

BBA 65640

MISE EN EVIDENCE CINETIQUE D'UNE TRANSESTERIFICATION AU COURS DE L'HYDROLYSE TRYPSIQUE DE L'ESTER ETHYLIQUE DE LA LYSINE EN PRESENCE DE DIVERS ALCOOLS

F. SEYDOUX

Laboratoire d'Enzymologie Physico-Chimique et Moléculaire, Faculté des Sciences, Université de Paris, Orsay (France)

(Reçu le 10 mars, 1967)

SUMMARY

Kinetic evidence for transesterification during the tryptic hydrolysis of lysine ethyl ester in the presence of various alcohols

During hydrolytic reactions catalysed by an enzyme in the presence of nucleophilic reagents competing with water, new products hydrolysable by the enzyme can appear. These products can perturb the kinetics of the hydrolysis of the initial substrate.

From a general scheme involving a covalent intermediate such as an acyl-enzyme, the resolution of the system gives complex relationships. These relationships can be simplified if the concentration of initial substrate, and substrates appearing from the nucleophilic competition, are very small compared with their respective apparent Michaelis constants.

These equations are verified in the particular case of the tryptic hydrolysis of lysine ethyl ester in the presence of various alcohols.

The kinetic analysis shows that the ratio of k_2/K_S increases from lysine ethyl ester to benzyl, butyl and pentyl esters.

INTRODUCTION

Au cours des réactions d'hydrolyse enzymatique et du fait de la compétition nucléophile entre l'eau et ses analogues^{1,2} il peut apparaître dans le milieu réactionnel des produits qui sont également des substrats de l'enzyme. Si on mesure des vitesses initiales, il est inutile de se préoccuper de cette éventualité, la concentration de ces produits étant négligeable au tout début de la réaction. Il n'en est plus de même si on étudie la cinétique complète d'hydrolyse et il faut alors tenir compte de l'incidence de ces produits sur le cours de la réaction.

Abréviations: LEE, ester éthylique de la L-lysine; LME, ester méthylique de la L-lysine.

PARTIE THÉORIQUE

Le Schéma cinétique I décrit cette situation dans l'hypothèse d'un intermédiaire covalent ES' commun à S et S^* , qui peut-être un acyl enzyme par exemple².

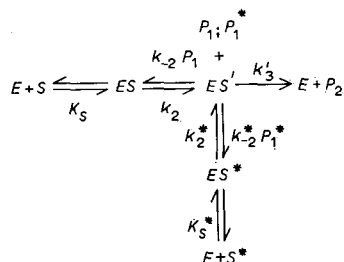


Schéma I

Dans ce schéma, l'indice "*" se rapporte au substrat et aux complexes formés lorsque l'intermédiaire covalent ES' réagit avec l'agent nucléophile P_1^* .

Par rapport aux schémas cinétiques précédemment proposés^{1,2}, S^* équivaut à P_3 et P_1^* à N .

Par exemple si S est un ester et N un alcool, S^* sera également un ester, et P_2 un acide.

Dans le Schéma I, on peut négliger $k_{-2}^*P_1^*$ en admettant par exemple que k_{-2} et k_{-2}^* sont du même ordre de grandeur et que P_1^* est très supérieur à P_1 (et à S).

On obtient ainsi à l'état stationnaire, les expressions de $-\frac{dS}{dt}$, $\frac{dS^*}{dt}$ et $\frac{dP_2}{dt}$ données dans l'appendice. Ces expressions vérifient la relation: $-\frac{dS}{dt} = \frac{dP_2}{dt} + \frac{dS^*}{dt}$. Pour $S \ll K_m$ et $S^* \ll K_m^*$, ces expressions se simplifient et peuvent se mettre sous la forme:

$$\frac{dA}{dt} = (k_{AB} + k_{AC}) A \quad (1)$$

$$\frac{dB}{dt} = k_{AB} A - k_{BC} B \quad (2)$$

$$\frac{dC}{dt} = k_{AC} A + k_{BC} B \quad (3)$$

Ces équations correspondent au schéma cinétique triangulaire:

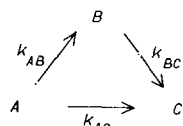


Schéma II

avec: $A = S$, substrat initial, $B = S^*$, substrat formé au cours de l'hydrolyse,

$C = P_2$, produit de la réaction commun à S et S^* . Les constantes k_{AB} , k_{AC} et k_{BC} étant définies par les relations:

$$k_{AB} = \frac{k_2 k_{-2}^* P_1^* E_t}{K_s (k_{-2}^* P_1^* + k_3')} \quad (4)$$

$$k_{AC} = \frac{k_2 k_3' E_t}{K_s (k_{-2}^* P_1^* + k_3')} \quad (5)$$

$$k_{BC} = \frac{k_2^* k_3' E_t}{K_s^* (k_{-2}^* P_1^* + k_3')} \quad (6)$$

Les conditions aux limites de ce système s'écrivent:

	A	B	C
$t = 0$	a	0	0
$t \neq 0$	$a - x$	y	z
$t = \infty$	0	0	a

Les Eqns. 1-3, peuvent alors se mettre sous la forme:

$$\frac{dx}{dt} = (k_{AB} + k_{AC}) (a - x) \quad (1')$$

$$\frac{dy}{dt} = k_{AB} (a - x) - k_{BC} y \quad (2')$$

$$\frac{dz}{dt} = k_{AC} (a - x) + k_{BC} y \quad (3')$$

La résolution de ce système d'équations conduit aux expressions suivantes pour $a - x$, y et z en fonction du temps, avec les conditions aux limites précédentes et pour $k_{AB} + k_{AC} \neq k_{BC}$:

$$a - x = a e^{-(k_{AB} + k_{AC}) t} \quad (7)$$

$$y = \frac{k_{AB} a}{k_{AB} + k_{AC} - k_{BC}} \left\{ e^{-k_{BC} t} - e^{-(k_{AB} + k_{AC}) t} \right\} \quad (8)$$

$$z = a \frac{k_{BC} - k_{AC}}{k_{AB} + k_{AC} - k_{BC}} \left\{ e^{-(k_{AB} + k_{AC}) t} - 1 \right\} - \frac{a k_{AB}}{k_{AB} + k_{AC} - k_{BC}} \left\{ e^{-k_{BC} t} - 1 \right\} \quad (9)$$

On voit immédiatement que si $k_{AC} \neq k_{BC}$ les cinétiques d'apparition du produit $P_2 (= C = z)$ ne seront plus d'ordre I pour $S \ll K_m$.

Discussion des Eqns. $z = f(t)$ et $y = g(t)$

I. Représentation $\log (a - z)/a$ en fonction de t . Cette représentation n'est évidemment plus linéaire. On a:

$$\log \frac{a - z}{a} = - \int_0^t k(t) dt \quad (10)$$

Il est cependant possible de calculer les deux valeurs limites de $k(t)$ pour $t \rightarrow 0$ et $t \rightarrow \infty$.

La dérivée de la transformée logarithmique de z , $\log (a - z)/a$, par rapport à t est égale à la valeur instantanée de $k(t)$, pente de la tangente à la courbe au temps t donné. L'expression de $k(t)$ se calcule aisément à partir de l'Eqn. 9 et de l'équation suivante définissant $k(t)$:

$$k(t) = - \frac{d}{dt} \log \frac{a-z}{a} \quad (11)$$

Quand $t \rightarrow 0$, on obtient:

$$\lim_{t \rightarrow 0} k(t) = k_{AC}$$

Quand $t \rightarrow \infty$, il vient:

$$\lim_{t \rightarrow \infty} k(t) = \begin{cases} k_{BC} & \text{si } k_{AB} + k_{AC} > k_{BC} \\ k_{AB} + k_{AC} & \text{si } k_{AB} + k_{AC} < k_{BC} \end{cases}$$

Dans le cas où $k_{AB} + k_{AC} > k_{BC}$, les deux valeurs limites de $k(t)$ correspondent respectivement aux constantes complexes k_{AC} et k_{BC} données par les Eqns. 5 et 6 et qui sont les constantes complexes d'hydrolyse du substrat initial S et du substrat S* formé par le fait de la compétition nucléophile entre l'eau et ses analogues vis à vis de l'entité ES'.

Il est donc alors possible, en théorie du moins, de calculer pour un système du type précédent, les constantes cinétiques k_{AC} et k_{BC} au moyen d'une représentation $\log (a-z)/a$ en fonction de t .

2. *Temps pour lequel la concentration de l'intermédiaire B est maxima.* Il peut être intéressant de connaître ce temps si l'on cherche à isoler et à identifier chimiquement cet intermédiaire. Soit t_m le temps cherché:

$$\left(\frac{dy}{dt} \right)_{t_m} = 0 \quad (12)$$

On obtient pour t_m l'expression

$$t_m = \frac{1}{k_{AB} + k_{AC} - k_{BC}} \log \frac{k_{AB} + k_{AC}}{k_{BC}} \quad (13)$$

3. *Temps pour lequel la vitesse d'apparition du produit C ($= P_2$) est maxima* (si $k_{BC} > k_{AC}$). Soit t_m' le temps cherché: (abscisse du point d'inflexion de la courbe $z = f(t)$)

$$\left(\frac{d^2z}{dt^2} \right)_{t=t_m'} = 0 \quad (14)$$

On obtient pour t_m' :

$$t_m' = \frac{1}{k_{AB} + k_{AC} - k_{BC}} \log \frac{(k_{BC} - k_{AC})(k_{AB} + k_{AC})^2}{k_{BC}^2 \cdot k_{AB}} \quad (15)$$

En introduisant cette valeur de t dans l'équation $dz/dt = f(t)$, on peut calculer l'incrément maximum de la vitesse d'hydrolyse correspondant à la formation de l'intermédiaire B.

4. Les Schémas cinétiques 1 et 2 ainsi que les expressions qui en découlent lorsque $K_m \gg S$ et $K_m^* \gg S^*$ devraient pouvoir être appliquées à des phénomènes de transesterification³⁻⁵, de transpeptidation⁶⁻⁸ et de transamidation intervenant au cours d'hydrolyses enzymatiques.

Exemples d'application: étude d'une série de transesterifications du type: $LEE \rightarrow LXE$, X étant un radical alcoyle quelconque.

MATÉRIEL ET MÉTHODE (voir réf. 2)

Nous avons utilisé la trypsine (EC 3.4.4.4) Worthington deux fois cristallisée et conservée dans 50% environ de sulfate de magnésium. La trypsine est purifiée par NaCl molaire. Les études cinétiques ont été faites par la méthode potentiométrique à pH constant. La LEE et la LME ont été préparées suivant les méthodes usuelles. Les alcools sont des produits Prolabo, ils ont été redistillés avant utilisation.

RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX ET DISCUSSION

I. Transesterification dans le système LEE-trypsine-méthanol-H₂O.

Nous avons montré précédemment² que le rapport k_2/K_S de la LEE était environ deux fois plus faible que celui de la LME. Si en cours de l'hydrolyse tryptique de la LEE en présence de méthanol, il se forme des quantités importantes de LME, on doit observer une activation au cours de la réaction pour $S \ll K_m$. Cette activation a été effectivement observée, surtout aux fortes concentrations en mé-

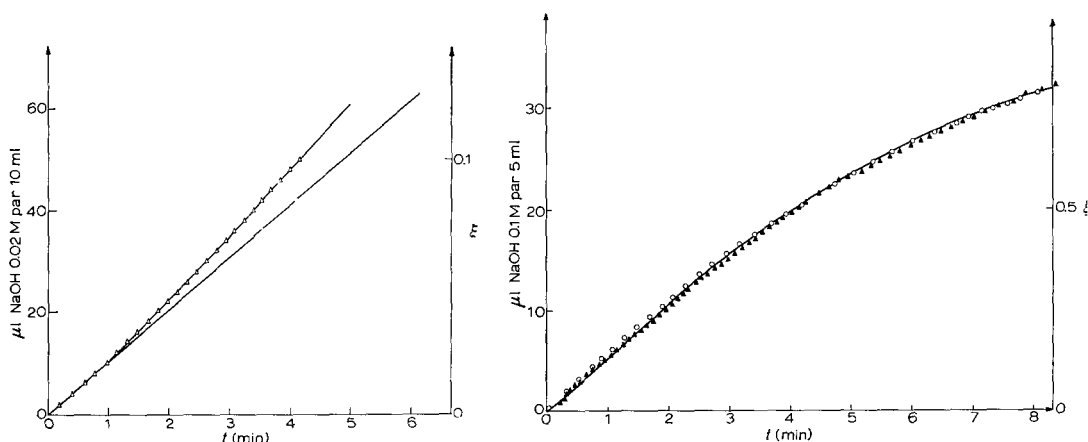


Fig. 1. Cinétique de la transesterification $LEE \rightarrow LME$, catalysée par la trypsine avec $S \ll K_m$. Phase initiale d'activation. Les points sont expérimentaux, la courbe calculée à partir des Eqns. 4-6 et 9 et des valeurs numériques précédemment obtenues (Tableau II, ref. 3). La pente de la droite mesure la vitesse initiale de la réaction. LEE, 1 mM (pH 4.80); $CaCl_2$, 25 mM; temp. = 25°; méthanol, 3.67 M; trypsine, 7.4 μM .

Fig. 2. Cinétique de la transesterification $LEE \rightarrow LME$, les points sont expérimentaux et correspondent à 2 expériences consécutives; la courbe est calculée à partir des Eqns. 4-6 et 9, et des valeurs numériques précédemment obtenues (Tableau II, ref. 3). LEE, 0.8 mM (pH 4.80); $CaCl_2$, 25 mM; temp. 25°; méthanol, 1.36 M; trypsine, 7.4 μM .

thanol. La Fig. 1 montre la phase initiale d'activation lors de l'hydrolyse trypsique de la LEE en présence de méthanol.

Dans ces conditions, pour déterminer une vitesse initiale qui ait un sens, il est absolument nécessaire d'effectuer la mesure au tout début de la réaction (pour moins de 2% de réaction, soit un degré d'avancement $\xi < 0.02$) (réf. 2).

La Fig. 2 montre l'allure globale d'une cinétique d'hydrolyse avec transesterification. La cinétique n'est plus du tout d'ordre I, comme l'indique la représentation $\log (a - z)/a$ en fonction de t (Fig. 3).

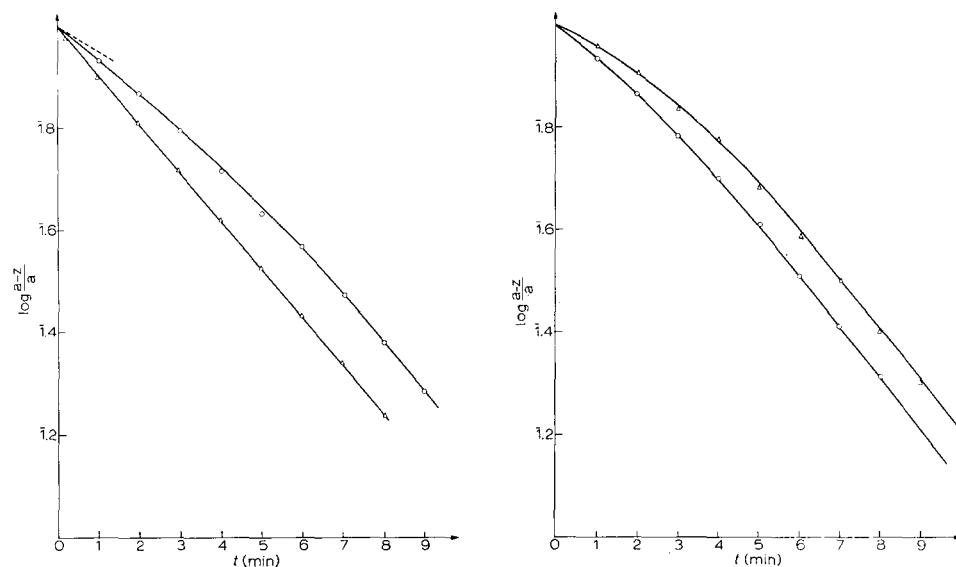


Fig. 3. Cinétique de la transesterification LEE \rightarrow LME. Transformée logarithmique: $\log (a - z)/a$ en fonction de t (voir texte). \circ , LEE; \triangle , LME. Conditions strictement identiques voir la figure précédente.

Fig. 4. Cinétique de transesterification en présence de butanol et de pentanol. Transformée logarithmique $\log (a - z)/a$ en fonction de t (voir texte). \triangle , pentanol, 0.37 M; \circ , butanol, 0.437 M. LEE, 0.8 mM (pH 4.80); CaCl_2 , 25 mM; temp. 25°; trypsine, 11.3 μM .

Par contre, la cinétique d'hydrolyse de la LME dans les mêmes conditions est rigoureusement d'ordre I (Fig. 3).

Conformément à la discussion de l'Eqn. 9, les pentes des deux courbes sont identiques à la fin de la réaction. Ceci indique que pour un degré d'avancement suffisant de la réaction la transformation LEE \rightarrow LME est pratiquement complète dans nos conditions ($k_4 N \sim 4 k'_3$).

Il est donc possible de calculer à partir de telles cinétiques, la constante de vitesse correspondant à l'hydrolyse de l'entité formée au cours de la transesterification (LME ici).

Ainsi, à partir d'un seul ester, il est possible d'estimer les paramètres cinétiques d'autres esters du même acide sans avoir besoin de les synthétiser, à condition bien entendu, de disposer de l'alcool correspondant.

II. Transesterification avec d'autres alcools

Nous avons également obtenu des cinétiques d'activation avec d'autres alcools aliphatiques normaux primaires, le butanol et le pentanol ainsi qu'avec l'alcool benzylique (Figs. 4 et 5).

Nos résultats indiquent clairement que les esters formés par la lysine avec ces alcools sont hydrolysés plus rapidement par la trypsine que la LEE, dans des conditions où $K_m \gg S$.

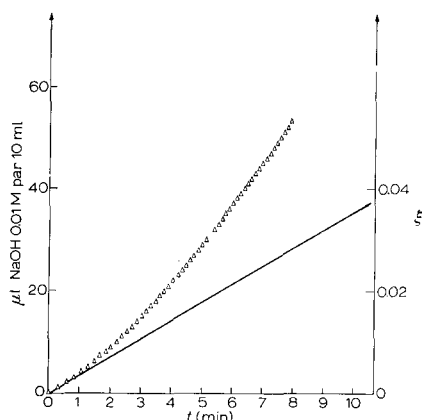


Fig. 5. Hydrolyse trypsique de la LEE en présence d'alcool benzylique. La transesterification LEE \rightarrow LBzE se traduit par une activation très importante ($>100\%$). LEE, 1 mM (pH 4.80); CaCl_2 , 25 mM; temp. 25° ; alcool benzylique, 0.194 M; trypsine, 1.22 μM .

Ceci est assez surprenant si on se réfère aux vitesses d'hydrolyse alcaline de divers esters acétiques aliphatiques pour lesquels aucun effet de ce type n'est observé^{9,10}.

Ce phénomène semble donc caractéristique de l'hydrolyse enzymatique; il peut probablement être interprété en termes d'interactions non covalentes enzyme-substrat.

Nos résultats sont en accord avec les travaux de GLAZER qui a pu mettre en évidence de telles transesterifications en isolant l'intermédiaire formé par électrophorèse ou chromatographie. Cet auteur a d'ailleurs montré que de telles transesterifications³ s'observent également avec la chymotrypsine (EC 3.4.4.5), la subtilisine⁴ (EC 3.4.4.16) et la papaïne⁵ (EC 3.4.4.10).

APPENDICE

La résolution du système décrit par le Schéma I à l'état stationnaire conduit aux expressions suivantes pour

$$-\frac{dS}{dt}, \frac{dS^*}{dt} \text{ et } \frac{dP_2}{dt} :$$

$$\begin{aligned}
 -\frac{dS}{dt} &= \frac{\frac{k_2 (k_{-2}^* P_1^* + k_3') E_t}{k_2 + k_2^* \frac{K_s}{K_s^*} \frac{S^*}{S} + k_{-2}^* P_1^* + k_3'}}{1 + \frac{K_s}{S} \frac{k_{-2}^* P_1^* + k_3'}{k_2 + k_2^* \frac{K_s}{K_s^*} \frac{S^*}{S} + k_{-2}^* P_1^* + k_3'}} \left(1 + \frac{S^*}{K_s^*} \right) \\
 \frac{dS^*}{dt} &= \frac{\frac{k_2 k_{-2}^* P_1^* - k_2^* k_3' \frac{K_s}{K_s^*} \frac{S^*}{S}}{k_2 + k_2^* \frac{K_s}{K_s^*} \frac{S^*}{S} + k_{-2}^* P_1^* + k_3'}}{1 + \frac{K_s}{S} \frac{k_{-2}^* P_1^* + k_3'}{k_2 + k_2^* \frac{K_s}{K_s^*} \frac{S^*}{S} + k_{-2}^* P_1^* + k_3'}} \left(1 + \frac{S^*}{K_s^*} \right) \\
 \frac{dP_2}{dt} &= \frac{\frac{k_3' \left(k_2 + k_2^* \frac{K_s}{K_s^*} \frac{S^*}{S} \right)}{k_2 + k_2^* \frac{K_s}{K_s^*} \frac{S^*}{S} + k_{-2}^* P_1^* + k_3'} E_t}{1 + \frac{K_s}{S} \frac{k_{-2}^* P_1^* + k_3'}{k_2 + k_2^* \frac{K_s}{K_s^*} \frac{S^*}{S} + k_{-2}^* P_1^* + k_3'}} \left(1 + \frac{S^*}{K_s^*} \right)
 \end{aligned}$$

RÉSUMÉ

La compétition nucléophile entre l'eau et ses analogues dans les réactions d'hydrolyse enzymatique peut se traduire par l'apparition de nouveaux produits hydrolysables par l'enzyme. Les produits ainsi formés peuvent perturber le cours de la cinétique d'hydrolyse du substrat initial.

A partir d'un schéma général mettant en jeu un intermédiaire covalent comme l'acylenzyme, on obtient des équations simples lorsque les concentrations du substrat initial et des espèces formées par compétition nucléophile sont petites devant leurs constantes de Michaelis apparentes respectives.

Ces équations ont été vérifiées dans le cas particulier de l'hydrolyse trypsique de l'ester éthylique de la lysine en présence de divers alcools.

L'analyse de ces cinétiques montre que le paramètre k_2/K_s d'hydrolyse trypsique des esters benzylique, butylique et pentylique de la lysine est supérieur à celui de son ester éthylique.

REMERCIEMENTS

Ce travail a bénéficié d'une subvention du Centre National de la Recherche Scientifique (R.C.P. 23).

Nous remercions Monsieur BRICAS, Maître de Recherche, grâce auquel nous avons pu réaliser la synthèse de certains substrats.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 M. L. BENDER, G. E. CLEMENT, C. R. GUNTER ET F. J. KEZDY, *J. Am. Chem. Soc.*, 86 (1964) 3697.
- 2 F. SEYDOUX ET J. YON, *J. Europ. Biochem.*, sous presse.
- 3 A. N. GLAZER, *J. Biol. Chem.*, 240 (1965) 1135.
- 4 A. N. GLAZER, *J. Biol. Chem.*, 241 (1966) 681.
- 5 A. N. GLAZER, *J. Biol. Chem.*, 241 (1966) 3811.
- 6 R. B. JOHNSTON, M. J. MYCEK ET J. S. FRUTON, *J. Biol. Chem.*, 187 (1950) 205.
- 7 S. G. WALEY ET J. WATSON, *Biochem. J.*, 57 (1954) 529.
- 8 M. SELA ET E. KATCHALSKI, *Advan. Protein. Chem.*, XIV (1959) 391.
- 9 L. P. HAMMET, *Phys. Org. Chem.*, 211 (1940).
- 10 C. K. HANCOCK, B. Y. YAGER, C. P. FALLS ET J. O. SCHRECK, *J. Am. Chem. Soc.*, 85 (1963) 1297.

Biochim. Biophys. Acta, 146 (1967) 544-552