



УДК 577.156.41.02

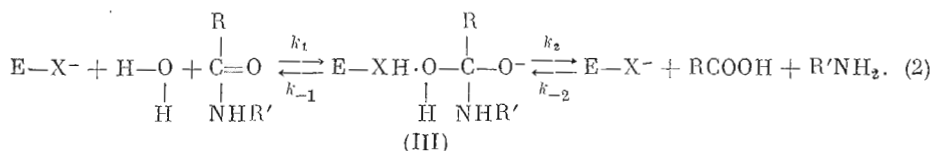
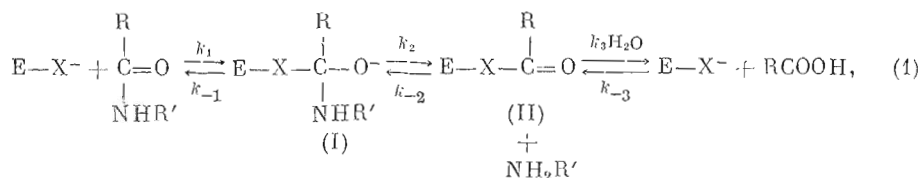
## КАК РАЗЛИЧИТЬ КОВАЛЕНТНЫЙ И ОБЩИЙ ОСНОВНОЙ МЕХАНИЗМЫ ФЕРМЕНТАТИВНОГО ГИДРОЛИЗА? \*

*Антонов В. К., Гинодман Л. М., Руми Л. Д.,  
Капитанников Ю. В., Баршевская Т. Н., Явашев Л. П.,  
Гурова А. Г., Волкова Л. И.*

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

Предложены методы, позволяющие различить ковалентный и общий основной механизмы гидролиза, катализируемого протеолитическими ферментами. Методы основаны на анализе данных по включению тяжелого кислорода в продукты катализируемой протеазами реакции транспептидации по типу ацильного переноса, негидролизовавшийся субстрат, каталитически активные группы фермента, а также на сравнении скоростей катализируемого протеазами обмена атомов кислорода на  $^{18}\text{O}$  в карбоксильной группе ацильного продукта гидролиза в отсутствие и в присутствии второго, аминного продукта гидролиза. Эти методы применены для анализа механизма действия пепсина и лейцинаминопептидазы. Показано, что оба фермента функционируют по типу общего основного катализа, т. е. каталитически активные группы способствуют отщеплению протона от молекулы воды, атакующей гидролизуемую связь. Обсуждается структура промежуточных соединений при таком типе катализа.

Несмотря на значительный прогресс в изучении структуры и механизма действия протеолитических ферментов, ряд важнейших вопросов оставался до недавнего времени практически не решенным. Сюда относится в первую очередь вопрос о характере каталитического действия нуклеофильных групп активного центра на стадии расщепления гидролизуемой связи. Эти группы могут функционировать в качестве ковалентного (нуклеофильного) катализатора, непосредственно атакуя карбонильный атом углерода гидролизуемой связи (схема 1), или в качестве общего основного катализатора, способствуя отщеплению протона от молекулы воды, атакующей субстрат (схема 2).



\* Предварительные результаты этой работы сообщены в [1-3].

Доказать ковалентный механизм катализа довольно легко лишь в тех случаях, когда скорость образования промежуточного «ацил-фермента» (II) существенно больше скорости его распада. Такое положение наблюдается при катализируемом сериновыми [4] или тиоловыми [5] протеазами гидролизе эфиров. Однако уже для пептидных субстратов этих ферментов задача оказывается значительно более сложной, поскольку в этом случае промежуточный «ацил-фермент» не накапливается в ходе гидролиза. Долгое время существовали противоречивые мнения [4, 6] относительно справедливости ацил-ферментного механизма гидролиза пептидных субстратов  $\alpha$ -химотрипсином. Лишь в 1973 г. в нашей лаборатории [7] были получены доказательства тождественности механизмов катализируемого  $\alpha$ -химотрипсином гидролиза эфирных и амидных субстратов на основе сравнения скоростей включения меченых продуктов гидролиза и тяжелого кислорода воды в субстрат в состоянии термодинамического равновесия системы. Независимо и практически одновременно, но на основе другого подхода к тем же выводам пришли авторы работы [8].

В данной работе мы предлагаем несколько новых подходов, позволяющих различить ковалентный и общий основной механизмы гидролиза амидной связи. Эти подходы были нами апробированы на примере исследования пепсина (КФ 3.4.23.1) и лейцинаминопептидазы (КФ 3.4.11.1).

1. *Исследование включения тяжелого кислорода воды в продукты катализируемой ферментом транспептидации типа ацильного переноса.* Как видно из схемы 1, при ковалентном катализе вода участвует только на стадии расщепления «ацил-фермента» (II) и поэтому перенос ацильного фрагмента на акцептор (или транспептидация) не должен сопровождаться включением тяжелого кислорода из воды в продукт переноса. Если же вода участвует на первой стадии реакции (схема 2), тяжелый кислород воды включается в карбоксильную группу продукта гидролиза, который затем, реагируя с акцептором, переносит метку в продукт транспептидации. Таким образом, наличие или отсутствие  $^{18}\text{O}$  в карбонильной группе продукта транспептидации свидетельствует соответственно об общем основном или ковалентном типе катализа.

2. *Исследование включения тяжелого кислорода воды в непрогидролизованный субстрат.* Этот метод широко применялся при изучении неферментативного гидролиза [9] и оказывается успешным в тех случаях, когда скорость распада промежуточных тетраэдрических аддуктов в направлении исходного субстрата выше, чем скорость его распада до продукта реакции (т. е.  $k_{-1} \gg k_2$ ). Таким образом, обнаружение включения  $^{18}\text{O}$  в субстрат свидетельствует в пользу общего основного механизма, тогда как отсутствие такого включения не дает оснований для ответа на вопрос о типе каталитического механизма.

3. *Исследование скорости обмена кислорода в карбоксильной группе ацильного продукта гидролиза на  $^{18}\text{O}$  из воды в отсутствие и в присутствии второго, амидного продукта реакции.* Как известно [10, 11], многие протеолитические ферменты катализируют обмен атомов кислорода в карбоксильной группе ацильного продукта гидролиза на  $^{18}\text{O}$  из тяжелоокислородной воды. Если в систему ввести второй амидный продукт гидролиза, то наряду с реакцией обмена будет проходить обратимая реакция синтеза-гидролиза амидной связи, также приводящая к обмену кислорода в карбоксильной группе ацильного продукта. Если последняя реакция проходит через ковалентный «ацил-фермент» (II), то она не может ускорить процесс обмена, так как вода не участвует на стадии образования амидной связи. Если же реакция идет по схеме 2 и скорость синтеза-гидролиза превышает скорость собственного обмена, то введение амидного продукта должно повышать наблюдаемую скорость обмена атомов кислорода в карбоксильной группе ацильного фрагмента субстрата.

4. В тех случаях, когда группа X (схема 1 и 2) — карбоксильная, дополнительное свидетельство общего основного механизма катализа можно

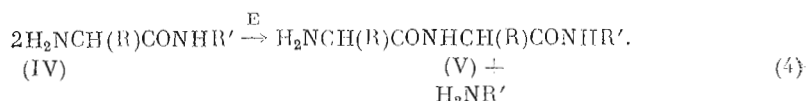
получить, исследуя включение  $^{18}\text{O}$  в карбоксильные группы активного центра фермента. В случае пепсинового катализа такое исследование важно еще и потому, что этот фермент катализирует реакции аминопереноса (схема 3) [12]:



Предполагалось [13], что промежуточным продуктом такой реакции является «аминофермент» — продукт ацилирования аминного фрагмента субстрата ферментом ( $\text{E}-\text{CONHR}'$ ).

Итак, для однозначного суждения о механизме ферментативного гидролиза необходимо использовать несколько независимых подходов. Все перечисленные выше методы были использованы нами для изучения механизма действия свиного пепсина и первые два метода — для заключения о механизме действия лейцинаминопептидазы из хрусталика глаза быка.

Как пепсин, так и лейцинаминопептидаза катализируют реакции транспептидации по типу ацильного переноса:

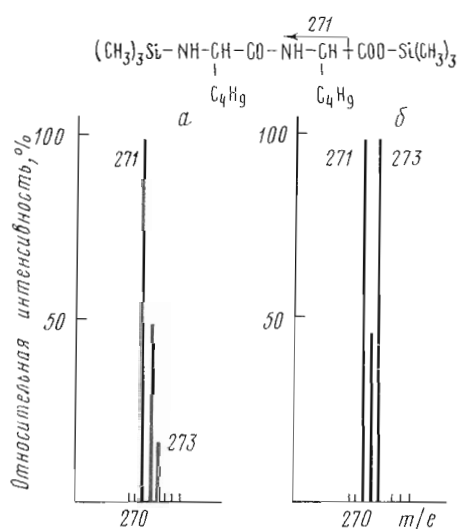


Так, например, инкубация *L*-лейцил-*L*-тирозинамида (IV,  $\text{R}=\text{CH}_2\text{CHMe}_2$ ,  $\text{R}'=\text{CH}(\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{OH})\text{CONH}_2$ ) с пепсином при  $\text{pH} \sim 3,5$  дает с выходом около 25% *L*-лейцил-*L*-лейцин [14],

образующийся из трипептида (V) путем отщепления С-концевого тирозинамида. Образование этого соединения из продукта гидролиза субстрата — лейцина практически исключено в силу очень неблагоприятной константы равновесия такой реакции.

Максимальный выход продукта транспептидации достигается при инкубации субстрата с пепсином в течение 72 ч. При этом наблюдается заметный автолиз пепсина. Чтобы облегчить выделение продукта реакции, использовали субстрат, содержащий [ $^{14}\text{C}$ ]лейцин. Реакцию проводили в тяжелоокислородной воде с содержанием  $^{18}\text{O}$  50—90 ат. %.

Поскольку в продукте транспептидации ( $\text{H}-\text{Leu}-\text{Leu}-\text{OH}$ ) тяжелоокислородная метка содержится



Масс-спектр TMS-Leu-Leu-OTMS в области  $m/e$  271: а — образец, не содержащий изотопа  $^{18}\text{O}$ ; б — опытный образец

как в карбоксильной группе пептидной связи, так и в С-концевой карбоксильной группе, продукт транспептидации, исследуемый методом хромато-масс-спектрометрии, модифицировали превращением в летучие производные: метиловый эфир трифторацетиллейциллейцина и триметилсилильное производное (рисунок). В нашем предварительном сообщении [2] приведено еще несколько способов трансформации продукта транспептидации, удобных для определения  $^{18}\text{O}$  методом активационного анализа [15]. Однако эти методы дали завышенные результаты содержания  $^{18}\text{O}$  в образцах.

Содержание  $^{18}\text{O}$  в непрогидролизованном субстрате определяли тем же методом, используя N-лаурилпроизводное дипептида, а также методом масс-спектрометрии с ионизацией полем.

Хромато-масс-спектрометрический анализ включения  $^{18}\text{O}$  в образцы, полученные при проведении катализируемой пепсином реакции транспептидации

| Исследуемое вещество      | Анализируемая форма          | $m/e$ | Содержание $^{18}\text{O}$ в воде, ат. % | Показатели включения $^{18}\text{O}$ |            | Обмен *, % |
|---------------------------|------------------------------|-------|------------------------------------------|--------------------------------------|------------|------------|
|                           |                              |       |                                          | теория                               | опыт       |            |
| H-Leu-Leu-OH              | TFA-Leu-Leu-OMe              | 212   | 75                                       | 0,75                                 | 0,49±0,06  | 65±12      |
|                           | TMS-Leu-Leu-OTMS             | 273   | 80                                       | 0,8                                  | 0,45±0,04  | 56±10      |
| H-Leu-Tyr-NH <sub>2</sub> | Laur-Leu-Tyr-NH <sub>2</sub> | 298   | 80                                       | 0,8                                  | 0,10±0,03  | 13±4       |
|                           | TMS-Leu-Tyr-NHTMS            | 465   | 75                                       | 0,75                                 | 0,067±0,01 | 9±1,5      |

\* В расчете на 100% H<sub>2</sub><sup>18</sup>O.

Таблица 2

Анализ включения  $^{18}\text{O}$  в образцы, полученные при проведении катализируемой лейцинаминопептидазой реакции транспептидации \*

| Исследуемое вещество      | Содержание $^{18}\text{O}$ в исходном Leu-NH <sub>2</sub> , ат. % | Содержание $^{18}\text{O}$ в H <sub>2</sub> O, ат. % | Показатели включения $^{18}\text{O}$ |           | Обмен, % |
|---------------------------|-------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------|--------------------------------------|-----------|----------|
|                           |                                                                   |                                                      | теория                               | опыт      |          |
| H-Leu-Leu-NH <sub>2</sub> | —                                                                 | 62                                                   | 0,62                                 | 0,28±0,03 | 46±5     |
| H-Leu-Leu-NH <sub>2</sub> | 67                                                                | —                                                    | 0                                    | 0,30±0,03 | 55±5     |
| H-Leu-NH <sub>2</sub>     | —                                                                 | 62                                                   | 0,62                                 | 0,31±0,03 | 49±5     |

\* Содержание  $^{18}\text{O}$  определяли методом масс-спектрометрии с ионизацией иолем.

Как видно из полученных результатов (табл. 1), происходит включение  $^{18}\text{O}$  в пептидную связь продукта транспептидации; наблюдается также включение метки и в непрогидролизованный субстрат.

При инкубации *L*-лейцинамида с лейцинаминопептидазой при pH 8,5 (концентрация фермента 0,5 мкМ) в тяжелоокислородной воде максимальный выход продукта транспептидации — *L*-лейцил-*L*-лейцинамида достигается через 2 мин. Были проведены опыты также с H-Leu-NH<sub>2</sub>, предварительно обогащенным изотопом  $^{18}\text{O}$ . Как и для субстратов пепсина (табл. 2), наблюдается включение  $^{18}\text{O}$  в продукт транспептидации и в непрогидролизованный субстрат.

Пепсин, как и лейцинаминопептидаза, катализирует обмен кислорода в карбоксильных группах ацильных продуктов гидролиза амидной связи [10, 16, 17]. Выказывалось мнение, что катализируемый некоторыми пептид-гидролазами (например, карбоксипептидазой А) обмен кислорода происходит исключительно за счет обратимого синтеза-гидролиза пептидной связи с участием аминокислот — продуктов автолиза фермента [11]. Учитывая это, с целью проверки способности пепсина катализировать обмен кислорода при отсутствии реакции синтеза-гидролиза, мы исследовали кислородный обмен в *N*-ацетил-*L*-фенилаланине, катализируемый пепсином, иммобилизованным на аминопропилсилохроме С-80, обработанном солями титана [17] и тщательно отмытом от возможных примесей сопутствующих пептидов. Было показано, что иммобилизованный пепсин катализирует обмен кислорода в *N*-ацетил-*L*-фенилаланине (табл. 3). Добавление в реакционную смесь трипептида — метилового эфира *L*-фенилаланил-*L*-аланил-*L*-аланила увеличивает скорость обмена приблизительно в 2 раза. Стереоизомерный *D*-Phe-Ala-Ala-OMe не изменяет скорости обмена кислорода в *N*-ацетилфенилаланине.

Масс-спектрометрический анализ скорости обмена  $^{18}\text{O}$  в ацетилфенилаланине и лейцине

| Субстрат  | Катализатор и добавки                                 | $m/e$           | Содержание $^{18}\text{O}$ в воде, ат. % | Время инкубации, мин | Показатели обмена $^{18}\text{O}$ * |                 | Константа скорости обмена, $\text{мин}^{-1}$ |
|-----------|-------------------------------------------------------|-----------------|------------------------------------------|----------------------|-------------------------------------|-----------------|----------------------------------------------|
|           |                                                       |                 |                                          |                      | теория                              | опыт            |                                              |
| Ac-Phe-OH | Пепсин                                                | 223<br>и 225 ** | 75                                       | 360                  | 0,75                                | $0,13 \pm 0,02$ | $1,16 \pm 0,1$                               |
| Ac-Phe-OH | Иммобилизованный пепсин                               | 223<br>и 225 ** | 90                                       | 360                  | 0,9                                 | $0,42 \pm 0,03$ | $0,42 \pm 0,03$                              |
| Ac-Phe-OH | Пепсин+<br>Phe-Ala-Ala-OMe                            | 223<br>и 225 ** | 75                                       | 360                  | 0,75                                | $0,29 \pm 0,03$ | $2,1 \pm 0,2$ (2,6) ****                     |
| H-Leu-OH  | Лейцинамнопептидаза                                   | 134 ***         | 75                                       | 17                   | 0,75                                | $0,21 \pm 0,01$ | $350 \pm 3$                                  |
| H-Leu-OH  | Лейцинамнопептидаза+<br>+ $\text{NH}_4\text{Cl}$ (1M) | 134 ***         | 75                                       | 17                   | 0,75                                | $0,19 \pm 0,01$ | $315 \pm 3$ (3,63)                           |

\* Рассчитывалась по формуле (6).

\*\* Ионизация электронами.

\*\*\* Ионизация полем.

\*\*\*\* В скобках дана скорость обмена за счет синтеза-гидролиза пептидной связи, рассчитанная по формуле, приведенной на с. 440.

Обмен кислорода в лейцине, катализируемый лейцинамнопептидазой, происходит за 17 мин на 28%, однако эта реакция не ускоряется при добавлении 1 M  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , так как, по-видимому, собственный обмен протекает значительно быстрее, чем катализируемый ферментом синтез-гидролиз лейцинамида.

Теоретическую величину скорости обмена в N-ацетил-L-фенилаланине и лейцине в присутствии соответственно трипептида или  $\text{NH}_4\text{Cl}$  рассчитывали по формуле [11]

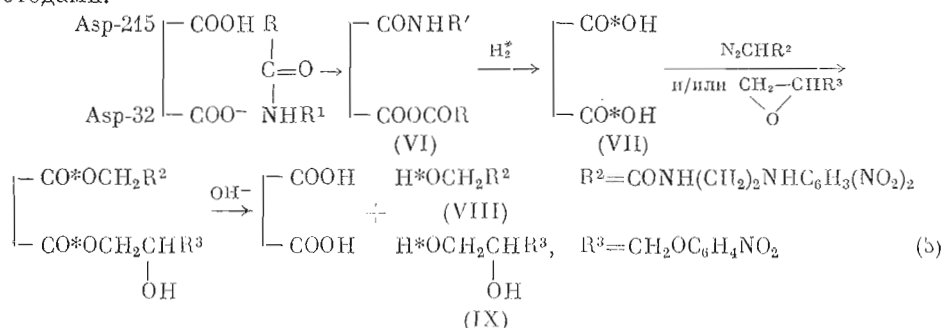
$$V = \frac{k_{\text{кат}} |S_1|_0 |S_2|_0 |E|_0 / K_{\text{рав}}}{K_m + \frac{|S_1|_0 |S_2|_0}{K_{\text{рав}}} + \frac{K_m |S_1|_0}{K_{i(1)}} + \frac{K_m |S_2|_0}{K_{i(2)}}},$$

где  $S_1$  — Ac-Phe или Leu;  $S_2$  — Phe-Ala-Ala-OMe или  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ;  $K_{\text{рав}}$  — константа равновесия синтеза-гидролиза пептидной связи;  $k_{\text{кат}}$  — каталитическая константа гидролиза пептида или  $\text{Leu-NH}_2$ ;  $K_m$  — константа Михаэлиса этих веществ;  $K_{i(1)}$  и  $K_{i(2)}$  — константы ингибирования соответствующими продуктами.

Для тетрапептида Ac-Phe-Phe-Ala-Ala-OMe значения  $k_{\text{кат}}$  и  $K_m$  взяты из работы [18], а величина  $K_{\text{рав}}$  определена в опыте по гидролизу  $^{14}\text{C}$  меченого тетрапептида ( $K_{\text{рав}}=0,3$ ). Величины  $K_{i(1)}$  и  $K_{i(2)}$  составляли соответственно 50,1 и 1,5 mM.  $K_{\text{рав}}$  гидролиза  $\text{Leu-NH}_2$  рассчитана из данных [19] и принята равной  $1 \cdot 10^4$ . Соответствующие каталитические константы взяты из работы [20]. Расчетные данные приведены в табл. 3.

Как указывалось выше, исследования включения изотопа кислорода  $^{18}\text{O}$  в продукты гидролиза и транспептидации целесообразно дополнить данными по включению этого изотопа в каталитически активные группы фермента. Чтобы выяснить, включается ли изотоп кислорода в каталитически активные карбоксильные группы остатков Asp-32 и Asp-215 пепсина, мы использовали схему, применявшуюся ранее [21] и давшую противоречивые результаты из-за низкого обогащения  $\text{H}_2^{18}\text{O}$ . Пепсин инкубировали в тяжелоокислородной воде (~70%) с субстратом — Ac-Phe-Tyr-OH. Затем фермент ингибировали N-диазоацетил-N'-(2,4-динитрофенил)эти-

ленамином, образующим с карбоксильной группой остатка Asp-215 сложнуюэфирную связь [22]. Белок отделяли и подвергали мягкому щелочному гидролизу. Образовавшийся N-гликолил-N'-(2,4-динитрофенил)этилендиамин (VIII) отделяли гель-фильтрацией на сефадексе G-25 и анализировали на содержание  $^{18}\text{O}$  активационным или масс-спектрометрическим методами.



Как видно из схемы 5, в случае, если карбоксильная группа остатка Asp-215 образует с C-концевым фрагментом субстрата «амипофермент» (VI), она должна обменивать свои атомы кислорода на  $^{18}\text{O}$  в ходе регенерации свободного фермента (VII). При этом последовательность операций на схеме 5 должна привести к обнаружению метки в гликолил-(2,4-динитрофенил)этилендиамина (VIII). Как показали результаты опытов, метка в этом продукте отсутствовала. Для подтверждения этих данных проводились опыты по выделению из пепсина аспарагиновой кислоты-215, связанной с диазонингибитором. С этой целью пепсин, ингибированный диазосоединением, после инкубации с субстратом (Ac-Phe-Tyr-OH) в тяжелоокислородной воде выделяли, очищали хроматографией на DEAE-целлюлозе и гидролизовали оризином [22] в течение 16 ч при 37° С. Смесь экстрагировали *n*-бутанолом и подвергали высоковольтному электрофорезу на бумаге при pH 2,3 (70 В/см, 2,5 ч). Окрашенные, содержащие ингибитор полосы с электрофоретической подвижностью 3,7; 9,3 и 17,3 см элюировали и подвергали аминокислотному анализу. Продукты идентифицированы соответственно как N-гликолил-N'-(2,4-динитрофенил)этилендиамин (VIII), Asp-(VIII) и Val-Asp-(VIII). В препарате Asp-(VIII) определяли содержание  $^{18}\text{O}$  методом активационного анализа. Оказалось, что содержание  $^{18}\text{O}$  практически не превышает природное.

Чтобы установить, включается ли  $^{18}\text{O}$  в остаток Asp-32, пепсин после инкубации с субстратом в тяжелоокислородной воде ингибировали 1,2-эпокси-3-(*n*-нитрофенокс)пропаном [23]. Обработка, аналогичная описанной выше, привела к 1-*n*-нитрофенилокси-2,3-пропандиолу (IX), в котором отсутствовал  $^{18}\text{O}$ . Отсюда следует, что если в ходе гидролиза субстрата и образуется ангидрид (VI), он не расщепляется водой по карбонильной группе, принадлежащей ферменту.

Наконец, поскольку эпоксиингибитор модифицирует не только остаток Asp-32, но и Asp-215 [23], был проведен опыт по последовательному ингибированию пепсина сначала диазонингибитором, однозначно реагирующим с карбоксильной группой Asp-215, а затем с эпоксиингибитором. В смеси оксипроизводных ингибиторов, выделенной после щелочного гидролиза, масс-спектрометрически не было обнаружено избытка  $^{18}\text{O}$ . В контрольных опытах по гидролизу эпоксида до диола в присутствии  $\text{H}_2^{18}\text{O}$  и по щелочному гидролизу ингибированного диазосоединением и эпоксидом пепсина в  $\text{H}_2^{18}\text{O}$  было показано, что в ходе операций по гидролизу и выделению целевых веществ не происходит потери изотопной метки.

Таким образом, полученные нами данные однозначно свидетельствуют, что катализируемый пепсином и лейцинаминопептидазой гидролиз идет по общему основному механизму и агентом, непосредственно атакующим кар-

боильный атом углерода пептида, является молекула воды. Кроме того, в обоих случаях гидролиз идет через образование относительно устойчивых тетраэдрических промежуточных соединений. При катализе пепсином остатки Asp-32 и Asp-215 не образуют так называемого «аминофермента» с С-концевым фрагментом гидролизуемого субстрата. Насколько нам известно, данные этой работы впервые демонстрируют функционирование протеолитических ферментов по общему основному механизму. В литературе высказывались предположения, основанные на данных кристаллографических исследований и других косвенных данных о том, что пенициллопепсин [24], термолизин [25] и, возможно, карбоксипептидаза А [26] функционируют по такому же механизму, однако прямых доказательств этому до сих пор не было.

В этой связи возникает вопрос: как при отсутствии ковалентных промежуточных соединений фрагментов субстрата с ферментом происходят реакции переноса и, в частности, реакции транспептидации? Следует допустить, что на пути от субстрата к продуктам существуют нековалентные комплексы фермента с повышенным сродством к фрагментам субстрата (ср. [27]). Таким образом, эксперименты по «перехвату» (entrapment) промежуточного соединения в ферментативной реакции совсем не обязательно в случае их успеха свидетельствуют о ковалентном механизме катализа.

### Экспериментальная часть

Свиной пепсин получали хроматографией коммерческого препарата (Олайн) на DEAE-целлюлозе. Активность пепсина определяли по модифицированному методу Ансона [28]. Пепсин, иммобилизованный на аминсиохроме, получали согласно ранее опубликованным данным [17] и тщательно промывали 2 М ацетатным буфером (рН 4,5) до исчезновения в фильтрате положительной реакции на свободные аминокруппы. Кристаллическая лейцинаминопептидаза из хрусталика глаза быка была любезно предоставлена доктором Ю. Лашем (Университет им. М. Лютера, Галле, ГДР). Препарат оризина любезно предоставлен В. М. Степановым (МГУ, Москва). Равномерно меченый [ $^{14}\text{C}$ ]-L-лейцил-L-тирозинамид получали с использованием [ $^{14}\text{C}$ ]-L-лейцина (Amersham, Англия) с удельной активностью 23,8 мкКи/ммоль [29]. N-([2- $^{14}\text{C}$ ]ацетил)-L-фенилаланин с удельной активностью  $111 \cdot 10^6$  имп/мин·г получен по методу [7]. Метилловый эфир L-фенилаланил-L-аланил-L-аланина синтезирован с 30% выходом из бензилоксикарбонил-L-фенилаланина и метилового эфира L-аланина последовательным наращиванием пептидной цепи методом смешанных ангидридов; т. пл.  $210^\circ\text{C}$ ,  $[\alpha]_D^{20} - 3,9^\circ$  (с 0,65; диметилформамид). Аналогично получен метилловый эфир D-фенилаланин-L-аланил-L-аланина. L-Лейцинамид и L-лейцил-L-лейцинамид синтезировали согласно опубликованным данным [30]. Для получения [ $^{18}\text{O}$ ]-L-лейцинамида метилловый эфир L-лейцина гидролизovali в  $\text{H}_2^{18}\text{O}$  (67 ат.%) в присутствии 0,01 н. NaOH. N-Ацетил-L-фенилаланил-L-тирозин получали по методу [31]. Использовали тяжелоокислородную воду (Amersham, Англия) с содержанием  $^{18}\text{O}$  50–90 ат.%. Все остальные реактивы были марки х. ч.

*Реакция транспептидации, катализируемая пепсином.* 21 мг [ $^{14}\text{C}$ ]-L-лейцил-L-тирозинамида растворяли в 10 мл 0,2 М натрий-ацетатного буфера, рН 3,6, приготовленного на  $\text{H}_2^{18}\text{O}$ . К раствору добавляли 13 мг пепсина и смесь инкубировали 72 ч при  $20^\circ\text{C}$ . Затем раствор лиофильно высушивали и остаток растворяли в 0,01 М аммоний-ацетатном буфере, рН 5,6. Белок отделяли на колонке с сефадексом G-75 ( $1,5 \times 100$  см). Фракцию, содержащую низкомолекулярные компоненты, упаривали в вакууме досуха и подвергали фракционированию одним из следующих способов: А) 10 мг сухого остатка растворяли в 0,1 М аммоний-бикарбонатном буфере, рН 8,15, и наносили на лист бумаги Whatman 3 ММ шириной 20 см. Электрофорез

проводили в течение 3 ч при 70 В/см. Лист высушивали, разрезали на полосы длиной 2 см и определяли радиоактивность на сцинтилляционном счетчике SL-30 Intertechnique. Области, соответствующие [ $^{14}\text{C}$ ]-Leu-Leu-OH и [ $^{14}\text{C}$ ]-Leu-Tyr-NH<sub>2</sub>, вырезали и элюировали 0,05 н. HCl. Элюаты упаривали досуха.

Б) 2,5 мг сухого остатка растворяли в метаноле (50 мкл) и наносили узкой полосой на пластинку (5×20 см) со слоем силикагеля (Merck) толщиной 0,2 мм. Хроматографию проводили в системе метанол — этилацетат — конц. NH<sub>3</sub>, 35 : 65 : 3. Пластинку после высушивания проявляли по краю нингидрином и зоны, соответствующие [ $^{14}\text{C}$ ]-Leu-Leu-OH и [ $^{14}\text{C}$ ]-Leu-Tyr-NH<sub>2</sub>, элюировали 5% уксусной кислотой (3×3 мл). Чистоту препаратов контролировали аминокислотным анализом и N-концевым анализом с дансилхлоридом. В случае неомогенности препараты дополнительно хроматографировали на пластинках с целлюлозой MN 300 в системе бутанол — пиридин — вода — уксусная кислота, 60 : 40 : 48 : 12.

*Подготовка образцов для анализа на  $^{18}\text{O}$ .* 0,2 мг [ $^{14}\text{C}$ ]лейцил-лейцина превращали в метиловый эфир трифторацетил-лейцил-лейцина этерификацией диазометаном и ацилированием трифторуксусным ангидридом. Лейцил-лейцин и лейцил-тирозинамид превращали в триметилсилильные производные [32], а лейцил-тирозинамид ацилировали N-оксисукцинимидным эфиром лауриновой кислоты [33].

*Транспептидация лейцинамида, катализируемая лейцинаминопептидазой.* К 0,3 М раствору лейцинамида в 0,05 М трис-HCl-буфере, pH 8,5, приготовленном на H<sub>2</sub><sup>18</sup>O, добавляли раствор лейцинаминопептидазы (концентрация в смеси  $5 \cdot 10^{-7}$  М) и инкубировали при 22° С 2 мин. Смесь быстро замораживали при -70° С и лиофилизовали. Разделение компонентов осуществляли на бумаге Whatman 3 MM хроматографией в системе *n*-бутанол — вода — муравьиная кислота, 8 : 1 : 1. Зоны, соответствующие Leu-Leu-NH<sub>2</sub> и Leu-NH<sub>2</sub>, вырезали и элюировали 0,1 М уксусной кислотой. Препараты дополнительно очищали хроматографией на колонке с сефадексом G-10. Аналогично проводили реакцию с  $^{18}\text{O}$ -лейцинамидом, используя H<sub>2</sub><sup>16</sup>O.

*Определение скорости обмена кислорода в ацетил-L-фенилаланине.*

А) 4 мг N-([2- $^{14}\text{C}$ ]ацетил)-L-фенилаланина растворяли в 1 мл H<sub>2</sub><sup>18</sup>O (75 ат.%) и добавляли 0,05 мл 2 М ацетатного буфера, pH 4,5, и 1 мг пепсина или 5 мг пепсина, иммобилизованного на аminosилохроме (содержание активного фермента 20%). Смесь инкубировали при 20° С в течение 1—6 ч, затем pH доводили до 10 и подкисляли до pH 2. Белок отделяли центрифугированием и супернатант экстрагировали этилацетатом. Ацетил-L-фенилаланин очищали хроматографией на пластинке с силикагелем и превращали в метиловый эфир действием диазометана.

Б) Опыт проводили как описано в «А», но с добавкой 10,7 мг метилового эфира L-(или D)-фенилаланил-аланил-аланина. Трипептид извлекали этилацетатом при pH 10, а ацетил-L-фенилаланин — тем же растворителем при pH 2. Анализ на  $^{18}\text{O}$  проводили в виде метилового эфира N-ацетил-L-фенилаланина.

*Определение скорости обмена кислорода в лейцине.* Лейцинаминопептидазу, активированную в течение 30 мин при 37° С 0,01 М раствором MgCl<sub>2</sub> [16], добавляли в смесь, содержащую H<sub>2</sub><sup>18</sup>O (75 ат.%), 0,1 М лейцин, 0,01 М MgCl<sub>2</sub> и 0,01 М NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 7,0). Конечная концентрация фермента 6,13 мкМ. Смесь инкубировали 17 мин при 37° С, затем быстро замораживали и лиофилизовали. Остаток сушили над P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> и анализировали масс-спектрометрически. Аналогичный опыт был проведен в присутствии 1 М NH<sub>4</sub>Cl.

*Включение тяжелого кислорода из H<sub>2</sub><sup>18</sup>O в пепсин.* 19 мг ацетил-L-фенилаланил-L-тирозина растворяли в 10 мл H<sub>2</sub><sup>18</sup>O, доводили до pH 4 ацетатом натрия и вносили 100 мг пепсина. Смесь инкубировали 30 мин при 37° С.



А) рН доводили до 5,6, добавляли 15 мг  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  и через 10 мин 9 мг диазоацетил-(2,4-динитрофенил)этилендиамина в 10 мкл ацетона. Смесь выдерживали 1 ч при 20° С. Остаточная активность составляла 10%. Смесь лиофилизировали и остаток растворяли в 10 мл 0,01 н. аммоний-ацетатного буфера, рН 5,8, и диализовали против того же буфера. Степень включения ингибитора определяли по поглощению при 360 и 280 нм ( $\epsilon_{360}$  16 000,  $\epsilon_{280}$  7180). Степень включения составляла  $1 \pm 0,1$  моль на моль белка. Смесь лиофильно высушивали, растворяли в воде и доводили рН до 10,5 конц.  $\text{NH}_4\text{OH}$ . Раствор выдерживали 72 ч при 45° С и фракционировали на колонке (1,5×80 см) с сефадексом G-25. Скорость элюции 12 мл/ч. Собирали фракцию гликолил-(2,4-динитрофенил)этилендиамина, лиофильно высушивали и анализировали на содержание  $^{18}\text{O}$ .

Б) Раствор пепсина (0,24 мМ) после окончания инкубации с Ac-Phe-Tyr разбавляли водой до 25 мл, доводили до рН 3,0 уксусной кислотой и добавляли 113 мг 1,2-эпокси-3-(*n*-нитрофеноксипропана. Смесь оставляли на 72 ч при 10° С. Остаточная активность пепсина 30%. Смесь лиофилизировали, остаток растворяли в 25 мл 0,01 н. аммоний-ацетатного буфера, рН 5,8, и диализовали. Степень включения ингибитора, определенная по поглощению при 315 и 280 нм ( $\epsilon_{315}$  11 000,  $\epsilon_{280}$  4960), составляла 1,7 моль на моль белка. Раствор лиофильно высушивали, растворяли в воде и доводили рН до 10,5 конц.  $\text{NH}_4\text{OH}$ , выдерживали 72 ч при 45° С и затем фракционировали на сефадексе G-25. Фракцию 1,2-диокси-3-(*n*-нитрофеноксипропана собирали, высушивали и анализировали на содержание  $^{18}\text{O}$ .

В) Пепсин после инкубации с Ac-Phe-Tyr обрабатывали диазонингибитором, как описано в «А», и после исчерпывающего диализа обрабатывали эпоксинингибитором, согласно «Б». Соотношение белок — диазонингибитор — эпоксинингибитор 1 : 0,8 : 1,7. Препарат гидролизovali по описанному выше методу и смесь гликолил-(2,4-динитрофенил)этилендиамина и 1,2-диокси-3-(*n*-нитрофеноксипропана анализировали масс-спектрометрически на содержание  $^{18}\text{O}$ .

Г) Инкубацию пепсина с Ac-Phe-Tyr в  $\text{H}_2^{18}\text{O}$  и ингибирование диазонингибитором проводили как в «А». По окончании ингибирования смесь лиофилизovali, растворяли в 10 мл 0,05 М трис-буфера, рН 7,5, и фракционировали на колонке с сефадексом G-25. Белковую фракцию очищали хроматографией на колонке с DEAE-целлюлозой (1,5×16 см), уравновешенной 0,05 М трис-буфером, рН 7,5, в градиенте 0,8 М  $\text{NaCl}$ . Белок обессоливали на колонке с сефадексом G-25 в аммоний-ацетатном буфере, рН 5,6, и лиофильно высушивали. Ингибированный пепсин растворяли в 0,1 М ацетатном буфере, рН 5,0 (концентрация 10 мг/мл), и добавляли 1/6 часть (от веса белка) препарата оризина. Гидролиз 16 ч вели при 37° С. Смесь экстрагировали (5×10 мл) *n*-бутанолом, экстракт сушили и упаривали. Остаток растворяли в этиловом спирте, наносили на полоску бумаги Whatman 3 ММ шириной 30 мм и подвергали электрофорезу в 0,1 М аммоний-форматном буфере, рН 2,3, в течение 2,5 ч при 70 В/см. По окончании электрофореза области, содержащие ингибитор, элюировали 10% уксусной кислотой, высушивали и определяли аминокислотный состав. Фракцию, содержащую только аспарагиновую кислоту, анализировали на содержание  $^{18}\text{O}$ .

Д) В контрольных опытах эпоксинингибитор подвергали гидролизу в  $\text{H}_2^{18}\text{O}$  [23] и в полученном диоле определяли содержание  $^{18}\text{O}$ . Препараты пепсина, ингибированные в отдельности диазо- и эпоксинингибиторами, подвергали щелочному гидролизу в условиях, описанных в «А», но в  $\text{H}_2^{18}\text{O}$ . Выделяли гликолил- и диольное производные и определяли в них содержание  $^{18}\text{O}$ .

*Определение содержания  $^{18}\text{O}$ .* Содержание  $^{18}\text{O}$  в образцах определялось хромато-масс-спектрометрией на приборе LKB 9000; масс-спектрометрией с ионизацией полем на приборе Varian MAT CN-5; осколочной масс-спектрометрией на приборе MX-1303.

Содержание  $^{18}\text{O}$  рассчитывали по формуле

$$^{18}\text{O} (\text{ат. \%}) = \frac{|M+2|^+}{|M|^+ + |M+2|^+} \cdot 100,$$

где  $|M|^+$  и  $|M+2|^+$  — интенсивности пиков, соответствующих фрагментам, содержащим изотопы  $^{16}\text{O}$  и  $^{18}\text{O}$ . В опытах по обмену кислорода в ацетилфенилаланине и лейцине измерялась интенсивность пиков  $|M|^+$ ,  $|M+2|^+$  и  $|M+4|^+$ , доля обмена ( $N$ )  $^{18}\text{O}$  определялась по формуле

$$N = \frac{\left| \frac{M+2}{2} \right|^+ + |M+4|^+}{|M|^+ + |M+2|^+ + |M+4|^+}. \quad (6)$$

Авторы выражают свою благодарность В. Л. Садовской и О. С. Решетовой за помощь в съемке масс-спектров и М. Ю. Фейгиной за выполнение N-концевого анализа соединений.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Antonov V. K. (1977) *Advances Exptl Med. and Biol.*, **95**, 179–198.
2. Antonov V. K., Ginodman L. M., Kapitannikov Yu. V., Barshevskaya T. N., Gurova A. G., Rumch L. D. (1978) *FEBS Lett.*, **88**, 87–90.
3. Антонов В. К., Явашев Л. П., Волкова Л. И., Садовская В. Л., Гинодман Л. М. (1979) *Биоорган. химия*, **5**, 1427–1429.
4. Bender M. L., Kezdy F. J. (1964) *J. Amer. Chem. Soc.*, **86**, 3704–3714.
5. Lowe G., Williams A. (1965) *Biochem. J.*, **96**, 199–204.
6. Erand R. M. (1969) *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, **37**, 313–318.
7. Лякишева А. Г., Гинодман Л. М., Антонов В. К. (1973) *Молекулярн. биология*, **7**, 810–816.
8. Fasters J., Fersht A. R. (1973) *Biochemistry*, **12**, 2025–2034.
9. Bender M. L., Ginger R. D., Unik J. P. (1958) *J. Amer. Chem. Soc.*, **80**, 1044–1048.
10. Гинодман Л. М., Мальцев Н. И., Орехович В. П. (1966) *Биохимия*, **31**, 1073–1078.
11. Breslow R., Wernick D. L. (1977) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **74**, 1303–1307.
12. Fruton J. S., Fugii S., Knappenberger M. H. (1961) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **47**, 759–765.
13. Fruton J. S. (1976) *Advances. enzymol. and related subjects biochem.*, **44**, 1–35.
14. Takahashi M., Wang T. T., Hofmann T. (1974) *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, **57**, 39–46.
15. Гусинский Г. М., Лемберг И. X., Капитанников Ю. В., Гинодман Л. М. (1979) *Докл. АН СССР*, **249**, 1002–1005.
16. Hanson H., Lasch J. (1967) *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.*, **348**, 1525–1539.
17. Крылова Ю. И., Козлов Л. В., Антонов В. К., Ганна Б. С., Датунашвили Е. И., Павленко Н. М. (1976) *Биоорган. химия*, **2**, 273–278.
18. Звяченко А. А., Румиц Л. Д., Антонов В. К. (1977) *Биоорган. химия*, **3**, 1663–1670.
19. Borsook H., Dubnoff J. W. (1940) *J. Biol. Chem.*, **132**, 307–324.
20. Hanson H., Frohne M. (1976) *Methods in Enzymol.* (Lorand L. ed.), vol. 45, pp. 504–521, Acad. Press, N. Y. — San Francisco — London.
21. Гинодман Л. М., Валуева Т. А., Козлов Л. В., Шкаренкова Л. С. (1969) *Биохимия*, **34**, 211–213.
22. Stepanov V., Vaganova T. I. (1968) *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, **31**, 825–830.
23. Tang J. (1971) *J. Biol. Chem.*, **246**, 4510–4517.
24. James M. N., Hsu I. N., Delbaere L. I. J. (1977) *Nature*, **267**, 808–813.
25. Weaver L. H., Kester W. R., Matthews B. W. (1977) *J. Mol. Biol.*, **114**, 119–132.
26. Breslow R., Wernick D. L. (1976) *J. Amer. Chem. Soc.*, **98**, 259–261.
27. Sachdev G. P., Fruton J. S. (1975) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **72**, 3424–3427.
28. Anson M. L. (1938) *J. Gen. Physiol.*, **22**, 79–84.
29. Fruton J. S., Johnston R. B., Fried M. (1951) *J. Biol. Chem.*, **190**, 39–53.
30. Smith E. L., Spackman D. H. (1955) *J. Biol. Chem.*, **212**, 255–262.
31. Baker L. E. (1951) *J. Biol. Chem.*, **193**, 809–814.
32. Kalbacher H., Konig W. A., Valtor W. (1973) *Z. physiol. Chem.*, **356 S**, 1827–1829.
33. Мирошников А. И., Кирюшкин А. А., Овчинников Ю. А. (1970) *Ж. общ. химии*, **40**, 429–442.

Поступила в редакцию  
27.VII.1979

## HOW TO DISTINGUISH THE COVALENT AND GENERAL BASE MECHANISMS OF ENZYMIC HYDROLYSIS?

ANTONOV V. K., GINODMAN L. M., RUMSH L. D., KAPITANNIKOV Yu. V.,  
BARSHEVSKAYA T. N., YAVASHEV L. P., GUROVA A. G., VOLKOVA L. I.

*M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, Academy  
of Sciences of the USSR, Moscow*

The methods have been developed to distinguish the covalent and general base mechanisms of hydrolysis catalyzed by proteolytic enzymes. The approach is based in the  $^{18}\text{O}$  incorporation into the products of the enzyme catalyzed acyl-transfer transpeptidation, non-hydrolysed substrate, or into catalytically active groups of the enzyme, as well as on the comparison of the  $^{18}\text{O}$  exchange rates for carboxylic group of the acyl product with or without the second, amine product of hydrolysis. These methods are used for analysis of pepsin and leucine aminopeptidase action. A peptide bond cleavage catalyzed by these enzymes obeys the general base mechanism: their catalytically active groupings facilitate the proton abstraction from the water molecule attacking the susceptible bond. The structure of intermediates for this type of catalysis is discussed.

---