



УДК 577.156.035

## СВЕТОЧУВСТВИТЕЛЬНЫЕ ПРОИЗВОДНЫЕ СУБТИЛИЗИНА

III. ГИДРОЛИЗ СУБТИЛИЗИНОМ *n*-НИТРОФЕНИЛОВЫХ ЭФИРОВ  
КОРИЧНЫХ КИСЛОТ \**Кост О. А., Газанская Н. Ф., Каткова В. А.**Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова,  
химический факультет*

Изучен гидролиз стереоизомеров *n*-нитрофениловых эфиров коричной, *n*-нитрокоричной и иодида *n*-триметиламмониокоричной кислот под действием субтилизина шт. 72. *цис*-Изомеры субстратов гидролизуются ферментом в 10–40 раз медленнее соответствующих *транс*-изомеров и в отличие от *цис*-диннамоилимидазола не являются  $k_{\text{кат}}$ -ингибиторами субтилизина. *n*-Нитрофениловые эфиры коричных кислот могут быть использованы для создания светочувствительных систем. Ингибиторный анализ ферментативного гидролиза производных коричной кислоты с разными уходящими группами показал их связывание в разных сорбционных центрах фермента.

Использование ферментов в светочувствительных системах возможно при условии кинетической стабильности их светочувствительных производных и высокой каталитической активности. Известны светочувствительные циннамоильные производные  $\alpha$ -химотрипсина и трипсина [2–5]. Была показана также возможность использования субтилизинов [6], значительно более активных и менее специфичных протеиназ, что весьма важно при подборе систем визуализации латентного изображения. Однако гидролиз стереоизомеров *N*-диннамоилимидазола, катализируемый субтилизинами, осложняется быстрой инактивацией *цис*-ацилфермента, поскольку в его молекуле проходит вторичная химическая реакция двойной связи остатка коричной кислоты с остатком гистидина, находящегося в области активного центра [4, 6].

Мы предположили, что использование в качестве субстратов-модификаторов эфиров коричной кислоты с электроноакцепторными заместителями в пара-положении фенильного кольца может снизить реакционную способность двойной связи. Кроме того, нам казалось интересным не только получить светочувствительную ферментативную систему на основе этих производных, но и выяснить влияние названных заместителей в ацильной части на способность субстрата выступать в качестве  $k_{\text{кат}}$ -ингибитора [1]. Для работы были выбраны *n*-нитрофениловые эфиры иодида *n*-триметиламмониокоричной кислоты (I) и *n*-нитрокоричной кислоты (II).

*транс*-Изомер эфира (I) легко ацилирует субтилизины шт. 72 и Novo в интервале pH 6–9 с практически мгновенным выбросом *n*-нитрофенола, пропорциональным концентрации активных молекул фермента. Субстрат может служить титрантом активных центров субтилизинов, несмотря на:

\* Сообщение II см. [1].

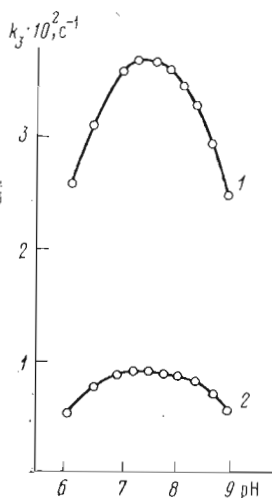


Рис. 1

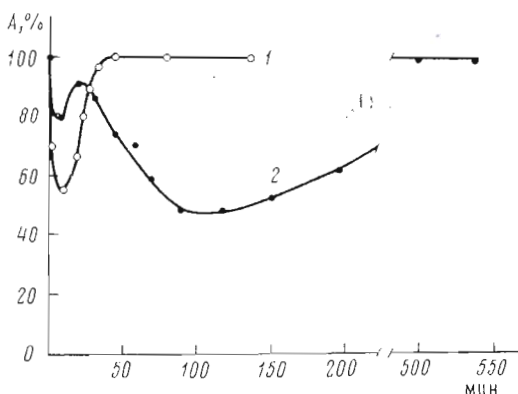


Рис. 2

Рис. 1. Зависимость  $k_{кат}$  реакции гидролиза *транс*-изомера субстрата (1), катализируемой субтиллизином шт. 72 (1) и субтиллизином Novo (2), от pH

Рис. 2. Изменение активности ( $A$ ) субтиллизина шт. 72 во времени при взаимодействии с *транс*-изомером (1) (1) и фотостационарной смесью *транс*- и *цис*-изомеров (1) (2). Концентрация фермента 0,186 мкМ, субстратов 42 мкМ; 0,05 М фосфатный буфер, pH 6,9; 6,25% диметилсульфоксида. Активность субтиллизина определяли по гидролизу этилового эфира *N*-ацетилтирозина (10 мМ) при pH 7

довольно быструю последующую стадию дезацилирования. В исследуемой реакции  $k_2 \gg k_3$ , что дает возможность определять константу дезацилирования,  $k_3 = k_{кат}$ , по накоплению *p*-нитрофенола в системе.

Гидролиз эфира (I) как субтиллизином шт. 72, так и субтиллизином Novo характеризуется очень низкими для обоих ферментов значениями  $K_m(каж) < 1$  мкМ и аномальной pH-зависимостью скорости реакции. Максимум кривой pH-зависимости находится в районе pH 7,5 (рис. 1), в то время как обычно оптимальная скорость гидролиза синтетических субстратов субтиллизином наблюдается при pH 8,5—9 [6—8]. В настоящее время мы не можем дать удовлетворительного объяснения полученному результату. Заметим также, что субтиллизин Novo в 4 раза менее активен, чем субтиллизин шт. 72.

При гидролизе субтиллизинами фотостационарной смеси стереоизомеров эфира (I) хорошо различимы быстрая стадия, соответствующая гидролизу *транс*-изомера, и более медленная, соответствующая гидролизу *цис*-изомера субстрата. При этом в случае *цис*-изомера  $k_2 \gg k_3$ .

Субтиллизин шт. 72 проявляет большую стереоспецифичность по отношению к гидролизу стереоизомеров эфира (I), чем субтиллизин Novo (таблица). Однако разница в константах дезацилирования  $k_3_{транс}/k_3_{цис} \approx 10$  недостаточно велика для того, чтобы можно было получить удовлетворительную светочувствительную систему.

*транс*-Изомер (II) также легко ацилирует субтиллизины с выбросом *p*-нитрофенола, пропорциональным концентрации активных молекул фермента. Однако быстрое дезацилирование ацилфермента ограничивает применение этого субстрата при титровании активных центров субтиллизинов.

Ввиду малой растворимости субстрата (II) ферментативный гидролиз его *транс*-изомера изучали в присутствии диметилсульфоксида (до 23,3%). Специальным экспериментом было показано, что присутствие растворителя не влияет на величины констант дезацилирования *транс*-циннамоил-субтиллизинов.

Кинетические параметры гидролиза субтилизином шт. 72 стереоизомеров *n*-нитрофениловых эфиров коричных кислот

Субстрат *	$K_m$ , мкМ	$k_{кат} \cdot 10^2$ , с <sup>-1</sup>	$k_3 \cdot 10^2$ , с <sup>-1</sup>
<i>транс</i> -(I)	<1 (1) **	3,56	3,56 (0,92)
<i>цис</i> -(I)	17 (22)	0,33	0,33 (0,27)
<i>транс</i> -(II)	48	23	23
<i>цис</i> -(II)	1	0,267	—
<i>транс</i> -(III)	23	12	12
<i>цис</i> -(III)	1	0,094	0,297

\* Условие: для эфиров (I) рН 7,5; для (II) рН 8,0; 10% диметилсульфонид; для (III) рН 8,0; 23,3% диметилсульфонид.

\*\* В скобках для эфиров (I) приведены соответствующие величины констант для гидролиза, катализируемого субтилизином Novo.

Зависимость скорости гидролиза *транс*-изомера (II) субтилизином шт. 72 от рН среды имеет обычную сигмоидную форму с  $pK_a$  7,5,  $k_{з\text{ пред}}$  0,32 с<sup>-1</sup>.

Гидролиз *цис*-изомера (II) изучали в растворе смеси изомеров, в котором предварительно с помощью  $\alpha$ -химотрипсина был расщеплен *транс*-изомер (II) [4]. После окончания гидролиза *транс*-изомера в реакционную смесь добавляли субтилизин и следили за кинетикой реакции спектрофотометрически по накоплению *n*-нитрофенола в системе (таблица).

Для создания светочувствительной системы важна существенная разница значений констант гидролиза ферментом *транс*- и *цис*-изомеров субстрата-модификатора, а также разница значений константы дезацилирования субстрата-модификатора и константы гидролиза субстрата-проявителя. Увеличить разницу в константах можно путем подбора высокоактивного проявителя, а также некоторым снижением скорости гидролиза модификатора.

На основании имеющихся в литературе данных [9] мы ожидали, что введение нитрогруппы в орто-положение фенильного кольца *транс*-коричной кислоты значительно замедлит скорость ферментативного гидролиза субстрата, как это наблюдалось при гидролизе этиловых эфиров ацетил-*n*-тирозина и ацетил-*o*-тирозина (снижение  $k_{кат}$  в 200 раз в случае орто-производного). Однако найденная нами величина константы дезацилирования при ферментативном гидролизе *n*-нитрофенилового эфира *o*-нитрокоричной кислоты  $k_{з\text{ пред}}$  0,24 с<sup>-1</sup> неожиданно оказалась сходной с величиной константы дезацилирования при гидролизе *транс*-изомера (II) (см. выше). Авторы работы [3] априори полагали по аналогии с  $\alpha$ -химотрипсином, что скорость гидролиза лимитируется стадией дезацилирования. Но, как следует из наших данных [7], субтилизины гидролизуют этиловые и метиловые эфиры *N*-ациламинокислот с практически равными значениями констант ацилирования и дезацилирования фермента, т. е.  $k_2 = k_3$ . Таким образом, не исключено, что снижение  $k_{кат}$  в случае орто-производного тирозина связано с затруднениями при ацилировании. Возможно также, что в случае тирозина появление заместителя в орто-положении кольца ограничивает свободу вращения и приводит к вышеуказанному эффекту, в то время как для производных коричной кислоты, представляющих собой довольно жесткие планарные системы, значительно менее подвижные, чем тирозин, влияние орто-заместителя может быть существенно меньшим.

Оба изученных эфира, (I) и (II), не вызывают необратимой инактивации субтилизина шт. 72. Это видно из экспериментов по обработке раствора фермента фотостационарной смесью *транс*- и *цис*-изомеров субстрата (I) при рН 6,9 (рис. 2). В опыте следили за изменением активности фер-

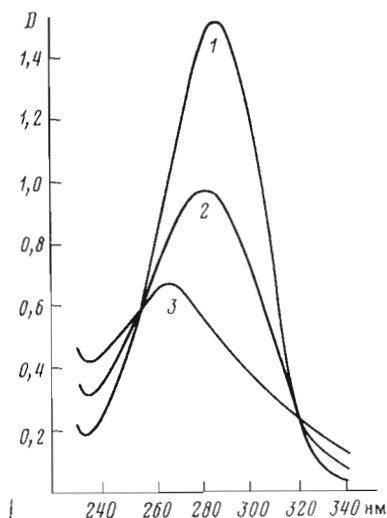


Рис. 3

Рис. 3. Спектры поглощения в ацетонитриле *транс*-изомера (III) (I) (124 мкМ), фотостационарной смеси изомеров (III) состава *транс*:*цис* 0,82 (2) и спектр *цис*-изомера (III) (3), рассчитанный на основании спектров I и 2

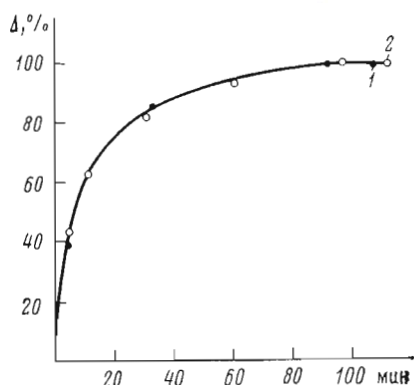


Рис. 4

Рис. 4. Изменение концентрации *транс*-изомера (III) (I) и изменение амплитуды разностного спектра поглощения (2) (проценты к максимальному измерению) во времени при облучении раствора *транс*-изомера (III) (93 мкМ)

Рис. 5. Зависимость  $k_{кат}$  ( $k_3$ ) гидролиза *транс*-изомера (III) (I) и *N*-*транс*-циннамоилимидазола (2), катализируемого субтилизином шт. 72, от pH

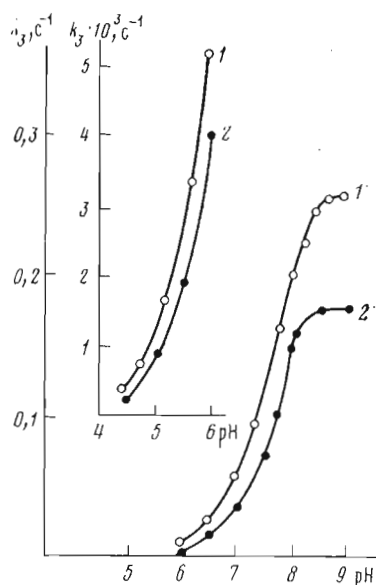


Рис. 5

мента по этиловому эфиру *N*-ацетил-*L*-тирозина. На рис. 2 хорошо видны две фазы взаимодействия субтилизина с фотостационарной смесью. Быстрая фаза соответствует гидролизу *транс*-изомера, медленная — гидролизу *цис*-изомера. Активность субтилизина во всех случаях возвращалась до прежнего уровня. При этом количество *n*-нитрофенола, выделившегося в результате реакции, соответствовало теоретическому. Таким образом, в отличие от *цис*-циннамоилимидазола [4, 6] субстраты (I) и (II) не являются  $k_{кат}$ -ингибиторами субтилизина.

Показанное отсутствие необратимой инактивации могло быть следствием введения в молекулу электроакцепторных заместителей, однако мы не исключали влияния каких-либо иных факторов. Для проверки был исследован гидролиз субтилизином шт. 72 *n*-нитрофенилового эфира коричной кислоты (III) в сравнении с гидролизом *N*-циннамоилимидазола.

В отдельных экспериментах была охарактеризована *транс* — *цис*-фотоизомеризация эфира (III), за кинетикой которой следили по изменению спектров облученных УФ-светом растворов в абс. ацетонитриле, как описано в работе [5]. Исходный *транс*-изомер имеет максимум поглощения при 286 нм;  $\epsilon_{\text{макс}} 1,22 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}\text{см}^{-1}$  (рис. 3). При облучении его раствора наблюдали уменьшение поглощения и сдвиг максимума спектра поглощения в сторону более коротких длин волн, что характерно для *транс* — *цис*-изомеризации. Наличие изобестических точек говорит о том, что при этом идет только одна реакция. Ферментативный гидролиз облучаемого субстрата позволяет определить соотношение стереоизомеров в смеси, так как гидролиз *цис*-изомера проходит значительно медленнее, и установить корреляцию между изменением спектра и концентрацией *транс*-изомера в смеси в процентах к максимальному изменению при облучении (рис. 4). Зная соотношение стереоизомеров в смеси, можно на основании данных рис. 3 (спектры 1 и 2) рассчитать спектр *цис*-изомера (спектр 3), который имеет следующие параметры:  $\lambda_{\text{макс}} 267 \text{ нм}$ ;  $\epsilon_{\text{макс}} 5,5 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}\text{см}^{-1}$ .

Оказалось, что *транс*-изомер (III) также легко ацилирует субтилизин шт. 72 с выбросом *n*-нитрофенола, пропорциональным концентрации активных центров фермента. Ферментативный гидролиз субтилизином шт. 72 характеризуется значением  $pK_a 7,5$ ,  $k_{\text{кат(пред)}} 0,256 \text{ с}^{-1}$ ,  $K_{\text{м(наж)}} \text{ рН } 8,9 23 \text{ мкМ}$  (рис. 5).

Кинетический анализ медленной стадии ферментативного гидролиза фотостационарной смеси *транс*- и *цис*-изомеров (III) дал следующие значения кинетических констант для *цис*-изомера:  $k_{\text{кат}} 0,0019 \text{ с}^{-1}$ ,  $K_{\text{м(наж)}} 2,4 \text{ мкМ}$  (рН 7,5; 10% диметилсульфоксида);  $k_{\text{кат}} 0,00094 \text{ с}^{-1}$ ,  $K_{\text{м(наж)}} 1 \text{ мкМ}$  (рН 7,5; 23,3% диметилсульфоксида). Увеличение концентрации органического растворителя значительно снижает величину  $k_{\text{кат}}$ , что служит косвенным указанием на то, что  $k_{\text{кат}} \neq k_3$ . Константа дезацилирования при гидролизе субтилизином шт. 72 *цис*-изомера (III), определенная независимо (см. «Экспериментальную часть»), равна  $0,003 \text{ с}^{-1}$  при рН 7,5. Рассчитанная на основе приведенных выше данных величина константы ацилирования составила  $0,005 \text{ с}^{-1}$  (в присутствии 10% органического растворителя). Таким образом, в отличие от *транс*-изомера, ферментативный гидролиз которого лимитируется стадией дезацилирования, *цис*-изомер (III) гидролизуется субтилизином с близкими значениями  $k_2$  и  $k_3$ . Отношение  $k_3 \text{ транс}/k_3 \text{ цис} \approx 40$ .

Удивительно, что в отличие от имидазольного производного *цис*-коричной кислоты *цис*-изомер (III) не является, как и эфиры (II) и (I),  $k_{\text{кат}}$ -ингибитором субтилизина, так как не обнаружено необратимой инактивации фермента при его взаимодействии с фотостационарной смесью стереоизомеров (III).

Вместе с тем при гидролизе субтилизином шт. 72 *N*-*транс*-циннамоилимидазола и *транс*-изомера (III) константы дезацилирования во всем исследованном интервале значений рН 4,4—8,9 различаются, несмотря на общую ацильную часть субстратов (рис. 5). Казалось бы, характер уходящей группы не должен оказывать влияния на величину константы дезацилирования ацилфермента, как это и наблюдается, например, в случае  $\alpha$ -химотрипсина при гидролизе тех же субстратов [10].

Чем можно объяснить столь различное поведение субтилизина по отношению к двум субстратам, различающимся лишь характером уходящей группы?

Объяснение, вероятно, нужно искать в том, что субтилизины, обладая одним каталитическим центром, имеют по крайней мере два центра продуктивного связывания субстратов. Известно, что, когда фермент реагирует с пептидными субстратами или с этиловым эфиром *N*-ацетил-*L*-тирозина, связывание происходит в центре А, а *N*-*транс*-циннамоилимидазол и *N* $^{\alpha}$ -бензоил-*L*-аргинин связываются в центре В [11]. Похоже, что замена имидазольной группы в молекуле *N*-циннамоилимидазола на *n*-нитрофе-



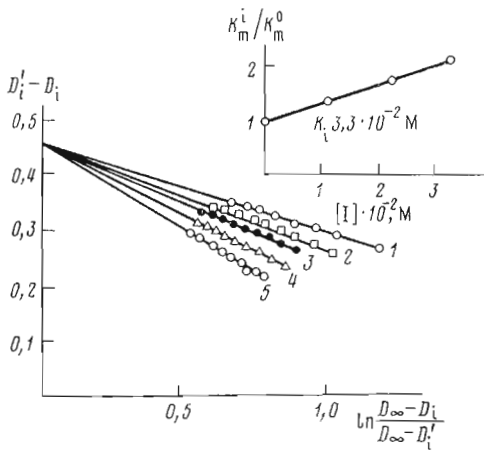


Рис. 6

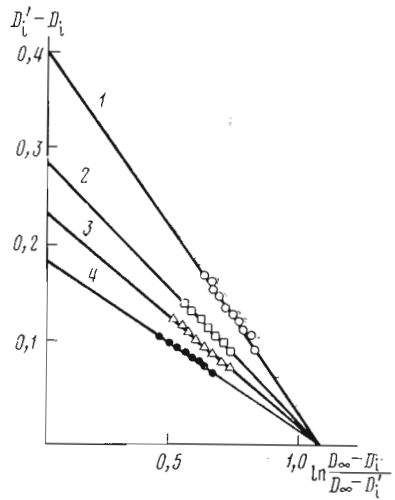


Рис. 8

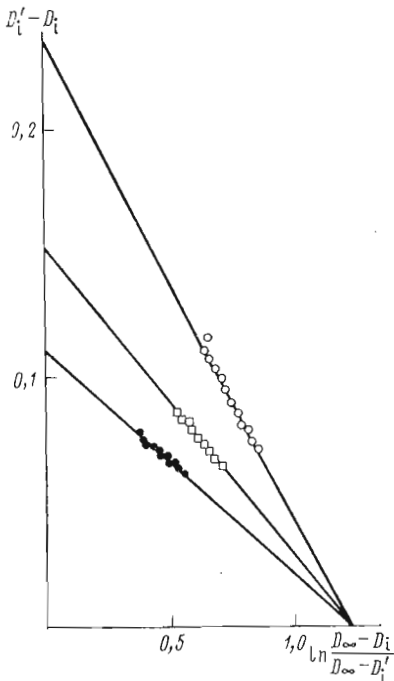


Рис. 7

Рис. 6. Конкурентное ингибирование (а)  $N^\alpha$ -бензоил- $L$ -аргинином в концентрации 5,5 (2), 11 (3), 22,1 (4) и 33,1 мМ (5) гидролиза  $N$ -*транс*-циннамолимидазола (10 мМ) субтилизином шт. 72 (65 мкМ) (1); 0,1 М фосфатный буфер, рН 7,5; 6,6% диметилсульфоксида;  $\Delta$  16 мин (а);  $\circ$  — определение  $K_i$ . Расчет по методике [16]

Рис. 7. Неконкурентное ингибирование  $N^\alpha$ -бензоил- $L$ -аргинином в концентрации 10,7 мМ (2) и 33,4 мМ (3) гидролиза *транс*-изомера (II) (27 мкМ) субтилизином Novo (0,94 мкМ) (1); 0,1 М фосфатный буфер, рН 7,5; 13,3% диметилсульфоксида;  $\Delta$  5 мин

Рис. 8. Неконкурентное ингибирование  $N^\alpha$ -бензоил- $L$ -аргинином в концентрации 11 (2), 22,1 (3), 33,1 мМ (4) гидролиза *цис*-изомера (I) (10 мМ) субтилизином шт. 72 (7,9 мкМ) (1); 0,1 М фосфатный буфер, рН 7,5; 6,6% диметилсульфоксида;  $\Delta$  22 мин

пильную привела к изменению центра связывания, что вызвало как изменение значения  $k_3$ , так и элиминирование  $k_{\text{нрт}}$ -ингибирования *цис*-изомером субстрата.

Чтобы выяснить это, мы исследовали характер ингибирования  $N^\alpha$ -бензоил- $L$ -аргинином гидролиза субтилизинами шт. 72 и Novo  $N$ -циннамолимидазола и  $n$ -нитрофениловых эфиров коричневых кислот. Как и следовало ожидать,  $N^\alpha$ -бензоил- $L$ -аргинин строго конкурентно ингибирует гидролиз  $N$ -*транс*-циннамолимидазола обоими субтилизинами (рис. 6). Гидролиз *транс*-изомеров (II) и (III) ингибируется им неконкурентно (рис. 7). Характер ингибирования  $N^\alpha$ -бензоил- $L$ -аргинином гидролиза субтилизинами *транс*-изомера (I) определить не удалось, так как  $K_m$  для этого субстрата очень мала ( $<1$  мкМ), а  $K_i$ , напротив, велика (33 мМ при рН

7,5, субтилизин шт. 72). Однако гидролиз *цис*-изомера (I) ингибируется  $N^{\alpha}$ -бензоил-*L*-аргонином также неконкурентно (рис. 8).

Полученные данные позволяют заключить, что природа уходящей группы субстрата может играть значительную роль в катализе субтилизинами вследствие перераспределения субстратов на сорбционных центрах А и В.

Для наших целей важно, что при использовании субстратов-модификаторов производных коричной кислоты, сорбирующихся на центре А, возможно создание светочувствительной ферментативной системы.

### Экспериментальная часть

В работе использовали субтилизины, продуцируемые разными штаммами *B. subtilis*.

Субтилизин из *B. subtilis* шт. 72, предоставленный нам Л. И. Орещенко (ВНИИбиотехника), дополнительной очистке не подвергался. Процентное содержание активных молекул фермента, определенное титрованием его навески *N-транс*-циннамоилимидазолом аналогично методике [12], составляло 52%.

Субтилизин Novo (субтилопептидаза А; КФ 3.4.4.16; Serva, ФРГ) имел 70% активных молекул по результатам титрования *N-транс*-циннамоилимидазолом.

Концентрацию субтилизина в растворах определяли по навеске с учетом молекулярного веса 27 600 и процентного содержания активных молекул.

*n*-Нитрофениловые эфиры коричной, *n'*-нитрокоричной и *o*-нитрокоричной кислот синтезированы нами по методу [13]. Иодид *n*-нитрофенилового эфира *n*-триметиламмонийкоричной кислоты синтезирован в нашей лаборатории по методу [14]. *N-транс*-Циннамоилимидазол синтезирован по методике работы [15].

Действительное содержание субстратов в синтезированных препаратах устанавливали путем проведения полного ферментативного гидролиза и определения конечной концентрации выделившегося продукта.

Определение эстеразной активности субтилизинов по этиловому эфиру *N*-ацетилтирозина проводили с помощью рН-ста (Radiometer, Дания) при 25° С. Спектральные измерения осуществляли с помощью спектрофотометра «Hitachi 124» (Япония).

Источником УФ-света служила ртутная лампа ДРШ-250 со светофильтром УФС-2 (диапазон 290–360 нм) или УФС-6 (диапазон 320–380 нм).

*Титрование активных центров* субтилизинов *n*-нитрофениловыми эфирами коричных кислот проводили аналогично работе [12]. При этом концентрация фермента составляла 4–20 мкМ, а концентрация субстрата 50–100 мкМ.

Коэффициенты молярной экстинкции *n*-нитрофенола при различных значениях рН были рассчитаны на основе значения  $\epsilon_{\lambda 00}$  18 320 М<sup>-1</sup>см<sup>-1</sup> для фенолят-иона и  $pK_a$  7,04 [12].

*Выделение транс-циннамоилсубтилизина* проводили при помощи гель-фильтрации на колонке (2×7 см) с молселектом Г-25 (Reanal, Венгрия), уравновешенным 0,1 М ацетатным буфером, рН 4,4, содержащим 0,05 М СаСl<sub>2</sub>, реакционной смеси субтилизина шт. 72 (20 мкМ) с эфиром (III) (165 мкМ). За кинетикой дезацилирования выделенного фермента следили, записывая на спектрофотометре при 250 нм полную кинетическую кривую дезацилирования (25° С, рН 4,4).

*Фотоизомеризацию* эфира (I) проводили в 1-см кювете в 1 мМ НСl при 25° С. Фотоизомеризацию эфиров (II) и (III) проводили в диметилсульфоксиде или абс. ацетонитриле при 25° С.

*Кинетику гидролиза субтилизинами n-нитрофениловых эфиров коричных кислот* изучали при рН 6,1–8,9. В кюветы спектрофотометра поме-

щали по 2,2 мл 0,1 М фосфатного буфера с соответствующим значением рН, 0,6 мл диметилсульфоксида и по 0,1 мл раствора субстрата в диметилсульфоксиде (конечная концентрация 15–100 мкМ). Затем в кювету сравнения вносили 0,1 мл 0,1 М NaCl, а в рабочую кювету — 0,1 мл раствора субтилизина в 0,1 М NaCl (конечная концентрация 0,5–1,2 мкМ субтилизина шт. 72 или 1,8–2,5 мкМ субтилизина Novo). Записывали полную кинетическую кривую при 400 нм. Результаты обсчитывали аналогично работе [16]. При гидролизе эфира (I) субстрат растворяли в 1 мМ HCl и диметилсульфоксид в кюветы не добавляли.

*Кинетику образования циннаматона* при гидролизе субтилизином шт. 72 субстрата (III) изучали при рН 4,5–7,5. В кювету спектрофотометра, содержащую 2,2 мл 0,1 М ацетатного или фосфатного буфера с соответствующим значением рН, добавляли 0,6 мл диметилсульфоксида и 0,1 мл раствора субтилизина в 0,1 М KCl (конечная концентрация 16–30 мкМ), затем в реакционную смесь добавляли 0,1 мл раствора субстрата в диметилсульфоксиде (конечная концентрация 12–20 мкМ) и после перемешивания начинали запись кривой дезацилирования при 250 нм.

При взаимодействии субтилизина шт. 72 с фотостационарной смесью стереоизомеров *n*-нитрофениловых эфиров коричных кислот конечная концентрация фермента составляла 0,073–3,6 мкМ, общая концентрация *транс*- и *цис*-изомеров субстрата — 42–570 мкМ. Реакцию вели в 0,05 М фосфатном буфере, рН 6,9. В случае субстратов (II) и (III) в реакционной смеси присутствовало 6,25% диметилсульфоксида.

Для определения кинетических констант гидролиза субтилизином шт. 72 *цис*-эфира (II) фотостационарную смесь предварительно гидролизывали  $\alpha$ -химотрипсином: к 2,6 мл 0,1 М фосфатного буфера, рН 8,0, добавляли 0,3 мл облученного раствора субстрата (конечная концентрация 32 мкМ) в диметилсульфоксиде и 0,1 мл раствора  $\alpha$ -химотрипсина (конечная концентрация 5 мкМ) в том же буфере. За реакцией следили спектрофотометрически при 400 нм. По окончании гидролиза *транс*-изомера субстрата (выход кривой накопления продукта на плато) в систему вводили 0,1 мл раствора субтилизина (конечная концентрация 1 мкМ) в 0,1 М KCl, записывали полную кинетическую кривую гидролиза *цис*-эфира (II) при 400 нм.

При определении кинетических констант гидролиза *цис*-изомера (I) реакцию вели в 0,1 М фосфатном буфере, рН 7,5; концентрация фермента составляла 1,2–2,4 мкМ для субтилизина шт. 72 и 10 мкМ для субтилизина Novo; общая концентрация стереоизомеров субстрата 0,2 мМ. Обсчитывали результаты второй (медленной) стадии гидролиза.

Для определения кинетических констант гидролиза *цис*-изомера (III) субтилизином шт. 72 реакцию вели в 0,1 М фосфатном буфере, рН 7,5, в присутствии 10–23,3% диметилсульфоксида; концентрация фермента составляла 0,5–6 мкМ; общая концентрация стереоизомеров субстрата 20–250 мкМ. Обсчитывали второй (медленный) участок кривой накопления продукта гидролиза во времени.

Константу дезацилирования *цис*-циннамоилсубтилизина при рН 7,5 определяли следующим образом: из реакционной смеси, содержащей 1,31 мкМ субтилизина шт. 72 и 0,12 мМ фотостационарную смесь *транс*- и *цис*-стереоизомеров (III), рН 7,0, отбирали пробы 0,1 мл и вносили в ячейку рН-стата с 0,01 М раствором этилового эфира *N*-ацетилтирозина в 0,1 М KCl, рН 7,5. Записывали на рН-стате кривую увеличения активности фермента до гидролизу последнего во времени.

Результаты экспериментов по ингибированию *N*- $\alpha$ -бензоил-*L*-аргинином гидролиза субтилизинами субстратов — производных коричных кислот обсчитывали по методике [16]. Концентрацию ингибитора варьировали в пределах 0–35,4 мМ, концентрация фермента составляла 0,6–8 мкМ, концентрация субстратов 20–250 мкМ (рН 7,5), 0,1 М фосфатный буфер,



диметилсульфоксид до 23,3%. Записывали полные кинетические кривые гидролиза субстратов субтилизинами в присутствии различных концентраций ингибитора при 335 нм (при гидролизе *N*-транс-циннамоиллимидазола) или при 400 нм (при гидролизе *p*-нитрофениловых эфиров коричных кислот).

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Кост О. А., Казанская Н. Ф., Руденская Г. И. Светочувствительные производные субтилизина. II. *cis*-Циннамоиллимидазол —  $k_{cat}$ -ингибитор субтилизина. — Биоорган. химия, 1980, т. 6, № 12, с. 1813—1816.
2. Березин И. В., Варфоломеев С. Д., Мартинек К. *Cis-trans*-изомеризация циннамоил- $\alpha$ -химотрипсина под действием света и моделирование молекулярных механизмов зрительной рецепции. — Докл. АН СССР, 1970, т. 193, № 4, с. 932—935.
3. Березин И. В., Айсина Р. Б., Бронников Г. Е., Казанская Н. Ф. Активация трипсиногена с помощью светочувствительного *cis*-циннамоилтрипсина. — Биоорган. химия, 1975, т. 1, № 3, с. 402—406.
4. Varfolomeyev S. D., Klibanov A. M., Martinek K., Berezin I. V. Light-initiated enzymic activity caused by photostereoisomerization of *cis*-4-nitrocinnamoyl- $\alpha$ -chymotrypsin. — FEBS Lett., 1974, v. 15, № 2, p. 118—120.
5. Айсина Р. Б., Васильева Т. Е., Казанская Н. Ф., Тиходеева А. С., Березин И. В. Инципирование автоактивации трипсиногена с помощью светочувствительного транс-*p*-(*N,N,N*-триметиламино)-циннамоилтрипсина. — Биохимия, 1973, т. 38, № 3, с. 601.
6. Кост О. А., Казанская Н. Ф. Светочувствительные производные субтилизина. I. Взаимодействие субтилизина, шт. 72, со стереоизомерами *N*-циннамоиллимидазола. — Биоорган. химия, 1979, т. 5, № 7, с. 1102—1111.
7. Васенева О. В., Кост О. А., Казанская Н. Ф., Васильева Т. Е. Кинетические данные реакций гидролиза эфиров ацилированных аминокислот, катализируемых прото-субтилизинном (субтилизин *Vac. subtilis*, шт. 72, ВНИИ биотехника). — Вестн. Моск. ун-та, 1979, т. 20, № 3, с. 256—260.
8. Glazer A. N. Esteratic reactions catalyzed by subtilisins. — J. Biol. Chem., 1967, v. 242, № 2, p. 433—436.
9. Karasaki I., Ohno M. Kinetic specificities of BPN' and Carlsberg subtilisins. Mapping the aromatic binding site. — J. Biochem., 1978, v. 84, № 3, p. 531—538.
10. Bender M. L., Zerner B. The formation of the acyl-enzyme intermediate, *trans*-cinnamoyl- $\alpha$ -chymotrypsin, in the hydrolyses of non-labile *trans*-cinnamic acid esters. — J. Amer. Chem. Soc., 1961, v. 83, № 10, p. 2391—2392.
11. Wright C. S. Comparison of the active site stereochemistry and substrate conformation in  $\alpha$ -chymotrypsin and subtilisin BPN'. — J. Mol. Biol., 1972, v. 67, № 1, p. 151—163.
12. Bender M. L., Begué-Canton M. L., Blakeley R. L., Brubacher L. J., Feder J., Gunter C. R., Kézdy F. J., Killheffer J. V., Jr., Marshall T. H., Miller C. G., Roeske R. W., Stoops J. K. The determination of the concentration of hydrolytic enzyme solutions:  $\alpha$ -chymotrypsin, trypsin, papain, elastase, subtilisin and acetylcholinesterase. — J. Amer. Chem. Soc., 1966, v. 88, № 24, p. 5890—5913.
13. Alemany A., Corral C. Synthesis and testing of the insecticidal activity of some *p*-nitrocinnamates. — Anales Real Soc. Espan. Fis. Quim., Ser. B, 1962, v. 58, № 2, p. 563—564.
14. Knowles J. R., Preston J. M. A convenient titrant for  $\alpha$ -chymotrypsin and trypsin. — Biochim. et biophys. acta, 1968, v. 151, № 1, p. 290—292.
15. Schonbaum G. R., Zerner B., Bender M. L. The spectrophotometric determination of the operational normality of an  $\alpha$ -chymotrypsin solution. — J. Biol. Chem., 1961, v. 236, № 11, p. 2930—2935.
16. Клесов А. А., Березин И. В. Применение интегральной формы уравнения скорости для определения кинетических констант ферментативных реакций. — Биохимия, 1972, т. 37, № 1, с. 170—183.

Поступила в редакцию  
14.XI.1980

#### LIGHT-SENSITIVE DERIVATIVES OF SUBTILISIN. III. THE HYDROLYSIS OF *p*-NITROPHENYLCINNAMATES BY SUBTILISIN

KOST O. A., KAZANSKAYA N. F., KATKOVA V. A.

Chemistry Department, M. V. Lomonosov State University, Moscow

Stereoisomers of *p*-nitrophenyl esters of cinnamic, *p'*-nitrocinnamic and *p'*-(*N,N,N*-trimethylammonium)-cinnamic acids were hydrolyzed by action of subtilisin st. 72. *cis*-Isomers were hydrolyzed 10-40 times slower than *trans*-isomers, and, in contrast to *cis*-cinnamoylimidazole, were not  $k_{cat}$ -inhibitors of subtilisin. *p*-Nitrophenylcinnamates may be used for the creation of light-sensitive systems. Inhibitory analysis of the enzymatic hydrolysis of cinnamate derivatives having different leaving groups is indicative of their sorption at different binding sites of subtilisin.