



УДК 577.156

## РОЛЬ СТРУКТУРНЫХ ФАКТОРОВ В РЕАКЦИЯХ ОЛИГОПЕПТИДНЫХ СУБСТРАТОВ И ИНГИБИТОРОВ С $\alpha$ -ХИМОТРИПСИНОМ

*Клессов А. А., Цетлин В. И.*

*Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова;*

*Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина  
Академии наук СССР, Москва*

Определены значения констант скоростей промежуточных стадий (ацилирования и деацилирования) для гидролиза сложных эфиров олигопептидов под действием  $\alpha$ -химотрипсина. Константы скоростей деацилирования не зависят от строения, длины цепи или аминокислотной последовательности N-ацильного фрагмента и определяются только строением боковой цепи «первичного» аминокислотного остатка. Анализ энергетических диаграмм реакций  $\alpha$ -химотрипсина с диастереомерными субстратами позволили оценить эффективность фермент-субстратных взаимодействий в основном и переходных состояниях реакции и прийти к выводу, что гидрофобное взаимодействие «вторичного» аминокислотного остатка с активным центром фермента является в основном непродуктивным и нарушается при образовании переходного состояния реакции ацилирования. Обнаружены принципиальные различия в характере связывания  $\alpha$ -химотрипсина с амидными (метиламидными) субстратами или ингибиторами, с одной стороны, и сложноэфирными — с другой.

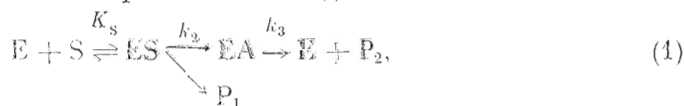
Субстратная специфичность  $\alpha$ -химотрипсина интенсивно изучается на протяжении последних 30 лет (см. обзоры [1—3]). В определенной степени это обусловлено тем, что  $\alpha$ -химотрипсин представляет собой фактически «модельный» фермент в физико-химической энзимологии (см. [4]) и взаимоотношения между структурой и реакционной способностью его субстратов часто используют для установления общих принципов ферментативного катализа [4, 5]. Тем не менее большое количество кинетических исследований  $\alpha$ -химотрипсина наряду с изучением пространственной структуры как самого фермента, так и его комплексов с квазисубстратами и ингибиторами до сих пор не выявило четких количественных закономерностей между структурой субстратов и кинетическими параметрами их гидролиза. Отчасти это объясняется многостадийностью ферментативной реакции (рентгеноструктурный анализ в лучшем случае дает информацию о характере фермент-субстратных взаимодействий в комплексе Михаэлиса) и необходимостью количественного определения констант скоростей промежуточных стадий для адекватного описания механизма ферментативного катализа. Далее, в качестве модельных субстратов  $\alpha$ -химотрипсина часто используют эфиры аминокислот, в то время как его природными субстратами являются белки и пептиды. Наконец, характер фермент-субстратных взаимодействий в случае природных субстратов довольно сложен, что нашло отражение в классификации специфичности  $\alpha$ -химотрипсина на первичную, вторичную и третичную [6]. Согласно этой терминологии, первичная специфичность проявляется по отношению к боковой

цепи остатка аминокислоты, карбоксильная группа которой образует гидролизуемую связь. Вторичная специфичность отражает влияние аминокислотных остатков пептидной цепи, находящихся сравнительно недалеко от гидролизуемой связи. Наконец, третичная специфичность фермента проявляется в его реакциях с белковыми субстратами и отражает влияние конформации белковой глобулы субстрата на кинетику гидролиза чувствительных к расщеплению связей.

Следует отметить, что кинетические данные по изучению третичной специфичности  $\alpha$ -химотрипсина в литературе практически отсутствуют. Наиболее изучена первичная специфичность фермента на примере гидролиза сложэфирных производных N-ацилированных L-аминокислот [7—9]. Вторичная специфичность  $\alpha$ -химотрипсина изучалась сравнительно мало не только при гидролизе полипептидных субстратов, но даже в реакциях фермента с простыми олигопептидными производными (см. [10—14]). Очевидно, однако, что изучение взаимосвязи между структурой и реакционной способностью в реакциях олигопептидных субстратов (или ингибиторов) — важная ступень для понимания особенностей ферментативного гидролиза полипептидов и белков. Исходя из этого представляется важным систематическое изучение реакций  $\alpha$ -химотрипсина с олигопептидами и последующая интерпретация полученных кинетических и равновесных параметров на основе кристаллографической модели активного центра фермента.

В настоящей работе в качестве субстратов и ингибиторов  $\alpha$ -химотрипсина исследовано около 30 сложэфирных, амидных и метиламидных производных аминокислот и олигопептидов. Субстратные и ингибиторные серии состояли из соединений: а) различной длины (от аминокислот до тетрапептидов); б) содержащих ароматические аминокислоты, специфичные по отношению к  $\alpha$ -химотрипсину, в различном положении олигопептидной цепи; в) содержащих в олигопептидной цепи остатки различной гидрофобности; г) отличающихся S-концевой функцией (амиды, метиламиды, гидразиды, сложные эфиры); д) являющихся энантио- или диастереомерами. Целью работы было выяснение особенностей вторичной специфичности и стереоспецифичности  $\alpha$ -химотрипсина на отдельных стадиях ферментативного катализа. Постановка такой проблемы оказалась возможной благодаря разработанным в последнее время методам определения констант скоростей промежуточных стадий и истинных констант связывания субстратов в стационарном режиме ферментативной реакции (см. [15]).

Известно, что реакции гидролиза, катализируемые  $\alpha$ -химотрипсином, протекают в три кинетически различные стадии:



где EA — ацилферментное промежуточное соединение,  $K_s$  — истинная константа Михаэлиса,  $k_2$  и  $k_3$  — константы скоростей ацилирования и деацилирования соответственно. Экспериментально определяемая скорость стационарной ферментативной реакции при условии избытка субстрата по сравнению с ферментом в этом случае находится по уравнению

$$v = \frac{k_{\text{кат}} [E]_0 [S]}{K_{m(\text{каж})} + [S]}, \quad (2)$$

где каталитическая константа  $k_{\text{кат}}$  и кажущаяся константа Михаэлиса  $K_{m(\text{каж})}$  связаны со значениями «индивидуальных» констант соотношениями

$$k_{\text{кат}} = \frac{k_2 k_3}{k_2 + k_3}, \quad (3)$$

$$K_{m(\text{каж})} = K_s \frac{k_3}{k_2 + k_3}. \quad (4)$$

Из выражения (3) следует, что в зависимости от соотношения «индивидуальных» констант  $k_2$  и  $k_3$  каталитическая константа может принимать крайние значения:  $k_{кат} = k_2$  (при  $k_2 \ll k_3$ ) или  $k_{кат} = k_3$  (при  $k_2 \gg k_3$ ).

Как нами было показано ранее [7], добавление в реакционную систему 1,4-бутандиола и выяснение характера его ингибирующего действия позволяют делать заключения о природе лимитирующей скорости стадии ферментативной реакции (ацилирование или деацилирование). Так, если в реакции гидролиза под действием  $\alpha$ -химотрипсина 1,4-бутандиол проявляет полностью конкурентное ингибирование, то лимитирующей скоростью стадией реакции будет деацилирование ( $k_2 \gg k_3$ ). Если 1,4-бутандиол оказывается полностью неконкурентным ингибитором, то лимитирующей скоростью стадией становится ацилирование ( $k_2 \ll k_3$ ). Наконец, смешанный характер ингибирования 1,4-бутандиолом указывает на сравнимые по величине константы скоростей ацилирования и деацилирования и позволяет найти их численные значения наряду с величиной истинной константы Михаэлиса [7, 15].

*Вторичная специфичность  $\alpha$ -химотрипсина.* При изучении метиловых эфиров ацетил-*L*-тирозина и тирозилсодержащих олигопептидов в качестве субстратов  $\alpha$ -химотрипсина (табл. 1, соединения (I—VII)) было найдено, что константы скорости деацилирования ( $k_3$ ) для этих соединений одинаковы и не зависят от строения, длины цепи или последовательности аминокислотных остатков N-ацильного фрагмента. Этот вывод справедлив и для производных другой специфической для данного фермента аминокислоты, *L*-фенилаланина (соединения (VIII), (IX) в табл. 1), и полностью согласуется с выводом, сделанным нами ранее [8, 16] при изучении ферментативного гидролиза N-ацилированных производных *L*-аминокислот. Таким образом, обобщая полученные данные, можно заключить, что характер связывания N-ацильного заместителя субстрата в ацилферменте сохраняется в переходном состоянии реакции деацилирования, причем это правило действительно как для простых производных аминокислот, так и для олигопептидных субстратов. Другими словами, N-ацильный заместитель субстрата не вносит вклада в специфичность  $\alpha$ -химотрипсина на стадии деацилирования, которая определяется только строением боковой цепи первичного аминокислотного остатка.

Данные табл. 1 свидетельствуют, что наиболее «оптимальным» субстратом  $\alpha$ -химотрипсина в рассматриваемом ряду является метиловый эфир N-замещенного трипептида (VI), имеющий самое высокое значение  $k_{кат}/K_m$  (как). Дальнейшее удлинение пептидной цепи субстрата (до тетрапептида (VII)) приводит к уменьшению этого отношения более чем в 3 раза. Полученные данные согласуются с результатами рентгеноструктурного анализа [17], согласно которым «оптимальным» субстратом химотрипсина также является N-замещенный трипептид, образующий три водородные связи и два гидрофобных контакта с ферментом. Из кристаллографической модели следует, что N-замещенный четвертый остаток олигопептидной цепи субстрата имеет стерические контакты с боковой цепью триптофана-172 [17—19], что приводит к разрушению водородных связей между третьим аминокислотным остатком в цепи субстрата и полипептидной цепью фермента.

Необходимо отметить, что авторы [17—20] рассматривают кристаллографическую модель химотрипсина, алкилированного хлорметилкетон-пептидами, как модель ацилферментного промежуточного соединения. Таким образом, согласно выводам рентгеноструктурного анализа, водородные связи и гидрофобные контакты, образованные между олигопептидной цепью субстрата и ферментом, должны быть благоприятны для реакции *деацилирования*. Наши данные, напротив, свидетельствуют о том, что константа скорости деацилирования не зависит от строения, длины цепи или последовательности аминокислотных остатков олигопептидного фрагмента субстрата (табл. 1) и контакты между олигопептидной частью суб-

Таблица 1

Кинетические параметры гидролиза сложных эфиров N-ацелированных производных аминокислот и пептидов под действием  $\alpha$ -химотрипсина

| Субстрат *              | Обозначение в тексте | $k_{\text{кат}}, \text{с}^{-1}$ | $K_m(\text{каж}), 10^6, \text{М}$ | $k_{\text{кат}}/K_m(\text{каж}) \cdot 10^{-6}, \text{М}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$ | $k_5, \text{с}^{-1}$ | $k_3, \text{с}^{-1}$ | $K_S \cdot 10^6, \text{М}$ | $k_2/k_3$   |
|-------------------------|----------------------|---------------------------------|-----------------------------------|---|----------------------|----------------------|----------------------------|-------------|
| Ac-Tyr-OMe **           | (I)                  | 212 ± 8                         | 45,7 ± 1,8                        | 0,46 ± 0,01   | > 4000               | 220 ± 20             | > 1900                     | > 20        |
| Boc-Gly-Tyr-OMe         | (II)                 | 227 ± 7                         | 22,7 ± 0,4                        | 1,00 ± 0,03   | > 4000               | 220 ± 20             | > 500                      | > 20        |
| Boc-Leu-Gly-Tyr-OMe     | (III)                | 218 ± 5                         | 7,9 ± 0,3                         | 2,8 ± 0,1   | > 4000               | 220 ± 20             | > 180                      | > 20        |
| Ac-Leu-Gly-Tyr-OMe      | (IV)                 | 215 ± 8                         | 5,8 ± 0,3                         | 3,7 ± 0,2   | > 4000               | 220 ± 20             | > 120                      | > 20        |
| Ac-Leu-Tyr-OMe          | (V)                  | 85,1 ± 0,9                      | 2,2 ± 0,1                         | 3,9 ± 0,2   | 141 ± 11             | 220 ± 20             | 3,6 ± 0,5                  | 0,6 ± 0,1   |
| Boc-Gly-Leu-Tyr-OMe     | (VI)                 | 78,2 ± 0,9                      | 1,44 ± 0,09                       | 5,6 ± 0,4   | 121 ± 8              | 220 ± 20             | 2,2 ± 0,3                  | 0,5 ± 0,1   |
| Boc-Gly-Gly-Leu-Tyr-OMe | (VII)                | 44,3 ± 1,8                      | 2,79 ± 0,06                       | 1,6 ± 0,1   | 56 ± 5               | 220 ± 20             | 3,5 ± 0,5                  | 0,25 ± 0,05 |
| Ac-Phe-OMe              | (VIII)               | 97,1                            | 93                                | 0,11  | 796                  | 141                  | 763                        | 7,2         |
| Ac-Ala-Phe-OMe          | (IX)                 | 57,3                            | 29,6                              | 0,19  | 176                  | 85                   | 91                         | 2,4         |

\* Все аминокислотные остатки L-конфигурации.

\*\* Для гидролиза Ac-Tyr-OMe  $k_{\text{кат}} = 152 \text{ с}^{-1}$ ,  $K_m(\text{каж}) = 66,3 \cdot 10^{-7} \text{ М}$ ,  $k_2 = 5000 \text{ с}^{-1}$ ,  $k_3 = 200 \text{ с}^{-1}$ ,  $K_S = 1720 \cdot 10^{-5} \text{ М}$  [7].

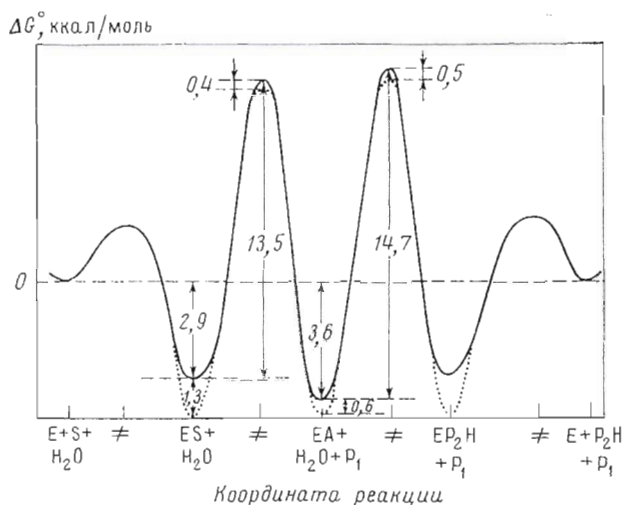


Рис. 1. Изменение стандартной свободной энергии по координате реакции для гидролиза Ac-L-Phe-OMe (сплошная линия) и Ac-L-Ala-L-Phe-OMe (пунктир), катализируемого  $\alpha$ -химотрипсином. Стандартные состояния соответствуют 1 M концентрациям, активность воды принята равной единице. Расчеты проведены для неионизированных форм продуктов

страта и ферментом, обнаруженные методами рентгеноструктурного анализа, существенны только для связывания субстрата с ферментом и реакции ацилирования.

Как видно из табл. 1, в случае олигопептидных субстратов значительное влияние на величины констант скоростей ацилирования ( $k_2$ ) и констант связывания ( $K_s$ ) оказывает последовательность аминокислот в пептидной цепи. Так, для Boc-Leu-Gly-Tyr-OMe(III) и Boc-Gly-Leu-Tyr-OMe(VI) состав олигопептидной цепи в целом одинаков, но последний субстрат гораздо эффективнее связывается с  $\alpha$ -химотрипсином. Из полученных данных видно, что основное влияние на значения  $k_2$  и  $K_s$  оказывает природа вторичного остатка субстрата (связанного с остатком *L*-тирозина). Эти результаты можно интерпретировать в рамках кристаллографической модели, согласно которой неполярная боковая цепь вторичного остатка олигопептидного субстрата осуществляет гидрофобное взаимодействие с боковой цепью остатка изолейцина-99 или триптофана-215 химотрипсина. Это связывание должно быть в значительной степени непродуктивным, так как приводит к параллельному уменьшению  $k_2$  и  $K_s$  (табл. 1).

В последнее время в литературе термин «непродуктивное связывание» часто употребляют при анализе статических моделей ферментов (в частности, построенных по кристаллографическим данным), подразумевая под этим только физическую ориентацию субстрата в активном центре фермента. Однако никакой способ связывания в основном состоянии фермент-субстратного комплекса нельзя априори назвать продуктивным, так как неизвестно, реализуется ли данный способ связывания в переходном состоянии ферментативной реакции. Необходимо подчеркнуть, что *продуктивное связывание* — это способ связывания субстрата с ферментом, который сохраняется в переходном состоянии реакции. Если при образовании фермент-субстратного комплекса образуются дополнительные связи (водородные, ионные, гидрофобные взаимодействия и т. д.), которые не реализуются в переходном состоянии, то они должны быть разрушены при образовании активированного комплекса. На это должна быть затрачена часть свободной энергии реакции. В результате улучшение связывания будет компенсироваться уменьшением константы скорости ферментативной реакции, т. е. на опыте будет наблюдаться параллельное уменьшение

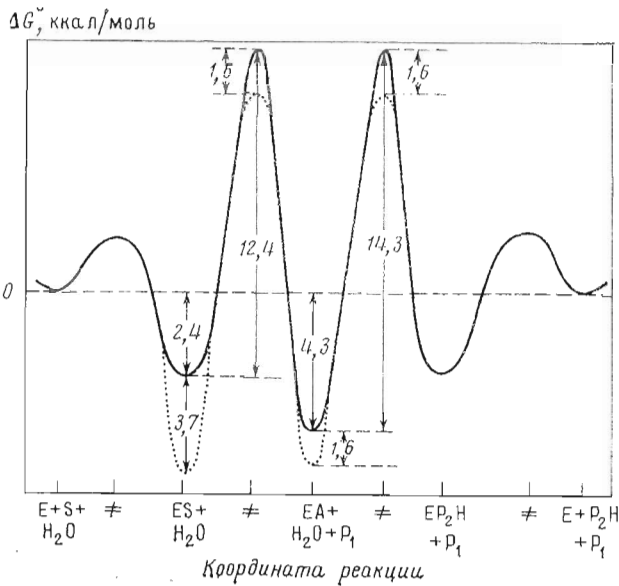


Рис. 2. Изменение стандартной свободной энергии по координате реакции для гидролиза Ас-*L*-Тир-ОEt (сплошная линия) и Ас-*L*-Leu-*L*-Тир-ОMe (пунктир), катализируемого  $\alpha$ -химотрипсином. Условия построения диаграммы — в подписи к рис. 1

$K_s$  и  $k_2$ . Это положение иллюстрируется рис. 1 и 2, где приведены энергетические диаграммы реакций ферментативного гидролиза.

Из рис. 1 видно, что при переходе от производного *L*-фенилаланина к производному дипептида *L*-аланил-*L*-фенилаланина уровень стандартной свободной энергии фермент-субстратного комплекса существенно уменьшается (1,3 ккал/моль). Согласно работам [17—20], взаимодействие вторичного аминокислотного остатка с ферментом может быть только гидрофобным, так как карбоксильная группа и аминогруппа амидной связи между ацетильной группой и вторичным остатком субстрата экспонированы в раствор и не образуют водородных связей с ферментом. О гидрофобности данного взаимодействия говорит также резкое улучшение константы связывания субстратов при переходе от *N*-ацетилзамещенных аминокислот к *N*-хлорацетил- и далее к *N*-бензоилзамещенным субстратам [7, 8]. Таким образом, взаимодействие с ферментом двух углеродных атомов  $C_\alpha$ — $C_\beta$  остатка аланина субстрата сопровождается выигрышем свободной энергии, равным 1,3 ккал/моль. Эта величина хорошо согласуется с результатами работы [21], согласно которым прикремент свободной энергии для перехода одного углеродного атома алифатической цепи из воды в неводную (гидрофобную) среду равен  $-0,7$  ккал/моль. Другими словами, при образовании фермент-субстратного комплекса гидрофобный фрагмент остатка аланина дипептидного субстрата Ас-Ala-Phe-ОMe полностью уходит от контакта с водой, взаимодействуя с неполярными боковыми цепями остатков  $\alpha$ -химотрипсина (изолейцин-99, триптофан-215 [17—20]).

Этот вывод подтверждается при рассмотрении энергетической диаграммы гидролиза производных *L*-тирозина и *L*-лейцил-*L*-тирозина (рис. 2). В этом случае переход к дипептидному субстрату сопровождается уменьшением свободной энергии фермент-субстратного комплекса на 3,7 ккал/моль, что соответствует переходу пяти углеродных атомов остатка лейцина из воды в неполярное окружение активного центра фермента. Однако в отличие от гидрофобного взаимодействия боковой цепи первичного аминокислотного остатка субстрата (погруженной в гидрофобный

Кинетические параметры реакции  $\alpha$ -химотрипсина с хлорметилкетонпептидами и олигопептидными субстратами

| Ингибитор                         | $k_{\text{инакт}}^*$ ,<br>М <sup>-1</sup> .с <sup>-1</sup> | Субстрат            | $k_{\text{кат}}/K_m \cdot 10^{-3}$ ,<br>М <sup>-1</sup> .с <sup>-1</sup> |
|-----------------------------------|--|---------------------|--|
| Ac-PheCH <sub>2</sub> Cl          | 0,15   | Ac-Tyr-OMe          | 0,46   |
| Ac-Gly-PheCH <sub>2</sub> Cl      | 0,13   | Boc-Gly-Tyr-OMe     | 1,00   |
| Ac-Leu-PheCH <sub>2</sub> Cl      | 0,32   | Ac-Leu-Tyr-OMe      | 3,9  |
| Boc-Ala-Gly-PheCH <sub>2</sub> Cl | 0,33   | Ac-Leu-Gly-Tyr-OMe  | 3,7  |
| Boc-Gly-Leu-PheCH <sub>2</sub> Cl | 1,29   | Boc-Gly-Leu-Tyr-OMe | 5,6  |

\* Константа скорости второго порядка инактивации  $\alpha$ -химотрипсина под действием хлорметилкетонпептидов [19].

\*\* Константа скорости второго порядка гидролиза олигопептидов под действием  $\alpha$ -химотрипсина (наши данные).

Таблица 3

Значения кинетических и равновесных параметров гидролиза метиловых эфиров L — D-аланина под действием  $\alpha$ -химотрипсина

Определение «элементарных» констант проведено с использованием 1,4-бутадиола как дополнительного нуклеофильного агента (см. текст)

| Субстрат           | Обозначение<br>в тексте | $k_2$ , с <sup>-1</sup> | $K_m \cdot 10^3$ ,<br>М | $k_{\text{кат}}/K_m(\text{кат})$ ,<br>М <sup>-1</sup> .с <sup>-1</sup> |
|--------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|--|
| Ac-D-Ala-L-Ala-OMe | (X)                     | 0,0098 *                | 66,7                    | 0,147  |
| Ac-D-Phe-L-Ala-OMe | (XI)                    | 0,0036 *                | 6,13                    | 0,587  |
| Ac-D-Val-L-Ala-OMe | (XII)                   | 0,0022 *                | 83                      | 0,0265   |
| Ac-L-Ala-OMe       | (XIII)                  | 2,27                    | 1270                    | 1,79   |
| Bz-L-Ala-OMe       | (XIV)                   | 0,34 *                  | 11                      | 30,9   |
| Ac-D-Ala-OMe **    | (XV)                    | 0,091                   | —                       | —  |
| Bz-D-Ala-OMe **    | (XVI)                   | 0,01                    | 3,3                     | 3,0  |

\*  $k_2 \ll k_3$ .

\*\* Из работы [46].

«карман» активного центра химотрипсина), которое является продуктивным и полностью реализуется в переходном состоянии ферментативной реакции [8, 9], гидрофобное взаимодействие вторичного остатка в значительной степени нарушается при образовании активированного комплекса в реакции ацилирования (рис. 1, 2) и, следовательно, в основном непродуктивно. Подобный вывод невозможно сделать на основании данных рентгеноструктурного анализа, но он очевиден при рассмотрении «динамической» модели ферментативной реакции в рамках теории переходного состояния. Дополнительные взаимодействия вторичного аминокислотного остатка дицептида (по-видимому, гидрофобные), частично стабилизирующие переходное состояние реакции и приводящие к некоторому увеличению константы  $k_{\text{кат}}/K_m(\text{кат})$ , полностью сохраняются в ацилферментном соединении и далее в переходном состоянии реакции деацилирования. Этот эффект и приводит к постоянному значению констант скоростей деацилирования независимо от строения ацильной части субстрата. Именно в этом смысле вторичные взаимодействия олигопептидной цепи субстрата с ферментом не являются существенными в реакции деацилирования в отличие от выводов рентгеноструктурного анализа химотрипсина.

Кинетические данные, полученные в настоящей работе, удовлетворительно коррелируют с данными по кинетике инактивации химотрипсина соответствующими хлорметилкетонпептидами (табл. 2), указывая на сходство вторичных взаимодействий фермента с данными субстратами и ингибиторами. Этот вывод важен для оценки применимости данных рентгеноструктурного анализа к изучению специфичности действия  $\alpha$ -химотрип-

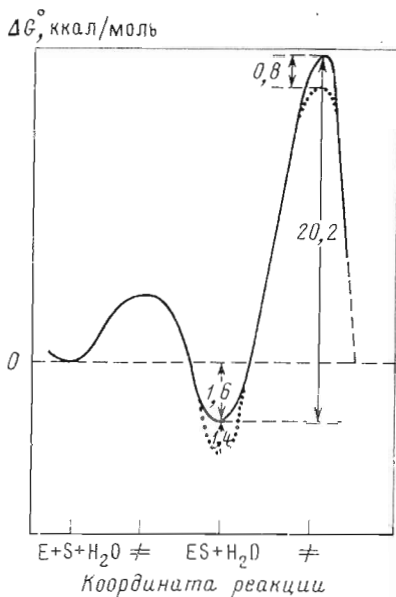


Рис. 3. Изменение стандартной свободной энергии по координате реакции для гидролиза  $\text{Ac-D-Ala-L-Ala-OMe}$  (сплошная линия) и  $\text{Ac-D-Phe-L-Ala-OMe}$  (пунктир), катализируемого  $\alpha$ -химотрипсином. Условия построения диаграммы — в подписи к рис. 1

также  $k_{\text{кат}}/K_{\text{ин(важ)}}$  понижаются для них настолько, что становятся сравнимыми с соответствующими константами для ферментативного гидролиза производных  $D$ -аминокислот (приведенных для сравнения в табл. 3). Так, при переходе от  $\text{Ac-L-Ala-OMe}$  к  $\text{Ac-D-Phe-L-Ala-OMe}$  константа скорости ацилирования уменьшается в 630 раз. Еще сильнее реакционная способность субстрата (в 1000 раз) уменьшается при переходе от  $\text{Ac-L-Ala-OMe}$  к  $\text{Ac-D-Val-L-Ala-OMe}$ , хотя значения констант скоростей щелочного гидролиза этих соединений практически одинаковы ( $1,31 \pm 0,06$  и  $1,41 \pm 0,15 \text{M}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$  соответственно).

Это обстоятельство интерпретируется в рамках кристаллографической модели химотрипсина [17, 18]. Согласно данным рентгеноструктурного анализа, изменение конфигурации вторичной аминокислоты олигопептидного субстрата или ингибитора приводит к невыгодным стерическим взаимодействиям вторичного остатка с боковой цепью триптофана-215, что в свою очередь вызывает изменение ориентации олигопептидной цепи субстрата (ингибитора) в комплексе с ферментом и, в частности, нарушение водородной связи между  $\text{NH}$ -группой первичного остатка субстрата и серином-214 активного центра. Таким образом, первичная [22] и вторичная стереоспецифичности  $\alpha$ -химотрипсина имеют сходную природу. Этот факт, по-видимому, имеет общее значение в ферментативных реакциях, так как резкое уменьшение реакционной способности субстрата при введении  $D$ -аминокислотного остатка в олигопептидную цепь наблюдается также в реакциях гидролиза, катализируемых карбоксипептидазой А [23], эластазой [24], проназой [25], папаином [26], термолизинном [27], катепсинами С [28] и D [29], различными типами субтилизина [30, 31], а также рядом сериновых протеиназ микробного происхождения [32]. В связи с этим любопытно отметить, что пепсин в ряде случаев не проявляет существенных различий в связывании или эффективности каталитического превращения диастереомерных олигопептидных субстратов [33].

сина по отношению к олигопептидным субстратам. С другой стороны, производные  $N$ -пептидил-2-фенилэтиламина, использованные в работе [20] в качестве ингибиторов  $\alpha$ -химотрипсина, являются неадекватной моделью олигопептидных субстратов. Так, при замене остатка глицина на лейцин во вторичном положении этих ингибиторов константы ингибирования уменьшаются всего в 2—4 раза (в случае олигопептидных субстратов — более чем в 100 раз, см. табл. 1). Видимо, отсутствие «уходящей» группы в производных  $N$ -пептидил-2-фенилэтиламина приводит к изменению способа связывания ингибиторов по сравнению с субстратами.

*Вторичная стереоспецифичность  $\alpha$ -химотрипсина.* Кинетический анализ гидролиза метиловых эфиров  $N$ -ацетил- $D$ ,  $L$ -дипептидов (табл. 3) в присутствии 1,4-бутандиола показал, что для данных субстратов лимитирующей скоростью стадией реакции является ацилирование. Несмотря на то что гидролиз  $D$ ,  $L$ -дипептидных субстратов происходит по сложноефирной связи, образованной  $L$ -аминокислотой, величины констант скоростей ацилирования, а



Значения констант конкурентного ингибирования гидролиза этилового эфира N-ацетил-L-тирозина (АТЭЭ), катализируемого  $\alpha$ -химотрипсином

| Ингибитор           | Обозначение в тексте | $K_i^* \cdot 10^3$ , М | Ингибитор           | Обозначение в тексте | $K_i^* \cdot 10^3$ , М |
|---------------------|----------------------|------------------------|---------------------|----------------------|------------------------|
| Ac-L-Tyr-D-Leu-OMe  | (XVII)               | 32±4                   | Ac-L-Tyr-L-Leu-NHMe | (XXIV)               | 22±4                   |
| Ac-D-Tyr-D-Leu-OMe  | (XVIII)              | 13±2                   | Ac-L-Tyr-D-Leu-NHMe | (XXV)                | 74±4                   |
| Ac-D-Leu-D-Leu-OMe  | (XIX)                | 48±4                   | Ac-D-Tyr-D-Leu-NHMe | (XXVI)               | 67±2                   |
| Ac-D-Val-D-Ala-OMe  | (XX)                 | 320±110                | Ac-D-Tyr-OMe        | (XXVII)              | 2,08±0,09              |
| Ac-D-Ala-D-Ala-OMe  | (XXI)                | 160±20                 | Ac-D-Val-OMe        | (XXVIII)             | 85±7                   |
| Ac-D-Phe-D-Ala-OMe  | (XXII)               | 20±1                   | Ac-D-Val-NHMe       | (XXIX)               | 145±15                 |
| Ac-L-Leu-L-Tyr-NHMe | (XXIII)              | 68±2                   | Ac-L-Tyr-NHMe       | (XXX)                | 65±4                   |

\* Рассчитаны с использованием полных кинетических кривых гидролиза АТЭЭ в присутствии ингибиторов.

Таблица 5

Изучение производных N-ацил-L-аминокислот в качестве ингибиторов и субстратов  $\alpha$ -химотрипсина

| Субстрат (ингибитор)       | Обозначения в тексте | $K_i^* \cdot 10^3$ , М | $K_m(\text{каж.}) \cdot 10^3$ , М |
|----------------------------|----------------------|------------------------|-----------------------------------|
| Ac-L-Tyr-NH <sub>2</sub>   | (XXXI)               | 34±2                   | 32±4 **                           |
| Ac-L-Tyr-NHNH <sub>2</sub> | (XXXII)              | 30±2                   | 22±8 ***                          |
| Ac-L-Trp-NH <sub>2</sub>   | (XXXIII)             | 3,1±0,2                | 5,0±0,5 **                        |
| Bz-L-Tyr-NH <sub>2</sub>   | (XXXIV)              | 3,7±0,2                | 2,5±0,3 **                        |

\* Рассчитаны с использованием полных кинетических кривых гидролиза АТЭЭ в присутствии ингибиторов.

\*\* Из работы [47].

\*\*\* Из работы [48].

Рассмотрение энергетических диаграмм химотриптического гидролиза D, L-дипептидов на стадиях образования фермент-субстратного комплекса и ацилирования (рис. 3) показывает, что боковая цепь вторичной D-аминокислоты должна быть лишь частично связана с сорбционным участком активного центра как в комплексе с ферментом, так и в переходном состоянии реакции ацилирования. Если бы боковая цепь вторичного остатка (D-Phe) субстрата Ac-D-Phe-L-Ala-OMe полностью реализовала гидрофобное взаимодействие с ферментом (как в случае L, L-дипептидных субстратов, см. рис. 1,2), снижение уровня свободной энергии в фермент-субстратном комплексе по сравнению со связыванием Ac-D-Ala-L-Ala-OMe составило бы 2,9 ккал/моль [9] (на практике эта величина составила 1,4 ккал/моль, см. рис. 3). Это взаимодействие, как и в случае L, L-субстратов, частично нарушается при образовании активированного комплекса в реакции ацилирования (приводя к уменьшению свободной энергии переходного состояния реакции лишь на 0,8 ккал/моль) и, следовательно, также в значительной степени непродуктивно.

*Изучение дипептидов в качестве ингибиторов  $\alpha$ -химотрипсина.* Метиловые эфиры ацетил-L, D-, D, D-дипептидов и D-аминокислот, а также метиламиды ацетил-L-аминокислот практически не гидролизуются под действием  $\alpha$ -химотрипсина (вплоть до концентрации фермента  $10^{-4}$  М). Для изучения сорбционных свойств этих соединений (XVII—XXX) они были испытаны в качестве ингибиторов  $\alpha$ -химотрипсина, причем было найдено, что все они являются ингибиторами конкурентного типа (табл. 4).

Для дальнейшего сопоставления и обсуждения значений истинных констант Михаэлиса ( $K_s$ ) и констант конкурентного ингибирования ( $K_i$ ) необходимо убедиться в том, что физический смысл этих констант одина-

ков, т. е. для реакций гидролиза субстратов под действием  $\alpha$ -химотрипсина выполняется условие квазистационарности. Для доказательства этого положения мы испытывали в качестве ингибиторов  $\alpha$ -химотрипсина некоторые его амидные субстраты и полученные значения констант конкурентного ингибирования сравнили со значениями констант Михаэлиса, определенных в стационарном режиме. Как видно из табл. 5, значения  $K_i$  и  $K_{m(\text{каж})}$  для исследованных соединений находятся в хорошем соответствии друг с другом. Таким образом, эти результаты позволяют использовать для амидных субстратов значения констант конкурентного ингибирования вместо значений констант Михаэлиса, определяемых из кинетических экспериментов.

На рис. 4 приведена диаграмма, показывающая связь между структурной субстратов или ингибиторов  $\alpha$ -химотрипсина и их сорбционными свойствами по отношению к ферменту. По горизонтали диаграммы расположены диастереомеры или энантиомеры исследованных соединений, по вертикали — соединения, имеющие различное химическое строение. Цифры на линиях, соединяющих соседние пары соединений, показывают отношение констант связывания соответствующих ингибиторов или субстратов. Таким образом, сопоставление горизонтальных пар демонстрирует стереоспецифичность связывания  $\alpha$ -химотрипсина, а сопоставление вертикальных пар — специфичность фермента по отношению к различным аминокислотным остаткам. Помимо обсуждавшихся выше аспектов вторичной специфичности и стереоспецифичности  $\alpha$ -химотрипсина при рассмотрении диаграммы обращают на себя внимание следующие особенности:

1) метиловые эфиры *D*, *L*-дипептидов связываются с ферментом значительно хуже, чем их *L*, *L*-аналоги. Этот эффект можно объяснить тем, что *L*, *L*-дипептиды, имеющие «вытянутую» форму [34], способны осуществлять гидрофобные взаимодействия с ферментом одновременно на двух участках: первичный аминокислотный остаток взаимодействует с гидрофобным «карманом» активного центра, вторичный — с боковой цепью остатка лейцина-99. Напротив, соединения, содержащие остатки разной конфигурации, имеют более компактную структуру [34, 35], что может препятствовать «двухцентровому» связыванию дипептида с ферментом;

2) сложноэфирные производные *D*, *D*-дипептидов во всех случаях имеют константу связывания худшую, чем соответствующие *D*, *L*-диастереомеры, причем для всех пар соединений наблюдается примерно одинаковое соотношение констант связывания;

3) константы связывания метиламидов *L*, *L*- и *D*, *D*-дипептидов близки по величине в отличие от сложноэфирных производных (ср. (XXIII) и (XXVI), табл. 4);

4) метиловые эфиры и метиламиды одних и тех же ацетил-*L*, *L*-дипептидов имеют совершенно различные константы связывания с ферментом. Так, Ас-Leu-Тур-NHMe (XXIII) и Ас-Leu-Тур-OMe (V) различаются по константам связывания в 1600 раз (!);

5) метиловые эфиры и метиламиды соответствующих *D*, *D*- или *L*, *D*-дипептидов имеют сравнительно близкие константы связывания с ферментом (ср. (XVII) и (XXV), (XVIII) и (XXVI));

6) в случае метиламидных производных увеличение длины N-ацильного заместителя несущественно сказывается на значениях констант связывания ( $K_i$  для Ас-*L*-Тур-NHMe и Ас-*L*-Leu-*L*-Тур-NHMe практически равны друг другу, табл. 4). Напротив, у сложноэфирных производных при аналогичном изменении их структуры связывание резко улучшается. Так, при переходе от Ас-*L*-Тур-OMe к Ас-*L*-Leu-*L*-Тур-OMe значение константы связывания улучшается более чем в 300 раз (табл. 1).

Четыре последних пункта выявляют принципиальные различия в характере связывания метиламидных и сложноэфирных производных с  $\alpha$ -химотрипсином и заслуживают специального рассмотрения. Следует

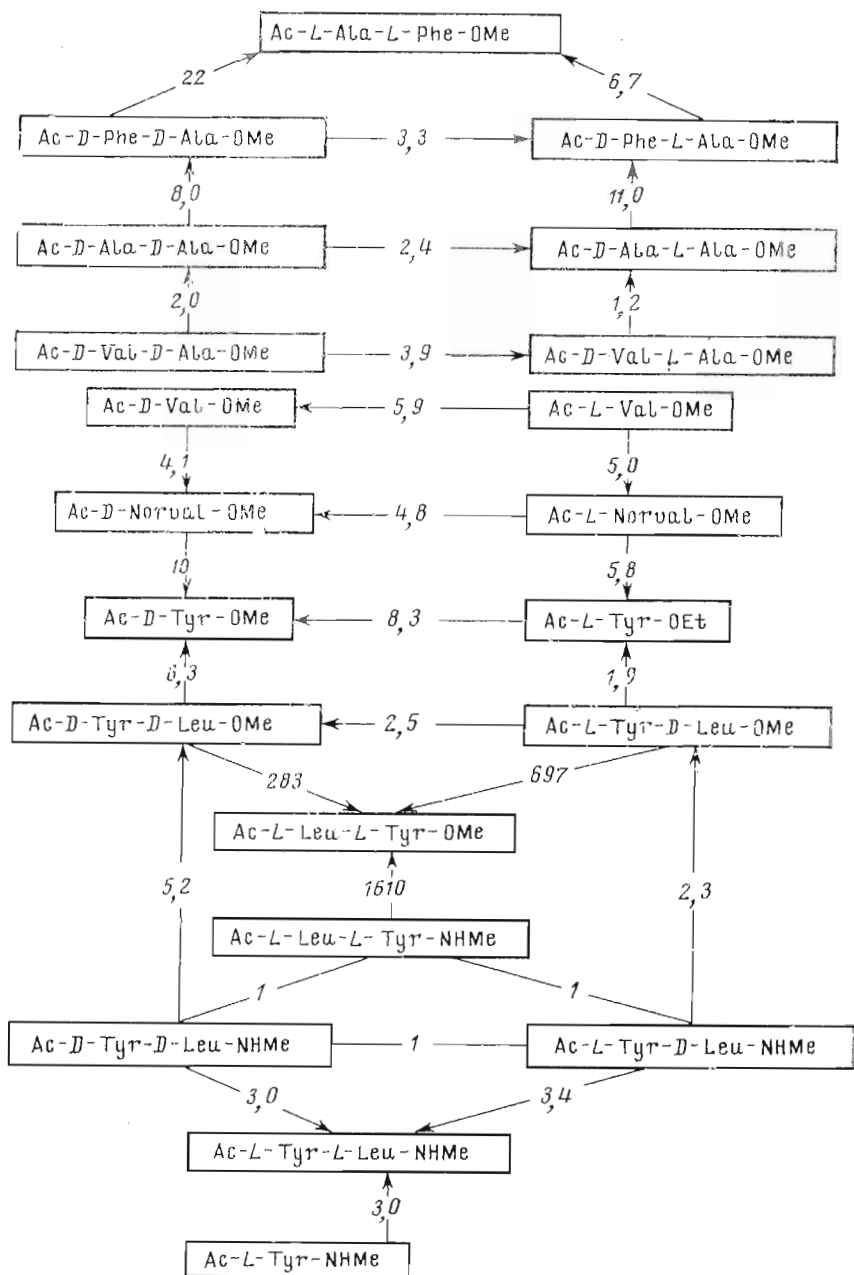


Рис. 4. Отношения констант связывания (по направлению стрелок) пар ингибиторов или субстратов с  $\alpha$ -химотрипсином. Диастереомеры или энантиомеры расположены по горизонтали; изомеры, имеющие различное химическое строение,— по вертикали

отметить, что различия в связывании амидных и сложноэфирных субстратов (ингибиторов) проявляются только в случае производных, имеющих гидрофобный N-ацильный заместитель у первичного аминокислотного остатка (см. [16]). Напротив, в случае производных N-ацетил-L-аминокислот эффективность связывания с ферментом не зависит от характера «уходящей» группы (при ее малых размерах) [36]. По-видимому, конформация метиламидных (а также амидных) производных аминокислот или олигопептидов в фермент-субстратном комплексе предотвращает «непродуктивное» взаимодействие гидрофобного заместителя в N-ациль-

ной группе (или гидрофобной боковой цепи вторичного остатка олигопептида) с боковой цепью остатка изолейцина-99 (или триптофана-215), как это имеет место в случае сложноэфирных субстратов. Этот принцип был сформулирован нами ранее [16, 22] в упрощенной форме: «Амидные субстраты в отличие от сложноэфирных связываются с  $\alpha$ -химотрипсином только продуктивно». Причины данного явления остаются неизвестными и могут объясняться более точной ориентацией амидного субстрата при связывании с активным центром фермента за счет, например, образования водородной связи с «уходящей» амидной группой. В пользу этой концепции свидетельствуют данные Фершта и Блоу с соавт. [37], построивших кристаллографическую модель комплекса панкреатического ингибитора трипсина с химотрипсином, согласно которой реакционноспособная связь  $\text{Lys}^{15}-\text{Ala}^{16}$  ингибитора расположена в активном центре химотрипсина, причем атом азота «уходящей» группы ( $\text{Ala}^{16}$ ) находится на расстоянии водородной связи от имидазольной группы гистидина-57 фермента.

Различия в характере связывания сложноэфирных и амидных субстратов с  $\alpha$ -химотрипсином приводят в ряде случаев к противоположным зависимостям реакционной способности субстрата от его структуры для двух данных классов соединений. В литературе на этот счет имеется лишь одно указание [16], хотя важность данного явления очевидна. В качестве примера можно привести *симбатное* уменьшение констант  $k_2$  и  $K_s$  для гидролиза сложных эфиров олигопептидов с увеличением гидрофобности вторичного остатка (табл. 1) и *антибатный* ход этих констант для гидролиза соответствующих амидных производных [17], *симбатное* уменьшение  $k_2$  и  $K_s$  для гидролиза сложноэфирных производных *N*-ацил-*L*-аминокислот и *антибатный* ход констант для гидролиза соответствующих амидов [16]. В ряде случаев увеличение гидрофобности боковой цепи вторичного остатка в амидных субстратах почти не изменяет константы связывания с ферментом (или даже ухудшает ее), в то время как при гидролизе соответствующих сложноэфирных субстратов наблюдается резкое улучшение констант связывания [12, 17]. Все эти данные свидетельствуют о различиях в характере связывания сложноэфирных и амидных субстратов с  $\alpha$ -химотрипсином.

### Экспериментальная часть

*Синтез субстратов и ингибиторов.* Индивидуальность всех соединений контролировали ТСХ на окиси алюминия и силикагеля. Температуры плавления не исправлены. Удельное вращение измеряли на спектрополяриметре Perkin-Elmer 141m при 23—25°.

Метилловые эфиры ацетиламинокислот (I, VIII, XIII, XXVII и XXVIII), а также *N*-метиламиды ацетил-*L*-тирозина (XXX) и ацетил-*D*-валина (XXIX) получены по известным методикам [38—40]. Синтез соединений (V, IX, X, XI, XVII, XVIII, XXI, XXII, XXIII—XXVI) был описан нами ранее [41—43].

*Метилловый эфир трет-бутилоксикарбонилглицил-L-тирозина (II).* К раствору 11,6 г (0,05 моль) хлоргидрата метилового эфира *L*-тирозина в 400 мл диоксана при охлаждении прибавляли 7,7 мл (0,055 моль) триэтиламина, через 5 мин вносили 13,6 г (0,05 моль) *N*-оксисукцинимидного эфира трет-бутилоксикарбонилглицина, перемешивали 16 ч при 20°, упаривали до 100 мл, разбавляли 500 мл этилацетата, промывали 1 г  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , насыщенным раствором  $\text{NaHCO}_3$ , водой, высушивали  $\text{MgSO}_4$ , упаривали, остаток кристаллизовали в эфире и перекристаллизовывали из смеси эфир—бензол. Выход 15,4 г (87,5%). Температуры плавления и данные тонкослойной хроматографии приведены в табл. 6.

*Метилловый эфир трет-бутилоксикарбонил-L-лейцилглицил-L-тирозина (III)* получен аналогично соединению (II), исходя из 7,30 г (0,02 моль) трифторацетата, приготовленного обработкой продукта (II) трифторуксусной кислотой (40 мин при 20°) с последующим упариванием и пере-

## Физико-химические характеристики пептидов

| Соединения                             | Т. пл., град | Растворимость для<br>перекристаллизации | $[\alpha]_D$ ,<br>град<br>(в этаноле) | Концентра-<br>ция, с | $R_f$      | Носитель | Система   |
|--|--------------|---|---------------------------------------|----------------------|------------|----------|---|
| Вос-Gly-L-Tyr-OMe (II)                 | 125-126      | Эфир - бензол                           | 37,9                                  | 0,5                  | 0,5<br>0,6 | A*<br>E  | Этилацетат - бензол, 5:1<br>Этилацетат - бензол, 2:1  |
| Вос-Leu-Gly-L-Tyr-OMe (III)            | Аморфн.      | -                                       | 11,4                                  | 0,9                  | 0,7        | E        | Этилацетат  |
| Ac-L-Leu-Gly-L-Tyr-OMe (IV)            | »            | -                                       | 6,4                                   | 0,9                  | 0,6<br>0,4 | A<br>E   | Этилацетат - этанол, 5:1<br>Этилацетат - диоксан, 2:1 |
| Вос-Gly-L-Leu- $\bar{L}$ -Tyr-OMe (VI) | 155-157      | Бензол - этил-<br>ацетат                | -28,5                                 | 1,6                  | 0,4        | A        | Этилацетат - бензол, 4:1                              |
| Вос-Gly-Gly-L-Leu-L-Tyr-<br>OMe (VII)  | 168-170      | Бензол - этил-<br>ацетат - этанол       | -11,2                                 | 1,2                  | 0,8        | A        | Этилацетат - этанол, 19:1                             |
| Ac-D-Val-L-Ala-OMe (XII)               | 177-178      | Бензол - гексан                         | 9,5                                   | 1,5                  | 0,5        | A        | Этилацетат - бензол, 6:1                              |
| Ac-D-Val-D-Ala-OMe (XX)                | 209-210      | Этилацетат                              | 76,2                                  | 0,5                  | 0,5        | A        | Этилацетат - бензол, 6:1                              |
| Ac-D-Leu-D-Leu-OMe (XIX)               | 111-112      |   | 62,8                                  | 1,0                  |            |          |   |

\* A — ТСХ на пластинках с  $Al_2O_3$  III ст. активности, E — пластинка «Eastman» с закрепленным слоем силикагеля.

осаждением из метанола смесью эфира и петролейного эфира, и 6,56 г (0,02 моль) N-оксисукцинимидного эфира *трет*-бутилоксикарбонил-*L*-лейцина. Продукт хроматографировали на колонке с кремневой кислотой (бензол — этилацетат, градиентное элюирование). Выход 6,5 г (70%).

*Метиловый эфир ацетил-*L*-лейцилглицил-*L*-тирозина (IV)*. К раствору 7,15 г (0,015 моль) трифторацетата, полученного из соединения (III), в тетрагидрофуране прибавляли при охлаждении до  $-20^{\circ}$  и перемешивании эквивалентные количества триэтиламина и ацетоксисукцинимидного эфира в тетрагидрофуране, перемешивали 2 ч при  $20^{\circ}$ , упаривали досуха, остаток хроматографировали на колонке с кремневой кислотой в системе бензол — этилацетат — диоксан (градиентное элюирование). Выход 2,46 г (40,2%).

*Метиловый эфир трет-бутилоксикарбонилглицил-*L*-лейцил-*L*-тирозина (VI)*. Обрабатывали трифторуксусной кислотой метиловый эфир *трет*-бутилоксикарбонил-*L*-лейцил-*L*-тирозина [41] и полученный трифторацетат (7,60 г, 0,018 моль) конденсировали с 4,90 (0,018 моль) N-оксисукцинимидного эфира *трет*-бутилоксикарбонилглицина в условиях получения дипептида (I). Выход 6,6 г (79%).

*Метиловый эфир трет-бутилоксикарбонилглицил-*L*-лейцил-*L*-тирозина (VII)* получен аналогично соединению (VI) после удаления в последнем *трет*-бутилоксикарбонильной защитной группы. Выход 70%.

*Метиловые эфиры ацетил-*D*-валил-*L*-аланина и ацетил-*D*-валил-*D*-аланина (XII и XIX)*. Из 6,3 г (0,02 моль) N-оксисукцинимидного эфира *трет*-бутилоксикарбонил-*D*-валина и 2,8 г (0,02 моль) хлоргидрата метилового эфира *L*- или *D*-аланина в хлороформе получали метиловый эфир *трет*-бутилоксикарбонил-*D*-валил-*L*- или *D*-аланина соответственно. Выход 4,0—4,2 г (70—72,4%). *D*, *L*-изомер: т. пл.  $106-108^{\circ}$  (гептан — петролейный эфир),  $[\alpha]_D -3,5^{\circ}$  (с 3, этанол); *D*, *D*: т. пл.  $136-138^{\circ}$  (гептан — бензол),  $[\alpha]_D +46,2^{\circ}$  (с 1, этанол). После удаления N-защитной группы в дипептидах (HCl/CH<sub>3</sub>COOH) 2,6 г (0,01 моль) хлоргидрата растворяли в 100 мл хлороформа и при перемешивании и охлаждении до  $-30^{\circ}$  в течение 20 мин прибавляли растворы ацетилхлорида (0,9 мл, 0,01 моль) и триэтиламина (3,4 мл, 0,01 моль) в хлороформе. Перемешивали 16 г при  $20^{\circ}$ , упаривали досуха, остаток экстрагировали этилацетатом, этилацетат упаривали и остаток перекристаллизовывали из смеси бензола с гептаном в случае соединения (XII) и этилацетата — для продукта (XIX). Выход 1,4—1,6 г (55—65%).

*Метиловый эфир ацетил-*D*-лейцил-*D*-лейцина (XIX)* получен из ацетил-*D*-лейцина и метилового эфира *D*-лейцина азидным методом, как описано в работе [41] для дипептидов (XVII) и (XVIII). Выход 45%.

*Кинетические измерения*. Кристаллический  $\alpha$ -химотрипсин (препарат Ленинградского мясокомбината им. С. М. Кирова) использовали без дополнительной очистки. Нормальность запасных растворов фермента определяли титрованием N-*транс*-циннамоилимидазолом [44.] По данным титрования,  $\alpha$ -химотрипсин содержал 67% активного белка.

Кинетику ферментативного гидролиза субстратов изучали с использованием регистрирующего рН-стата (ТТТ-ИС, Radiometer, Дания) в водных растворах при рН 7, 8, ионная сила 0,1 (KCl),  $25 \pm 0,2^{\circ}$ . Постоянное значение рН в реакционной системе поддерживалось автоматическим добавлением в ячейку 0,01 или 0,1 н. КОН. Все эксперименты проводили в токе воздуха, свободного от углекислого газа, используя термостабируемую ячейку объемом 10 мл. Кинетику гидролиза в присутствии добавленного нуклеофильного агента, 1,4-бутадиола, изучали в стационарном режиме протекания реакции, измеряя скорость гидролиза в начальный период времени. Методика определения значений констант скоростей стадий ацилирования и деацилирования, а также истинной константы Михаэлиса в присутствии добавленных нуклеофильных агентов описана в работах [7, 15].

При изучении ферментативного гидролиза метиловых эфиров *L*-тирозина (табл. 1), имеющих низкие значения  $K_{m(\text{каж})}$ , кинетические параметры реакции определяли анализом полной кинетической кривой [45]. Значения  $k_{\text{кат}}$  и  $K_{m(\text{каж})}$ , полученные для отдельных субстратов как методом интегрального анализа полной кинетической кривой, так и измерением скоростей гидролиза в начальный период времени и последующей обработкой в координатах Лайнуивера — Берка, совпадали в пределах ошибки эксперимента. Определение констант ингибирования  $\alpha$ -химотрипсина метиловыми эфирами, амидами и метиламидами *N*-ацилированных аминокислот и дипептидов (табл. 4 и 5) проводили во всех случаях с помощью анализа полной кинетической кривой [45] в реакции гидролиза этилового эфира *N*-ацетил-*L*-тирозина, катализируемого  $\alpha$ -химотрипсином.

Принципы построения энергетических диаграмм ферментативной реакции детально изложены в работе [9]. Значения стандартных свободных энергий образования метастабильных промежуточных соединений (фермент-субстратного комплекса и ацилферментного соединения) рассчитывали с помощью соотношения

$$\Delta G^\circ = -RT \ln K,$$

где  $K$  — соответствующая константа равновесия. Значения свободных энергий активации реакций ацилирования и деацилирования рассчитывали по формуле

$$\Delta G^\ddagger = 0,593 (29,4 - \ln k),$$

где  $k$  — соответствующие константы скоростей при 25° (в размерностях с<sup>-1</sup>).

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Neurath H., Schwert G. W. (1950) Chem. Rev., 46, 69—153.
2. Bender M. L., Kézdy F. J. (1965) Ann. Rev. Biochem., 34, 49—76.
3. Антонов В. К., Румш Л. Д. (1972) Химия природн. соедин., 581—596.
4. Попов Е. М. (1977) Молекулярн. биология, 11, 5—41.
5. Березин И. В., Мартинек К. (1971) Ж. Всес. хим. о-ва им. Д. И. Менделеева, 16, 411—420.
6. Neil G. L., Niemann C., Hein G. E. (1966) Nature, 210, 903—907.
7. Berezin I. V., Kazanskaya N. F., Klyosov A. A. (1971) FEBS Lett., 15, 121—124.
8. Berezin I. V., Kazanskaya N. F., Klyosov A. A., Martinek K. (1971) FEBS Lett., 15, 125—128.
9. Martinek K., Klyosov A. A., Kazanskaya N. F., Berezin I. V. (1974) Int. J. Chem. Kin., 6, 801—811.
10. Казанская Н. Ф., Слободянская Е. М., Цетлин В. И., Шепель Е. Н., Иванов В. Т., Овчинников Ю. А. (1970) Биохимия, 35, 1147—1152.
11. Baumann W. K., Bizzozero S. A., Dutler H. (1973) Eur. J. Biochem., 39, 381—391.
12. Bizzozero S. A., Zweifel B. O. (1975) FEBS Lett., 59, 105—108.
13. Цетлин В. И., Иванов В. Т., Овчинников Ю. А., Клесов А. А. (1975) Биохимия, 40, 484—488.
14. Bauer C.-A., Thompson R. C., Blout E. R. (1976) Biochemistry, 15, 1291—1295.
15. Березин И. В., Клесов А. А. (1976) Практический курс химической и ферментативной кинетики, с. 144—147, Изд. МГУ, М.
16. Березин И. В., Казанская Н. Ф., Клесов А. А. (1971) Биохимия, 36, 227—235.
17. Segal D. M., Powers J. C., Cohen G. H., Davies D. R., Wilcox P. E. (1971) Biochemistry, 10, 3728—3738.
18. Segal D. M. (1972) Biochemistry, 11, 349—356.
19. Kurachi K., Powers J. C., Wilcox P. E. (1973) Biochemistry, 12, 771—777.
20. Powers J. C., Baker B. L., Brown J., Chilm B. R. (1974) J. Amer. Chem. Soc., 96, 238—243.
21. Мартинек К., Левашов А. В., Березин И. В. (1970) Молекулярн. биология, 4, 517—528.
22. Клесов А. А. (1971) Сб. трудов научн. конф. межфак. лаб. биоорг. химии МГУ, с. 261—271, М.
23. Abramowitz N., Schechter I., Berger A. (1937) Biochem. and Biophys. Res. Commun., 29, 852—867.
24. Atlas D., Berger A. (1973) Biochemistry, 12, 2573—2577.
25. Harper E., Berger A. (1972) Biochem. and Biophys. Res. Commun., 46, 1956—1960.
26. Berger A., Schechter I. (1970) Phil. Trans. Roy. Soc. Lond., B257, 249—264.

27. Morihara K., Tsuzuki H. (1970) *Eur. J. Biochem.*, **15**, 374—380.
28. Izumiya N., Fruton J. S. (1956) *J. Biol. Chem.*, **218**, 59—76.
29. Keilova H., Blaha K., Keil B. (1968) *Eur. J. Biochem.*, **4**, 442—447.
30. Morihara K., Tsuzuki H., Oka T. (1971) *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, **42**, 1000—1006.
31. Robertus J. D., Alden R. A., Birktoft J. J., Kraut J., Powers J. C., Wilcox P. E. (1972) *Biochemistry*, **11**, 2439—2449.
32. Morihara K. (1974) *Adv. Enzymol.*, **41**, 179—243.
33. Fruton J. S. (1970) *Adv. Enzymol.*, **33**, 401—443.
34. Bovey F., Tiers G. V. D. (1959) *J. Amer. Chem. Soc.*, **81**, 2870—2878.
35. Hardy D. M., Kenner G. W., Sheppard R. C. (1963) *Tetrahedron*, **19**, 95—105.
36. Philipp M., Pollack R. M., Bender M. L. (1973) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **70**, 517—520.
37. Fersht A. R., Blow D. M., Fastrez J. (1973) *Biochemistry*, **12**, 2035—2041.
38. Jones J. B., Kunitake T., Niemann C., Hein G. B. (1965) *J. Amer. Chem. Soc.*, **87**, 1777—1781.
39. Applewhite T. H., Niemann C. (1959) *J. Amer. Chem. Soc.*, **81**, 2208—2213.
40. Wizushima S., Tsuboi M., Shimanouchi T., Sugita T., Yoshimoto T. (1954) *J. Amer. Chem. Soc.*, **76**, 2479—2482.
41. Цетлин В. И., Шенель Е. Н., Иванов В. Т., Овчинников Ю. А. (1975) *Биоорганическая химия*, **1**, 407—415.
42. Портнова С. Л., Быстров В. Ф., Балашова Т. А., Цетлин В. И., Костецкий П. В., Иванов В. Т., Овчинников Ю. А. (1971) *Ж. общ. химии*, **41**, 407—419.
43. Портнова С. Л., Быстров В. Ф., Цетлин В. И., Иванов В. Т., Овчинников Ю. А. (1968) *Ж. общ. химии*, **38**, 428—439.
44. Schonbaum G. R., Zerner V., Bender M. L. (1961) *J. Biol. Chem.*, **236**, 2930—2935.
45. Клесов А. А., Березин И. В. (1972) *Биохимия*, **37**, 170—183.
46. Rapp J. R., Niemann C., Hein G. E. (1966) *Biochemistry*, **5**, 4100—4105.
47. Foster R. J., Niemann C. (1955) *J. Amer. Chem. Soc.*, **77**, 1886—1892.
48. Lutwack R., Mower H. F., Niemann C. (1957) *J. Amer. Chem. Soc.*, **79**, 5690—5693.

Поступила в редакцию  
25.IV.1977

## STRUCTURAL FACTORS IMPLICATION IN THE REACTION OF OLIGOPEPTIDE SUBSTRATES AND INHIBITORS WITH $\alpha$ -CHYMOTRYPSIN

KLYOSOV A. A., TSETLIN V. I.

‡ *M. V. Lomonosov State University, Moscow;*  
*M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry,*  
*Academy of Sciences of the USSR, Moscow*

The acylation and deacylation rate constants have been determined for  $\alpha$ -chymotrypsin catalyzed hydrolysis of a series of oligopeptide esters. The deacylation rate constants depend only on the structure of «primary» amino acid residue side-chain, but not on the nature, sequence or chain-length of N-terminal moiety. From the analysis of energy profiles for  $\alpha$ -chymotrypsin reaction with diastereomeric substrates the efficiency of enzyme-substrate interactions was estimated both in the basic and transition states. Therefrom a conclusion was drawn that the hydrophobic contribution of the «secondary» amino-acid residue to the binding with the enzyme active center is mainly non-productive and decreases considerably at the transition state of the acylation step. Essential differences were found in the mode of  $\alpha$ -chymotrypsin binding with the amide (methanamide) substrates and inhibitors on the one hand, and with esters — on the other.