



УДК 577.152.344'.134:547.96.04

РЕАКЦИЯ  $\alpha$ -ХИМОТРИПСИНА  
С ОКРАШЕННЫМ ФЕНАЦИЛБРОМИДОМ —  
 $\alpha$ -БРОМ-4-АМИНО-3-НИТРОАЦЕТОФЕНОМ

Тарасова Н. И., Лавренова Г. И., Загнитъко О. П.,  
Петрова Е. Н., Степанов В. М.

Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова,  
химический факультет

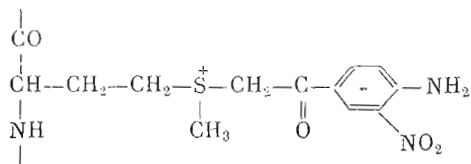
Исследована реакция  $\alpha$ -химотрипсина с  $\alpha$ -бром-4-амино-3-нитроацетофеноном. Установлено, что присоединение одного остатка ингибитора к Met<sup>192</sup> и 0,2 остатка — к Asp<sup>64</sup> (в расчете на 1 моль фермента) при pH 4 вызывает снижение пептидазной активности по *n*-нитроанилиду широглутамин-*L*-фенилаланина на 82%. При увеличении pH до 7 степень модификации остатка Met<sup>192</sup> остается неизменной, а для Asp<sup>64</sup> возрастает до 0,5 остатка на молекулу белка, что, однако, не сопровождается существенным дальнейшим падением активности. Инактивация  $\alpha$ -химотрипсина фенацилбромидом вызвана главным образом модификацией остатка Met<sup>192</sup>. Высказано предположение, что увеличение степени модификации Asp<sup>64</sup> с ростом pH связано с pH-зависимым конформационным переходом в  $\alpha$ -химотрипсине.

$\alpha$ -Галоидкетоны различного строения неоднократно использовались для модификации  $\alpha$ -химотрипсина и других сериновых протеиназ [1–5]. Субстратоподобные пептидные галоидметилкетоны специфически реагируют с пептидом активного центра химотрипсина [1, 2, 6]. Бромацетамиды в зависимости от их строения могут алкилировать каталитически важные серин-195 или метионин-192 [7–9]. Фенацилбромиды же предпочтительно взаимодействуют с метионином-192 [3, 4, 10, 11].

Как показали Гловер и сотр. [4], с ростом pH от 4 до 7 включение фенацилбромидов в  $\alpha$ -химотрипсин растет, активность модифицированного фермента понижается и уменьшается степень реактивации модифицированного фермента 2-меркаптоэтанолом. Авторы предположили, что при pH 7 процесс модификации протекает в две стадии: сначала образуется продукт алкилирования остатка метионина-192, а затем происходит перенос фенацильной группы на нуклеофильный центр другого аминокислотного остатка [4]. Однако впоследствии они установили, что при всех значениях pH фенацильный остаток остается связанным с метионином-192 [5]. Неспособность  $\alpha$ -химотрипсина, модифицированного при pH 7, к реакции с 2-меркаптоэтанолом авторы объясняют образованием при этом значении pH такой конформации белка, в которой остаток метионина-192 находится во внутреннем районе фермента и недоступен для атаки 2-меркаптоэтанолом. Однако до сих пор остается невыясненным вопрос о причинах роста включения фенацилбромидов в  $\alpha$ -химотрипсин и степени инактивации модифицированного фермента при повышении pH. Поэтому мы поставили своей целью более подробное исследование реакции  $\alpha$ -химотрипсина с фенацилбромидами. Для этого мы использовали описанный нами ранее [12] окрашенный фенацилбромид —  $\alpha$ -бром-4-амино-3-нитроацетофенон (BANAP), который дает с белками производные с характерными УФ-спектрами, что существенно облегчает расчет включения реагента в белок и локализацию модифицируемых аминокислотных остатков.

$\alpha$ -Химотрипсин, модифицированный BANAP при pH 4, имеет в УФ-спектре (рис. 1) помимо обычного для белка максимума поглощения еще два — при 316 и 390 нм, характерных для образующейся сульфониевой

соли метионина [12]:



Включение BANAP в белок при pH 4 и 40-кратном избытке реагента составило один остаток на молекулу химотрипсина, причем пептидазная активность по *n*-нитроанилиду пироглутамил-*L*-фенилаланина [13] снизилась до 18% от исходной. С ростом pH максимум при 316 нм в спектре поглощения модифицированного белка сглаживается за счет роста поглощения при 305–307 нм (рис. 1), включение BANAP возрастает до 1,6 остатка, а активность снижается до 10% от активности нативного фермента (рис. 2). Максимум при 307 нм имеется в УФ-спектрах модельных соединений — продуктов реакции BANAP с гистидином и дикарбоновыми аминокислотами [12]. Это позволило предположить, что при pH > 4 в реакции модификации наряду с метионином участвуют имидазольные и (или) карбоксильные группы.

Для локализации модифицируемых остатков препараты химотрипсина, обработанного BANAP при pH 4 и 7 и содержащего соответственно 1,1 и 1,4 остатка ингибитора на молекулу фермента, денатурировали кратковременным нагреванием на кипящей водяной бане и гидролизовали термолизинном при pH 6,5 в течение 20 ч (до практически полного растворения осадка белка). Полученные гидролизаты разделяли хроматографией на катионообменнике Chromobeads. Детекцию пептидов, содержащих BANAP, проводили по поглощению при 390 нм (рис. 3).

При хроматографии гидролизата химотрипсина, модифицированного BANAP при pH 4, было получено пять окрашенных фракций (рис. 3а). Их подвергали дальнейшей очистке хроматографией и электрофорезом на бумаге. Окрашенная зона фракции 2 не содержала аминокислот и по УФ-спектру ( $\lambda_{\text{max}}$  307 нм) соответствовала отщепившемуся кетолу —  $\alpha$ -окси-4-амино-3-нитроацетофенону. Из фракций 4 и 5 были выделены близкие по хроматографическим показателям зоны 4-1 и 5-1 с идентичным аминокислотным составом (табл. 1). При определении N-концевых аминокислот методом дансилирования с последующей хроматографией на полиамидных пленках [14] в обоих случаях были обнаружены серин, валин и глицин.

Исходя из данных определения аминокислотного состава, N-концевой аминокислоты и известной первичной структуры  $\alpha$ -химотрипсина [15],

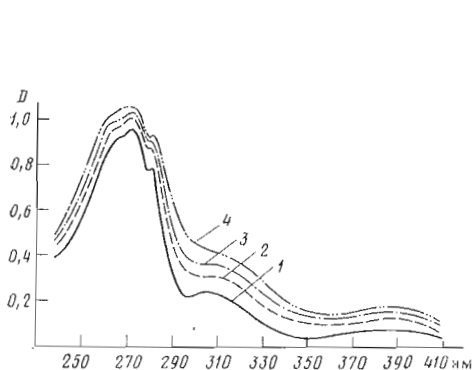


Рис. 1

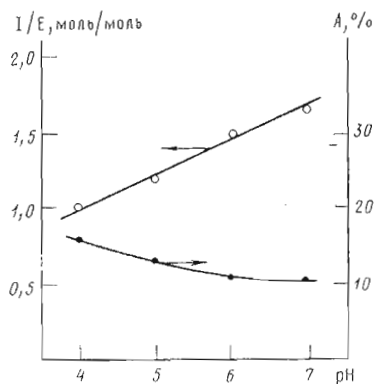


Рис. 2

Рис. 1. Спектры поглощения  $\alpha$ -химотрипсина, модифицированного BANAP при pH 4 (1), 5 (2), 6 (3) и 7 (4)

Рис. 2. Зависимость степени модификации и инактивации (приведена остаточная активность)  $\alpha$ -химотрипсина BANAP от pH реакционной среды



Аминокислотный состав окрашенных пептидов термолитического гидролизата  $\alpha$ -химотрипсина, модифицированного BANAP при pH  
Выделен из фракций 1, 3, 4 и 5 (рис. 3а) \*

Аминокислота	1-1	1-2	3	4-1	5-1	5-2	5-3
Asp	16,9	34,9	7,1(1)	5,1(1)	6,9(1)	6,8(1)	10,5(1)
Thr	20,2	15,7	—	5,4(1)	6,6(1)	4,8(1)	8,8(1)
Ser	24,5	35,2	10,0(1)	20,0(5)	21,7(5)	17,3(4)	35,7(5)
Glu	9,2	34,0	—	—	—	—	—
Pro	9,6	11,1	—	3,9(1)	5,6(1)	5,3(1)	7,1(1)
Gly	24,7	38,7	—	16,7(3-4)	18,6(3-4)	20,0(4)	38,1(5)
Ala	3,4	4,5	—	4,0(1)	5,8(1)	3,1(1)	6,0(1)
Val	—	—	—	7,0(2)	7,0(2)	—	7,0(2)
Cys	3,2	1,3	—	Не опр.	Не опр.	Не опр.	Не опр.
N-Концевая	Не опр.	Не опр.	Ser	Ser, Gly, Val	Ser, Gly, Val	Ser, Val	Gly, Val

\* Приведено найденное количество остатков в нмолях (в скобках — предполагаемое число остатков в пептиде). Данные по содержанию метионина не приведены, так как при щелочном гидролизе модифицированного метионина свободная аминокислота не регенерируется.

Таблица 2

Структура пептидов термолитического гидролизата  $\alpha$ -химотрипсина, модифицированного BANAP при pH 4 (рис. 3 а)

Пептид	Фрагмент первичной структуры $\alpha$ -химотрипсина	$\lambda_{\text{макс}}$ , нм	Модифицируемый остаток	Распределение метки по пептидам, %
1-1	Не установлен	316	Met <sup>192</sup>	21,9
1-2	»	316	Met <sup>192</sup>	
2	»	307	—	
3	63—64 или 127—128	307	Asp <sup>64</sup> или Asp <sup>128</sup>	
4-1	188—198 216—220 и  —S—S—  188—198 217—220  —S—S—	316	Met <sup>192</sup>	22,3
5-1	188—198 216—220 и  —S—S—  188—198 217—220  —S—S—	316	Met <sup>192</sup>	36,4
5-2	187—198 218—220  —S—S—	316	Met <sup>192</sup>	
5-3	187—198 216—220  —S—S—	316	Met <sup>192</sup>	

Как видно из табл. 2, в гидролизате химотрипсина, модифицированного BANAP при pH 4, ~80% метки приходится на пептиды, содержащие модифицированный метионин-192, 4% — на дипептид с этерифицированной аспарагиновой кислотой и ~15% — на кетол, который, по-видимому, образуется в результате гидролиза сложного эфира в процессе тепловой денатурации белка (соль сульфония, по нашим данным, более устойчива к нагреванию). Таким образом, при pH 4 модификация BANAP в  $\alpha$ -химотрипсине подвергается в основном метионин-192 и частично (не более чем на 20%) — аспарагиновая кислота-64 или -128.

При хроматографии гидролизата химотрипсина, модифицированного BANAP при pH 7, на смоле Chromobeads было получено восемь окрашенных фракций (рис. 3б). Фракция 2' содержала окрашенный кетол — продукт отщепления ингибитора. В этом гидролизате его оказалось меньше, чем в первом, так как для уменьшения степени гидролиза сложных эфиров BANAP тепловую денатурацию белка, модифицированного при pH 7, проводили в течение 1 мин вместо 10. После очистки хроматогра-

Аминокислотный состав окрашенных пептидов термолитинового гидролизата  $\alpha$ -химотрипсина, модифицированного BANAP при pH 7  
Фракции рис. 3б \*

Аминокислота	1'	3'	4'	5'-1	5'-2	5'-3	5'-4	6'	7'	8'
Asp	3,8	8,6(1)	7,1(1)	16,2(1)	8,0(1)	9,5(1)	13,4(1)	4,5(1)	4,2(1)	23,3(2)
Thr	5,2	15,6(2)	13,5(2)	—	11,8(2)	22,8(3)	37,3(3)	7,1(2)	4,3(1)	41,6(5)
Ser	12,0	9,9(1)	8,3(1)	11,5(1)	22,8(4)	37,6(7)	47,8(7)	19,6(6)	15,8(5)	53,7(7)
Pro	2,8	—	—	—	8,0(1)	14,5(2)	22,5(2)	4,5(1)	3,2(1)	20,7(2)
Gly	10,6	—	—	—	25,5(4)	35,4(4)	50,9(5)	16,2(4)	12,4(4)	66,1(6)
Ala	3,6	—	—	—	—	—	—	—	—	26,0(2)
Val	2,0	8,9(1)	9,1(1)	—	—	6,8(1)	12,0(1)	3,7(1)	—	28,8(2)
Cys	0,9	—	—	He опр.	He опр.	12,7(2)	19,0(2)	He опр.	8,6(2)	49,3(4)
Met	1,6	—	—	»	»	3,5(1)	5,7(1)	1,8(1)	He опр.	He опр.
Leu	2,3	—	—	—	—	—	—	—	—	13,9(1)
Lys	1,1	—	—	—	—	—	—	—	—	21,2(2)
N-Концевая	He опр.	Val	Val	Ser	Gly	Val, Gly	Val, Gly	Val, Gly	Ser, Gly	Ala, Val, Gly

\* Приведено найденное количество остатков в ммольях (в скобках — предполагаемое число остатков в пептиде).

Таблица 4

Окрашенные пептиды термолитинового гидролизата  $\alpha$ -химотрипсина, модифицированного BANAP при pH 7

Пептид	Соответствующий фрагмент первичной структуры $\alpha$ -химотрипсина	$\lambda_{\text{макс}}$ , нм	Модифицируемый остаток	Распределение метки по пептидам, %
1'	He установлен	316	Met <sup>192</sup>	8,4
2'	—	307	—	5,6
3'	60-64	307	Asp <sup>64</sup>	9,0
4'	60-64	307	Asp <sup>64</sup>	8,7
5'-1	63-64	307	Asp <sup>64</sup>	11,5
5'-2	191-198 216-222 └S-S┐	316	Met <sup>192</sup>	25,5
5'-3	188-198 216-225 └S-S┐	316	Met <sup>192</sup>	
5'-4	188-198 216-226 └S-S┐	316	Met <sup>192</sup>	
6'	188-198 216-222 └S-S┐	316	Met <sup>192</sup>	
7'	190-198 216-221 └S-S┐	316	Met <sup>192</sup>	
8'	131-136 188-205 216-220 └S-S┐ └S-S┐	316	Met <sup>192</sup>	7,3

фшей и электрофорезом на бумаге фракций 6', 7' и 8' были получены гомогенные пептиды, которые, по данным аминокислотного анализа и определения N-концевой аминокислоты (табл. 3), соответствовали различным фрагментам структуры  $\alpha$ -химотрипсина вблизи метионина-192 (табл. 4). Из фракции 5' (рис. 3б) были выделены три пептида с модифицированным остатком метионина-192 (5'-2, 5'-3 и 5'-4) и дипептид Ser-Asp (5'-1), который, как указывалось выше, по-видимому, содержит этерифицированную аспарагиновую кислоту-64. Фракции 3' и 4' содержали окрашенный пептид, соответствующий последовательности  $\alpha$ -химотрипсина с 60-го по 64-й остаток:  $^{60}$ -Val-Thr-Thr-Ser-Asp- $^{64}$ . УФ-спектр этого пептида имел максимум при 307 нм, что, согласно спектральным данным

модельных соединений [12], указывало на модификацию содержащегося в нем остатка аспарагиновой кислоты-64.

Пептиды фракции I', как и в случае гидролизата химотрипсина, модифицированного при pH 4, нам не удалось получить в индивидуальном состоянии. Однако, исходя из того, что эта фракция имела в УФ-спектре максимум поглощения при 316 мμ, мы предположили, что ее окрашенные пептиды содержат модифицированный остаток метионина-192.

Данные о распределении метки по пептидам, представленные в табл. 4, свидетельствуют о том, что в α-химотрипсине, модифицированном при pH 7, ~35% остатков BANAP приходится на аспарагиновую кислоту-64 (мы предполагаем, что окрашенный кетон является продуктом гидролиза сложного эфира этого остатка) и ~65% — на метионин-192. Если предположить, что метионин-192 модифицируется полностью, степень модификации аспарагиновой кислоты-64 составит ~0,5 остатка и суммарное включение ингибитора, рассчитанное из распределения метки (1,5 остатка BANAP на молекулу белка) удовлетворительно согласуется со значением включения, полученным из УФ-спектра поглощения (1,4 остатка).

Для белка, модифицированного при pH 4, аналогичный расчет дает степень модификации аспарагиновой кислоты-64, равную 0,2, и суммарное включение BANAP в фермент составляет 1,2 остатка, что также мало отличается от величины, рассчитанной по УФ-спектру (1,1 остатка).

Таким образом, метионин-192 α-химотрипсина подвергается модификации BANAP при pH 4 и 7 примерно в равной степени. Увеличение же включения ингибитора в белок с ростом pH связано главным образом с повышением степени модификации остатка аспарагиновой кислоты-64. Этот вывод хорошо согласуется с данными Гловера и сотр. [4], которые обнаружили, что ~30% радиоактивной метки, содержащейся в химотрипсине, модифицированном фенацилбромидом при pH 7, может быть снято гидроксилламинном. На основании этого они предположили, что дополнительным местом модификации фенацилбромидом помимо метионина-192 может быть карбоксильная группа, хотя локализована она не была.

По данным рентгеноструктурного анализа [17, 18], остаток метионина-192 расположен в гидрофобной зоне связывания субстрата S<sub>1</sub>. BANAP и другие фенацилбромиды, по-видимому, сорбируются в этой полости и избирательно реагируют с метионином-192. Степень модификации этого остатка не изменяется с ростом pH, так как его нуклеофильность от pH не зависит.

Аспарагиновая кислота-64 в молекуле химотрипсина расположена вдали от каталитического центра внутри полости, в которой, вероятно, происходит связывание высокомолекулярного субстрата, и частично доступна для молекул растворителя [17, 19]. Возможно, что фенацилбромид сорбируется в этой полости, чем и объясняется избирательная модификация только одной из множества карбоксильных групп, расположенных на поверхности α-химотрипсина.

Можно было бы предположить, что рост степени модификации аспарагиновой кислоты при повышении pH связан с увеличением степени ионизации карбоксильной группы. Однако наблюдаемая зависимость включения от pH (рис. 2) давала бы для этой группы очень высокое значение pK<sub>a</sub> (>7), противоречащее данным рентгеноструктурного анализа, согласно которым остаток аспарагиновой кислоты-64 имеет контакт с растворителем [17—19]. Вероятнее всего, карбоксильная группа этого остатка будет полностью ионизована уже при pH 4—5. Рост же степени его модификации связан с какими-то другими превращениями фермента. Возможно, это pH-зависимое изменение конформации фермента, которое благоприятствует связыванию реагента и его взаимодействию с аспарагиновой кислотой-64. Для химотрипсина существование конформационных переходов такого рода показано методами рентгеноструктурного анализа [18, 20—22]. Кроме того, можно предполагать, что изменение степени модификации аспарагиновой кислоты-64 связано с процессом димеризации α-химотрипсина. По данным рентгеноструктурного анализа [17, 18], этот остаток в димере образует ионную пару с аминок группой аланина-149 соседней моле-

жулы. Как показали Аун и Тимашев [23], равновесная константа димеризации  $\alpha$ -химотрипсина достигает максимального значения при pH 4,4, а с ростом pH степень димеризации уменьшается. Таким образом, повышенные степени модификации аспарагиновой кислоты-64 с ростом pH может быть вызвано увеличением доступности этого остатка в результате распада димера.

Как видно из рис. 2, модификация метионина-192 при pH 4 существенно снижает амидазную активность фермента (до ~18% от исходной). В  $\alpha$ -химотрипсине этот остаток расположен вблизи каталитического центра и его боковая цепь предположительно выполняет роль «крышки», завершающей построение гидрофобной субстратсвязывающей полости [16]. Присоединение довольно громоздкого остатка BANAP к метионину-192 частично перекрывает доступ субстрата к активному центру, чем и может быть объяснено снижение активности фермента.

Влияние модификации аспарагиновой кислоты-64 на активность  $\alpha$ -химотрипсина количественно трудно оценить на фоне значительной инактивации в результате модификации метионина-192. Однако полученная зависимость степени инактивации от pH реакционной среды (рис. 2) позволяет предполагать, что алкилирование аспарагиновой кислоты-64 лишь незначительно сказывается на активности  $\alpha$ -химотрипсина, измеряемой по низкомолекулярному субстрату, вследствие того, что этот остаток располагается вдали от зоны его связывания.

### Экспериментальная часть

В работе использовали  $\alpha$ -химотрипсин быка (ГФ 3.4.4.5) и термоллизин (Serva, ФРГ), сульфополлестирольный катионит Chromobeads (Technikon, Ирландия).  $\alpha$ -Бром-4-аминно-3-нитроацетофенон был получен как описано в работе [12].

Активность модифицированного химотрипсина измеряли по гидролизу *n*-нитроанилида пироглутамил-*L*-фенилаланина [13].

Спектрофотометрические измерения проводили на спектрофотометре Specord UV VIS (ГДР).

*Модификация  $\alpha$ -химотрипсина BANAP при различных значениях pH.* Пробы, содержащие по 3 мг  $\alpha$ -химотрипсина, растворяли в 3 мл 0,1 М фосфатного буфера, pH 4–7. В каждую пробу прибавляли по 0,2 мл 0,6% раствора BANAP в диметилформамиде (40-кратный мольный избыток). Инкубировали 2 ч при 20° С и обессоливали на колонках с сефадексом G-25 (1,5×10 см). Проводили контрольные опыты: к раствору 1 мг белка в 1 мл буфера добавляли 0,04 мл диметилформамида и подвергали инкубации с последующей гель-фильтрацией. Затем определяли активность модифицированного химотрипсина и химотрипсина в контрольном опыте. Включение BANAP в  $\alpha$ -химотрипсин оценивали по УФ-спектру, используя следующие молярные коэффициенты поглощения: для остатка BANAP, присоединившегося к белку,  $\epsilon_{280}=10\ 700$  и  $\epsilon_{316}=16\ 300$  [12], для  $\alpha$ -химотрипсина  $\epsilon_{280}=50\ 000$ . Расчет проводили по формуле

$$\text{включение (моль ингибитора на моль белка)} = \frac{D_{316} \cdot 50\ 000}{\left( D_{280} - \frac{D_{316}}{16\ 300} \cdot 10\ 700 \right) \cdot 16\ 300},$$

где  $D_{316}$  и  $D_{280}$  — поглощение раствора модифицированного белка соответственно при 316 и 280 нм.

*Модификация  $\alpha$ -химотрипсина BANAP. Препаративные опыты.* К 200 мг  $\alpha$ -химотрипсина в 200 мл фосфатного буфера, pH 7 или 4 (pH устанавливали добавлением HCl), прибавляли 15 мл 0,6% раствора BANAP в диметилформамиде. Инкубировали 2 ч при 20° С и обессоливали на сефадексе G-25 (9×80 см), элюируя водой. Фракции, содержащие белок, лиофилизировали. Включение BANAP составило 1–1,1 остатка на молекулу белка при pH 4 и 1,4–1,5 остатка — при pH 7. Выход модифицированного белка ~70%.

*Ферментативный гидролиз модифицированного белка и выделение окрашенных пептидов.* Модифицированный при pH 4  $\alpha$ -химотрипсин (400 мг) в 20 мл 0,1 М аммоний-ацетатного буфера, pH 6,5, нагревали 10 мин на кипящей водяной бане. После охлаждения суспензии к ней прибавляли 4 мг термолитина в 8 мл буфера. Модифицированный при pH 7 химотрипсин (630 мг) в 24 мл 0,1 М аммоний-ацетатного буфера, pH 6,5, нагревали 1 мин на кипящей водяной бане, охлаждали до 20° С и прибавляли 6 мг термолитина в 12 мл буфера. Реакционные смеси инкубировали 20 ч при 20° С до практически полного растворения осадка белка. Гидролизаты лиофилизировали, растворяли в 15 мл буфера, pH 2,3 (0,2 М пиридин — уксусная кислота — муравьиная кислота), и наносили под давлением 2,5 атм на колонку со смолой Chromobeads (1×55 см), уравновешенной буфером 0,2 М пиридин — уксусная кислота, pH 3,1. Колонку промывали этим буфером со скоростью 13 мл/ч в течение 6 ч, затем подключали экспоненциальный градиент pH 3,1→5,0 на 24 ч и pH 5,0→7,8 — на 12 ч (объем смеси 400 мл). Собирали фракции по 2,5 мл и измеряли в них поглощение при 390 нм (рис. 3). Полученные окрашенные фракции упаривали в вакууме и подвергали дальнейшей очистке электрофорезом и/или хроматографией на бумаге Ватман 3ММ. Для электрофореза использовали смеси: муравьиная кислота — пиридин — вода, 2,4:0,3:997,3 (pH 2,8), пиридин — уксусная кислота — вода, 2:4:994 (pH 4,3), пиридин — уксусная кислота — вода, 4:1:995 (pH 5,6) и пиридин — уксусная кислота — вода, 25:1:974 (pH 6,5). Хроматографию осуществляли в системах *n*-бутиловый спирт — уксусная кислота — вода, 200:35:70, и *n*-бутиловый спирт — пиридин — уксусная кислота — вода, 15:10:3:12. Окрашенные зоны вырезали и вещества элюировали водой. N-Концевые аминокислоты в полученных пептидах определяли дансилированием с последующей хроматографией дансилпроизводных на полиамидных пленках [14]. Аминокислотный состав пептидов после гидролиза 5,7 н. HCl при 105° С определяли на аминокислотном анализаторе Durrum D-500 (США).

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Powers J. C. *Methods in Enzymol.*, 1977, v. 46, p. 197–205.
2. Kurachi T. M. *Biochemistry*, 1973, v. 12, № 3, p. 771–778.
3. Glover G. J., Mariano P. S., Wilkinson T. I., Hildreth R. A., Love T. M. *Arch. Biochem. and Biophys.*, 1974, v. 162, № 1, p. 73–78.
4. Glover G. J., Mariano P. S., Petersen J. R. *Biochemistry*, 1976, v. 15, № 17, p. 3754–3760.
5. Mariano P. S., Glover G. J., Petersen J. R. *Biochem. J.*, 1978, v. 171, № 1, p. 115–122.
6. Segal D. M., Powers J. C., Cohen G. H., Davies D. R., Wilcox P. E. *Biochemistry*, 1971, v. 10, № 17, p. 3728–3737.
7. Schramm H. J., Lowson W. B. *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.*, 1963, B. 332, № 1, S. 97–100.
8. Lowson W. B., Rao G. J. S. *Biochemistry*, 1980, v. 19, № 9, p. 2133–2139.
9. Lowson W. B. *Biochemistry*, 1980, v. 19, № 9, p. 2140–2144.
10. Gibian M. J., Rubenstein P. A., Ficklin W. H. *Biochim. et biophys. acta*, 1969, v. 209, № 2, p. 379–384.
11. Sigman D. S., Blout E. R. *J. Amer. Chem. Soc.*, 1967, v. 89, № 7, p. 1747–1748.
12. Tarasova N. I., Lavrenova G. I., Stepanov V. M. *Biochem. J.*, 1980, v. 187, № 2, p. 345–352.
13. Оксенойт Е. С., Петрова Е. Н., Филиппова И. Ю., Лавренова Г. И., Табасова И. И., Степанов В. М. *Химия природн. соедин.*, 1983, № 1, с. 245–246.
14. Woods K. R., Wang K.-T. *Biochim. et biophys. acta*, 1967, v. 133, № 2, p. 369–370.
15. Eck R., Dayhoff M. O. *Atlas of Protein Sequence and Structure*. Silver Spring (Md), 1967, p. 206.
16. Morihara K., Tsuzuki H. *Biochim. et biophys. acta*, 1966, v. 118, № 1, p. 215–219.
17. Birktoft J. J., Blow D. M. *J. Mol. Biol.*, 1972, v. 68, № 2, p. 187–240.
18. Cohen G. H., Silvertown E. W., Davies D. E. *J. Mol. Biol.*, 1981, v. 148, № 3, p. 449–479.
19. Greer J. J. *J. Mol. Biol.*, 1981, v. 153, № 5, p. 1027–1042.
20. Vandlen R. L., Tulinsky A. *Biochemistry*, 1973, v. 12, № 21, p. 4193–4200.
21. Mavridis A., Tulinsky A., Liebman M. N. *Biochemistry*, 1974, v. 13, № 18, p. 3661–3666.
22. Sharma S. K., Hopkins T. R. *J. Biol. Chem.*, 1978, v. 253, № 8, p. 3055–3061.
23. Aune K. C., Timasheff S. N. *Biochemistry*, 1971, v. 10, № 7, p. 1609–1616.

Поступила в редакцию  
18.VIII.1982



**$\alpha$ -CHYMOTRYPSIN REACTION WITH COLOURED PHENACYL BROMIDE,  
 $\alpha$ -BROMO-4-AMINO-3-NITROACETOPHENONE**

TARASOVA N. I., LAVRENOVA G. I., ZAGNITKO O. P.,  
PETROVA E. N., STEPANOV V. M.

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

The reaction of  $\alpha$ -chymotrypsin with  $\alpha$ -bromo-4-amino-3-nitroacetophenone was investigated. The attachment of one inhibitor residue to Met<sup>192</sup> and ~0,2 residues to Asp<sup>64</sup> at pH 4 caused 82% decrease in the peptidase activity towards *L*-pyroglutamyl-*L*-phenylalanine *p*-nitroanilide. When the pH raised to 7, the degree of Met<sup>192</sup> modification was unchanged, while those for Asp<sup>64</sup> reached 0,5 residues per protein molecule. The latter modification, however, had no noticeable effect on the enzyme activity.  $\alpha$ -Chymotrypsin inactivation with phenacyl bromide appeared to result from the Met<sup>192</sup> alkylation. The increase in degree of Asp<sup>64</sup> esterification with pH shift is supposed to be caused by a pH-dependent conformational change in  $\alpha$ -chymotrypsin.