



УДК 577.152.341*11'135

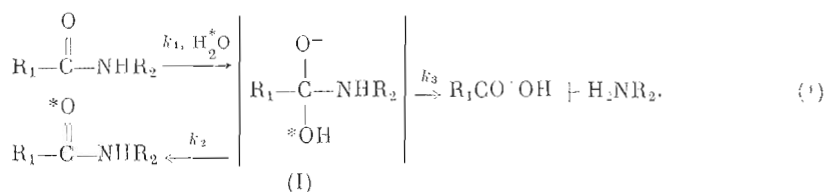
МЕХАНИЗМ ОБМЕНА КИСЛОРОДА В АМИДНОЙ ГРУППЕ СУБСТРАТОВ В ХОДЕ ИХ ГИДРОЛИЗА, КАТАЛИЗИРУЕМОГО ЛЕЙЦИНАМИНОПЕПТИДАЗОЙ И ПЕПСИНОМ

Капитанников Ю. В., Явашев Л. П., Гинодман Л. М., Антонов В. К.

Институт биоорганической химии им. М. М. Шенякина Академии наук СССР, Москва

Показано, что обмен кислорода в амидной группе лейцинамида, катализируемый лейцинаминопептидазой из хрусталика глаза быка, и в пептидной группе лейцилтирозинамида, катализируемый свиным пепсином, происходит в основном за счет переноса лейцина на образующиеся в ходе гидролиза этих субстратов аммиак и тирозинамид. Таким образом, кислородный обмен в непрогидролизованном субстрате не может служить доказательством образования тетраэдрического промежуточного соединения в ходе катализа протеолитическими ферментами.

Изучение кинетики обмена кислорода в карбоксильной группе производных карбоновых кислот на кислород из воды является наиболее общим методом определения скорости образования и распада образующегося в ходе гидролиза тетраэдрического промежуточного соединения (I):



Этот метод широко использовался для определения констант k_1 и k_2/k_3 в случаях неферментативного гидролиза амидов, эфиров и других производных карбоновых кислот [1, 2]. Попытки обнаружить обмен кислорода в ходе катализируемого химотрипсином гидролиза оказались неудачными [3]. Ранее [4] мы показали, что обмен кислорода происходит в непрогидролизованных субстратах лейцинаминопептидазы, пепсина и термолизина. Этот факт трактовался [4] как свидетельство образования в ходе гидролиза, катализируемого этими ферментами, тетраэдрического промежуточного соединения (I).

Чтобы определить константы скорости образования и распада тетраэдрического промежуточного соединения, мы исследовали кинетику обмена кислорода в лейцинамиде, катализируемом лейцинаминопептидазой из хрусталика глаза быка (КФ 3.4.11.1), варьируя как глубину гидролиза субстрата, так и его начальную концентрацию. Реакцию гидролиза лейцинамида проводили в H_2^{18}O . Непрогидролизованный субстрат выделяли из смеси хроматографией и подвергали масс-спектрометрическому анализу.

Оказалось, однако, что кинетика обмена кислорода не подчиняется обычным закономерностям ферментативных реакций. Как видно из рис. 1, кривая зависимости степени обмена от времени инкубации имеет продолжительный лаг-период, т. е. обмен в заметной степени происходит лишь при значительной степени гидролиза субстрата. Кроме того, изменение начальной концентрации субстрата с 0,3 до 0,2 М резко снижает степень обмена при одинаковой глубине гидролиза (80%) (рис. 2). Такая зависимость не согласуется с механизмом, представленным на схеме 1.

То обстоятельство, что обмен наблюдается только при высоких концентрациях субстрата, наводит на мысль, что важную роль в обмене кислорода в лейцинамиде могут играть продукты гидролиза — лейцин и аммиак. Чтобы проверить это предположение, был проведен следующий опыт: к 0,15 М раствору лейцинамида (т. е. в концентрации, когда кислородный обмен не происходит) в $H_2^{18}O$ добавляли 0,15 М раствор лейцина и $^{15}NH_3$ и смесь инкубировали с лейцинаминопептидазой до 80% гидролиза субстрата. Оказалось, что в этих условиях наблюдается такая же степень обмена кислорода, как и в опыте с 0,3 М лейцинамидом (рис. 2). Кроме того, в непрогидролизованной субстрат включается меченый аммиак в количестве, примерно равном включению ^{18}O (таблица).

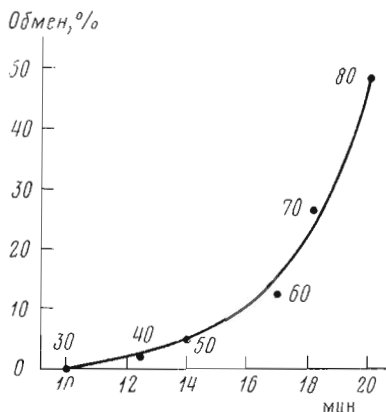


Рис. 1

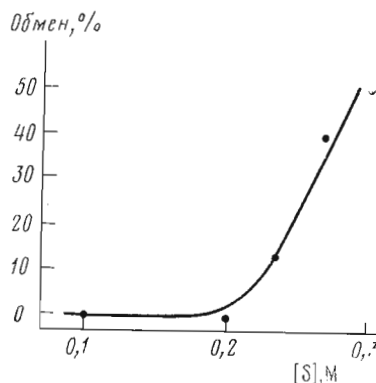
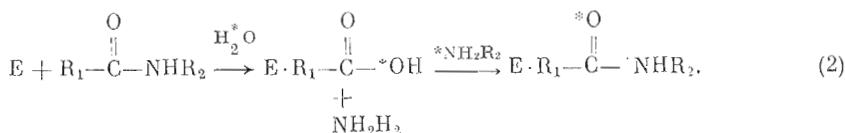


Рис. 2

Рис. 1. Кинетическая кривая обмена кислорода в амидной группе лейцинамида, катализируемого лейцинаминопептидазой. Цифры на кривой — степень гидролиза лейцинамида (%)

Рис. 2. Зависимость степени обмена кислорода в лейцинамиде от начальной концентрации субстрата при степени гидролиза 80%

Эти данные однозначно свидетельствуют в пользу того, что обмен кислорода в субстрате, по крайней мере частично, обусловлен переносом лейцина на образующийся в ходе гидролиза аммиак (схема 2), и объясняют отмечавшиеся выше аномалии кинетики обмена кислорода.



Необходимо отметить, что этот механизм все же полностью не объясняет наблюдаемые факты. Дело в том, что при обмене кислорода метка в карбоксильной группе должна разбавляться вдвое и, если обмен идет по меха-

Обмен кислорода и включение меченых продуктов в субстраты лейцинаминопептидазы и пепсина

Условия реакции	Содержание ^{18}O в H_2O , % ат.	Анализируемая форма субстрата	Включение ^{18}O (на 100% $H_2^{18}O$)	Включение продукта, %
Лейцинаминопептидаза (0,5 мкМ), лейцинамид (0,15 М), $^{15}NH_3$ (0,15 М) и лейцин (0,15 М), трис-НСI, рН 8,5; 8 мин; 25° С	80,3	Leu-NH ₂	49±5	56±3
Пепсин (37 мкМ), лейцилтирозинамид (5,35 мМ), [^{14}C]тирозинамид (5,56 мМ), 0,1 М натрий-ацетат, рН 3,6; 72 ч, 20° С	80	(CF ₃ CO) ₂ · Leu-Tyr-NH ₂	26,8±3	38,1±2

низму 2, ожидаемое соотношение $^{18}\text{O} : ^{15}\text{N}$ должно быть 1 : 2. Наблюдаемое в эксперименте соотношение 1 : 1 может объясняться или вкладом механизма 1 или же тем, что субстрат, обменивающий кислород, успевает за время реакции пройти еще один или несколько циклов переноса ацильного фрагмента на акцептор. Сделать выбор между этими двумя возможностями пока весьма трудно.

Сходные данные были получены нами при исследовании обмена кислорода в лейцилтирозинамиде, катализируемом пепсином свиньи. Субстрат инкубировали 72 ч с пепсином при pH 3,6 в H_2^{18}O в присутствии [^{14}C]тирозинамида. Смесь разделяли хроматографически и определяли радиоактивность и содержание ^{18}O в непрогидролизованном субстрате. Определяли также содержание ^{18}O в продукте транспептидации — лейциллейцине. Как видно из данных, приведенных в таблице, включение кислорода в непрогидролизованный субстрат при степени гидролиза 83% составляет около 27%, тогда как степень включения радиоактивного тирозинамида достигает 38%. Учитывая, однако, разбавление кислородной метки, можно констатировать, что и в этом случае степень включения кислорода превосходит ту, которая ожидалась бы (19%), если бы обмен шел исключительно по механизму 2. То обстоятельство, что содержание ^{18}O в лейциллейцине составляет $\approx 83\%$, указывает на более чем одноактный перенос лейцина за время инкубации.

Таким образом, полученные нами данные показывают, что катализируемый протеолитическими ферментами обмен кислорода в субстрате не является свидетельством в пользу образования промежуточного тетраэдрического соединения, как это имеет место для неферментативных гидролитических реакций. Естественно, что эти данные и не опровергают возможности образования таких соединений.

Экспериментальная часть

Характеристики ферментов и других использованных реагентов приведены в работе [4]. $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ содержал 97 ат. % ^{15}N . Равномерномеченый [^{14}C]тирозинамид (Amersham) имел уд. акт. 518 Ки/моль.

Кинетика обмена кислорода. К 2 мл смеси, содержащей лейцинамид, 0,5 М трис-HCl-буфер, pH 8,5, приготовленный на H_2^{18}O (80,3 ат. % ^{18}O), добавляли лейцинаминопептидазу (конечная концентрация 0,5 мкМ). Смесь помещали в термостатированную при 25° С кювету спектрофотометра (Gilford) и степень гидролиза измеряли по поглощению при 233 нм [5]. Реакцию останавливали замораживанием (-70° С). Смесь лиофилизировали, остаток растворяли в смеси этанол — вода — 25% аммиак (2 : 2 : 1) и хроматографировали на бумаге Whatman 3ММ в системе *n*-бутанол — муравьиная кислота — вода (8 : 1 : 1). Зону, соответствующую лейцинамиду (R_f 0,31), вырезали и элюировали водой. Определение ^{18}O проводили на приборе Varian MAT CN-5, используя метод ионизации полем. Содержание ^{18}O рассчитывали по формуле

$$\% ^{18}\text{O} = [M+2] \cdot 100 / [M] + [M+2] +$$

Включение ^{18}O и ^{15}N в лейцинамид. Опыты проводили как описано выше, используя концентрации реагентов, приведенные в таблице.

Включение ^{18}O и тирозинамида в лейцилтирозинамид. 3 мл 0,1 М натрий-ацетатного буферного раствора, приготовленного на H_2^{18}O (80 ат. % ^{18}O) и содержащего пепсин, лейцилтирозинамид и [^{14}C]тирозинамид в концентрациях, указанных в таблице, инкубировали при 20° С 72 ч. Смесь затем лиофилизировали, остаток экстрагировали этанолом, содержащим 5% (по объему) конц. NH_3 , экстракт фильтровали, упаривали до суха и растворяли остаток в 2 мл этанола, содержащего 1% конц. NH_3 . Смесь продуктов реакции разделяли хроматографией на колонке (250×4,6 мм) с силикагелем (8—12 мкм) в системе метанол — ацетонитрил — конц. NH_3 (15 : 85 : 4). Фракции, содержащие лейцилтирозинамид и тирозинамид, детектировали при 290 нм и по радиоактивности. Процент

гидролиза определяли по калибровочному графику. Степень включения тирозинамида в лейцилтирозинамид определяли по радиоактивности непротрогидролизованного субстрата. Радиоактивность определяли на счетчике Intertechnic. Лейцилтирозинамид трифторацетилювали трифторуксусным ангидридом и содержащие ^{18}O определяли осколочной масс-спектрометрией по соотношению интенсивностей пиков с m/e 467 и 469 ($M^+ - 18$).

ЛИТЕРАТУРА

1. *Bender M. L., Ginger R. D., Kemp K. C.* J. Amer. Chem. Soc., 1954, v. 76, № 12, p. 3350-3351.
2. *Deslongchamps P., Barlet R., Taillefer R. J.* Can. J. Chem., 1980, v. 58, № 20, p. 2167-2172.
3. *Bender M. L., Kemp K. C.* J. Amer. Chem. Soc., 1957, v. 79, № 1, p. 111-116.
4. *Antonov V. K., Ginodman L. M., Rumsh L. D., Kapitannikov Y. V., Barshevskaya T. N., Yavashev L. P., Gurova A. G., Volkova L. I.* Eur. J. Biochem., 1981, v. 117, № 1, p. 195-200.
5. *Mitz M. A., Shlueter R.* Biochim. et biophys. acta, 1958, v. 27, № 1, p. 168-171.

Поступила в редакцию
20.VIII.1982

MECHANISM OF THE OXYGEN EXCHANGE IN THE AMIDE GROUP OF SUBSTRATES IN THE COURSE OF THEIR HYDROLYSIS CATALYZED BY LEUCINE AMINOPEPTIDASE AND PEPSIN

KAPITANNIKOV Yu. V., YAVASHEV L. P., GINODMAN L. M.,
ANTONOV V. K.

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

Oxygen exchange in the amide group of leucine amide catalyzed by leucine aminopeptidase, and in leucyltyrosine amide catalyzed by porcine pepsin, was found to proceed mainly by the transfer of the leucyl residue onto the ammonia or tyrosine amide which are formed during the hydrolysis. Thus oxygen exchange in the non-hydrolyzed substrate can not be a proof of the tetrahedral intermediate formation in the course of the catalysis by proteolytic enzymes.