с одной из форм ионогенной группы активного центра. В настоящее время трудно отдать предпочтение какому-нибудь одному из этих механизмов.

Ранее Бернхард и Ташьян (¹¹) наблюдали рН-зависимость спектра поглощения транс-индолил-акрилоил- α -химотрипсина ($pK_a = 7,7$). В качестве одного из возможных объяснений этого явления авторы предложили образование внутримолекулярного комплекса нуклеофила активного центра с карбонильной группой субстратного остатка. В отличие от наших результатов, полученных для цис-НЦХТ, спектр поглощения транс-индолил-акрилового хромофора смещается при увеличении рН в более коротковолновую область. На этом основании можно заключить, по-видимому, что наблюдаемые рН-эффекты имеют в том и другом случае разную природу. Возможно, что в случае цис-НЦХТ происходит комплексообразование каталитически активного имидазола с ароматическим кольцом хромофора. В этой связи заслуживает внимания тот факт, что ни цис-, ни транс-циннамоильные группы соответствующих ацилферментов не обнаруживают заметных рН-зависимых спектральных изменений при 250—320 мμ и 310 мμ соответственно (последний результат согласуется с данными (¹²)). Очевидно, наблюдаемые нами рН-эффекты (рис. 2) специфически зависят от наличия 4-нитро-заместителя в хромофоре. Хорошо известно, что нитросоединения легко образуют к.п.з. с электронодонорными молекулами (при комплексообразовании наблюдается смещение максимума поглощения в длинноволновую область) (¹³).

Независимо от конкретного механизма наблюдаемых рН-эффектов можно заключить, что в нативной форме фермента каталитически активный имидазол гистидина-57 и цис-хромофорная метка расположены в непосредственной близости друг от друга. Это согласуется с недавно полученными результатами рентгеноструктурного анализа транс-индолил-акрилоил- α -химотрипсина. На схеме 1, построенной в соответствии с (⁸), изображен фрагмент активного центра α -химотрипсина. В построении схемы заложено предположение, что при замене индольного кольца в транс-индолил-акрилоил- α -химотрипсине 4-нитрофенильной группой в транс-НЦХТ конформационное состояние каталитически активных групп (имидазола гистидина-57, ОН-группы серина-195 и карбонильной группы аспарагиновой кислоты—102) существенно не изменится. На схеме пунктиром представлена предполагаемая нами конформация активного центра при включении в него 4-нитро-цис-циннамоильной хромофорной метки. Видно, что в этом случае 4-нитроциннамоильная группа оказывается в непосредственной близости от имидазольного кольца гистидина-57.

Транс-специфичность каталитического действия α -химотрипсина. Полученные нами результаты имеют важное значе-



ние для установления механизма транс-специфичности каталитического действия α -химотрипсина. Известно, что реакционные способности цис- и транс-изомеров производных β -арилакриловых кислот в реакции их ферментативного гидролиза различаются более чем в 10^3 раз (^{1, 2, 4, 14}). Обнаруженное нами влияние pH на спектр поглощения и квантовый выход стереоизомеризации нитроциннамоильного хромофора свидетельствует о том, что в цис-конформации ароматическое кольцо находится, по-видимому, в непосредственной близости от каталитически активного гистидина-57. Наглядно это показано на схеме, где пунктиром дано предполагаемое строение активного центра цис-ацилфермента. На схеме видно, что нитроциннамоильная «метка» может препятствовать участию в реакции каталитически активной имидазольной группы гистидина-57 или разрушать необходимое для катализа пространственное соответствие между имидазольной группой гистидина-57 и карбоксильной группой аспарагиновой кислоты—102. В итоге эти факты подтверждают представление о том, что транс-специфичность действия α -химотрипсина связана с тем, что в цис-ацилферменте каталитическая реакция пространственно затруднена боковой группой субстрата (¹⁴).

Московский государственный университет
им. М. В. Ломоносова

Поступило
22 X 1971

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ И. В. Березин, С. Д. Варфоломеев, К. Мартинек, ДАН, **193**, 932 (1970). ² K. Martinek, S. D. Varfolomeyev, I. V. Berezin, Europ. J. Biochem., **19**, 242 (1971). ³ H. Kaufman, S. M. Vratsanos, B. F. Erlanger, Science, **162**, 1487 (1968). ⁴ S. D. Varfolomeyev, A. M. Klibanov et al., FEBS Letters, **15**, 118 (1971). ⁵ С. Д. Варфоломеев, К. Мартинек, И. В. Березин, В сборн. Тр. научн. конфер. Межфакультетской лаб. биоорганической химии МГУ, М., 1970, стр. 289. ⁶ К. Мартинек, Х. Вилль и др., Мол. биол., **3**, 554 (1969). ⁷ H. P. Kasser, K. J. Laidler, Canad. J. Chem., **47**, 4031 (1969). ⁸ R. Henderson, J. Mol. Biol., **54**, 341 (1970). ⁹ И. В. Березин, Х. Вилль, К. Мартинек, ДАН, **175**, 230 (1967). ¹⁰ M. L. Bender, G. R. Schonbaum, B. Zerner, J. Am. Chem. Soc., **84**, 2540 (1962). ¹¹ S. A. Bernhard, Z. H. Tashjian, J. Am. Chem. Soc., **87**, 1806 (1965). ¹² M. L. Bender, B. Zerner, J. Am. Chem. Soc., **84**, 2550 (1962). ¹³ Э. М. Росовер, В сборн. Новые проблемы физической органической химии, М., 1969, стр. 36. ¹⁴ И. В. Березин, С. Д. Варфоломеев и др., Биохимия, **37**, № 3 (1972).