



УДК 577.152.34.02

УСТАНОВЛЕНИЕ ТИПА КАТАЛИЗА, ОСУЩЕСТВЛЯЕМОГО ПЕПТИДГИДРОЛАЗАМИ, ПО СКОРОСТИ ИЗОТОПНОГО ОБМЕНА КИСЛОРОДА АЦИЛАМИНОКИСЛОТ — ПРОДУКТОВ ГИДРОЛИЗА СПЕЦИФИЧЕСКИХ СУБСТРАТОВ

Гинодман Л. М., Камитанников Ю. В., Руми Л. Д., Антонов В. К.

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

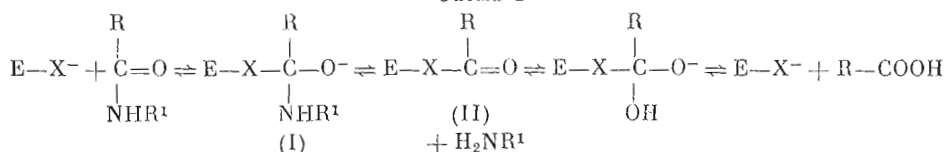
Предложен подход, позволяющий установить, по какому типу катализа — нуклеофильному или общему основному — функционирует исследуемая пептидгидролаза. Подход основан на определении скорости обмена кислорода карбоксильной группы ацильного продукта гидролиза специфического субстрата с кислородом воды ($H_2^{18}O$). Сущность подхода состоит в сопоставлении скоростей обмена кислорода карбоксильной группы ацильного продукта в отсутствие и в присутствии аминного продукта в определенных условиях, которые находят путем расчета на основании данных о кинетических параметрах и константе равновесия реакции гидролиза соответствующего специфического субстрата.

Предлагаемый подход применен для установления типа катализа, осуществляемого карбоксипептидазой А. Показано, что при гидролизе пептидных субстратов карбоксипептидаза А функционирует по типу общего основного катализа и что этот фермент способен катализировать реакцию собственного (прямого) обмена кислорода карбоксильной группы ацильного продукта с кислородом воды.

Несмотря на большие успехи, достигнутые в области установления структуры пептидгидролаз и их активных центров, обширные исследования по специфичности и кинетике гидролиза, использование методов ингибиторного анализа, однозначно установить тип катализа, осуществляемый конкретной пептидгидролазой, т. е. сделать выбор между альтернативными путями — общим основным и нуклеофильным катализом, — до недавнего времени, как правило, не представлялось возможным. Решить этот вопрос удалось с помощью разработанных в нашей лаборатории подходов, основанных на использовании $H_2^{18}O$ [1—4].

Один из подходов основан на исследовании реакции гидролиза в состоянии равновесия [4], при этом сопоставляют скорости включения в субстрат радиоактивных продуктов гидролиза. Данный подход применим для пептидгидролаз, функционирующих по упорядоченному кинетическому механизму, при котором ацильный продукт гидролиза субстрата является внешним (этот кинетический механизм кратко рассмотрен ниже). Было показано, что при гидролизе пептидов химотрипсин функционирует по типу нуклеофильного катализа (схема 1).

Схема 1

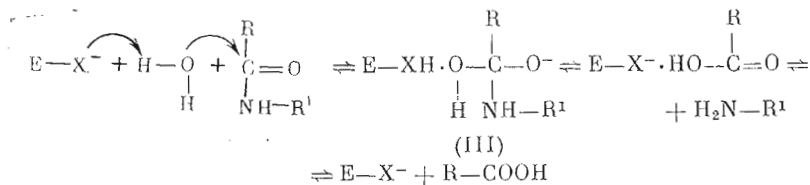


В ходе катализа образуется ковалентно связанное с ферментом промежуточное тетраэдрическое соединение (I), а затем ацилфермент (II).

Другой подход применим для ферментов, осуществляющих реакцию ацильного переноса. Он основан на том, что при функционировании пептидгидролазы по типу нуклеофильного катализа кислород из воды

(H₂¹⁸O) не включается в пептидную группу образующегося продукта переноса, а в случае общего основного катализа такое включение имеет место. С помощью этого подхода было показано, что папаин [1] функционирует по типу нуклеофильного катализа (схема 1), а пепсин, лейцил-аминопептидаза [2] и термоллизин [3] — по типу общего основного катализа (схема 2).

Схема 2



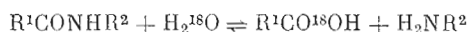
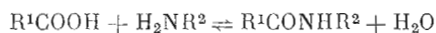
При общем основном катализе карбонильный атом углерода расщепляемой связи субстрата атакуется молекулой воды; каталитическая группа (X⁻) активного центра фермента выступает в качестве общего основного катализатора, акцептируя протон атакующей молекулы воды. В ходе реакции образуется тетраэдрическое промежуточное соединение (III), не связанное ковалентно с ферментом.

Еще один подход применим для ферментов, в активном центре которых функционирует карбоксильная группа, рассматриваемая как потенциальный нуклеофил. При нуклеофильном катализе эта группа должна обменивать кислород, при общем основном катализе обмен кислорода происходить не должен. С помощью этого подхода было подтверждено, что пепсин осуществляет общий основной катализ [2].

В данной работе рассматривается весьма универсальный подход, позволяющий установить тип катализа, осуществляемого пептидгидролазами, по скорости изотопного обмена кислорода ациламино кислот — продуктов гидролиза специфических субстратов. Прежде чем сформулировать сущность этого подхода, необходимо рассмотреть ряд исходных положений и условия, в которых он применим.

1. Продукты, образующиеся при гидролизе субстрата (R¹CONHR²), будем называть ацильным (R¹COOH) и аминным (H₂NR²).

2. При инкубации смеси ацильного и аминного продуктов с пептидгидролазой происходит обратимый синтез субстрата и устанавливается состояние динамического равновесия. Это приводит к обмену кислорода карбоксильной группы ацильного продукта с кислородом воды:



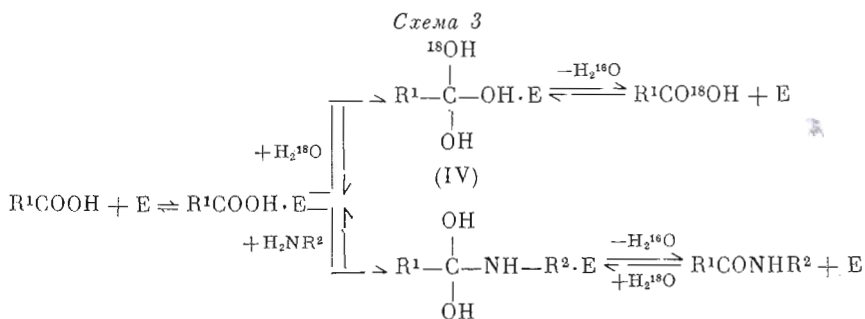
3. Для ряда пептидгидролаз показано [5, 6], что они катализируют реакцию изотопного обмена кислорода ацильного продукта с кислородом воды (в отсутствие аминного продукта):



Это так называемый собственный (или прямой) обмен кислорода.

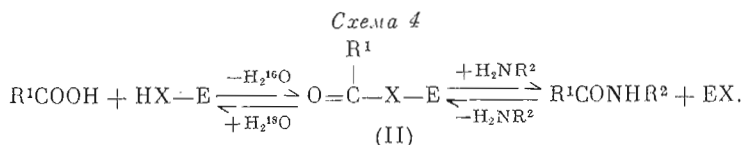
4. Ключевое положение рассматриваемого подхода вытекает из сопоставления влияния аминного продукта на скорость обмена кислорода ацильного продукта при альтернативных типах катализа.

При общем основном катализе собственный обмен кислорода ацильного продукта осуществляется в результате обратимого образования тетраэдрического соединения (IV). Этот процесс и обратимый синтез субстрата являются параллельными реакциями (схема 3):



В определенных условиях скорость обратимой реакции синтеза субстрата может оказаться выше скорости собственного обмена, т. е. при введении в систему аминного продукта скорость обмена кислорода ацильного продукта будет возрастать.

При нуклеофильном катализе, как видно из схемы процесса обратимого синтеза субстрата (схема 4), собственный обмен кислорода обусловлен обратимой реакцией синтеза ацилфермента (II), причем в образовании и гидролизе ацилфермента аминный продукт не участвует.

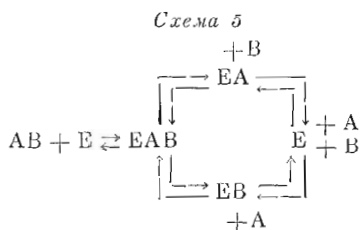


Таким образом, при нуклеофильном катализе скорость обмена кислорода ацильного продукта при введении в систему аминного продукта, т. е. при протекании реакции обратимого синтеза субстрата, не может возрастать; при общем же основном катализе, как было отмечено выше, введение в систему аминного продукта может вызывать ускорение обмена кислорода ацильного продукта. Это положение и является ключевым для рассматриваемого подхода.

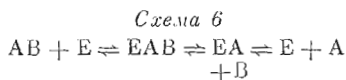
5. Сущность рассматриваемого подхода состоит в сопоставлении скорости обмена кислорода ацильного продукта в отсутствие и в присутствии аминного продукта. Ацильный и аминный продукты должны принадлежать эффективно гидролизуемому субстрату исследуемой пептидгидролазы. Для этого субстрата должны быть известны кинетические параметры (k_{cat} и K_m) и константа равновесия (K_p) реакции гидролиза. Для ацильного продукта должна быть определена скорость собственного обмена кислорода. Важное значение имеет выбор концентрации аминного продукта. Она должна быть достаточно большой, чтобы при общем основном катализе можно было обнаружить ускорение обмена кислорода за счет обратимого синтеза субстрата. Концентрацию аминного продукта выбирают на основании расчета скорости реакции гидролиза субстрата в состоянии равновесия.

Кинетические механизмы реакции гидролиза. Приближенный расчет скорости реакции гидролиза в состоянии равновесия

Ферментативные реакции, в результате которых образуются два продукта, в частности реакции гидролиза, протекают либо по неупорядоченному, либо по упорядоченному кинетическому механизму (схемы 5 и 6; АВ — субстрат, А и В — продукты, Е — фермент, ЕАВ — комплекс фермента с субстратом). При неупорядоченном механизме (схема 5) поведение продуктов симметрично, скорости их освобождения в состоянии равновесия, т. е. обмена соответствующих фрагментов субстрата с продуктами, одинаковы.



При упорядоченном механизме один из продуктов (на схеме 6 продукт В) освобождается первым, этот продукт (В) называют внутренним, другой продукт (А) — внешним.



Анализ кинетики упорядоченного механизма показывает, что скорости освобождения продуктов могут значительно различаться. Так, при высокой концентрации внутреннего продукта скорость освобождения внешнего продукта тормозится и может оказаться значительно ниже, чем скорость освобождения внутреннего продукта.

При нуклеофильном катализе осуществляется строго упорядоченный кинетический механизм, при этом ацильный продукт является внешним. Неупорядоченный механизм возможен только при общем основном катализе.

В общем случае для расчета скорости реакции гидролиза в состоянии равновесия необходимо знать константы скоростей всех стадий прямой и обратной реакций. Однако при неупорядоченном кинетическом механизме скорость реакции можно приближенно рассчитать по уравнению Михаэлиса:

$$v = \frac{k_{\text{cat}} [E] [S_p]}{K_m + [S_p]}$$

где k_{cat} и K_m — кинетические параметры реакции гидролиза субстрата, $[E]$ — концентрация фермента; $[S_p]$ — концентрация субстрата ($R^1\text{CONHR}^2$) в равновесии. Величину

$$[S_p] = \frac{[R^1\text{COOH}] [H_2\text{NR}^2]}{K_p}$$

рассчитывают по константе равновесия реакции гидролиза субстрата K_p и концентрациям продуктов. Подставляем в числитель для v вместо $[S_p]$ соответствующее выражение, в знаменателе величиной $[S_p]$ пренебрегаем (поскольку при гидролизе пептидов величина $[S_p]$ мала по сравнению с K_m) и получаем

$$v = \frac{k_{\text{cat}} [E] [R^1\text{COOH}] [H_2\text{NR}^2]}{K_m K_p}$$

Видно, что при прочих равных условиях скорость реакции пропорциональна концентрации аминного продукта.

Рассматриваемый подход применим только в том случае, если расчетная скорость обмена кислорода ацильного продукта за счет реакции обратимого синтеза субстрата выше скорости собственного обмена кислорода ацильного продукта.

Из проведенного анализа следует, что для установления типа катализа необходимо сопоставить скорость собственного обмена кислорода ацильного продукта с экспериментальной скоростью обмена кислорода этого продукта в присутствии аминного продукта в условиях, при которых приближенная расчетная скорость обмена кислорода за счет обратимой реакции синтеза субстрата выше скорости собственного обмена (или по крайней мере сопоставима с ней). Если скорость обмена кислорода в присутствии аминного продукта выше скорости собственного обмена, функ-

ционирование фермента по типу нуклеофильного катализа исключается и тем самым доказывается альтернативный путь — общий основной катализ. При нуклеофильном катализе скорость обмена кислорода ацильного продукта не будет превышать скорость собственного обмена.

Подтверждение функционирования химотрипсина по типу нуклеофильного катализа

Справедливость рассматриваемого подхода была проверена на примере химотрипсина, который, как было отмечено выше, осуществляет нуклеофильный катализ. Были выбраны два субстрата химотрипсина — AcPheAlaNH_2 и AcPheGlyNH_2 , для которых известны кинетические параметры и константы равновесия реакции гидролиза ($\text{AcPheAlaNH}_2 - k_{\text{cat}} = 168 \text{ мин}^{-1}$, $K_m = 2,5 \cdot 10^{-2} \text{ М}$, $K_p = 2,5 \text{ М}$; $\text{AcPheGlyNH}_2 - k_{\text{cat}} = 7,2 \text{ мин}^{-1}$, $K_m = 4 \cdot 10^{-2} \text{ М}$, $K_p = 2,5 \text{ М}$ [7, 8]). Была определена скорость обмена кислорода AcPheOH в отсутствие и в присутствии аминных продуктов HAlaNH_2 и HGlyNH_2 . Условия опытов, результаты расчетов и экспериментов приведены в табл. 1. Видно, что система $\text{AcPheOH} + \text{HAlaNH}_2$ отвечают условиям применимости рассматриваемого подхода. Действительно, расчетная скорость почти на два порядка превышает скорость собственного обмена. Система $\text{AcPheOH} + \text{HGlyNH}_2$ не является оптимальной, так как расчетная скорость примерно равна скорости собственного обмена, однако исследование этой системы также дает определенную информацию. Введение аминных продуктов не увеличивает скорость обмена кислорода ацильного продукта; более того, наблюдается торможение собственного обмена, которое сильнее выражено в присутствии HAlaNH_2 , что, как было отмечено выше, предусматривается кинетикой упорядоченного кинетического механизма. Таким образом, полученные данные подтверждают функционирование химотрипсина по типу нуклеофильного катализа; они свидетельствуют о применимости рассматриваемого подхода.

Установление типа катализа при функционировании карбоксипептидазы А

При исследовании карбоксипептидазы А мы учитывали, что сходные подходы, основанные на данных о скорости обмена кислорода ацильного продукта за счет обратимой реакции синтеза субстрата, уже были ранее использованы в работе нашей лаборатории [9], а позднее в работе [10]. В обеих работах было сделано заключение о функционировании фермента по типу общего основного катализа. Это заключение основывалось, однако, на расчетах, в которых было использовано весьма приближенное значение константы равновесия реакции гидролиза субстратов карбоксипептидазы. Важно отметить также, что позднее появилась работа [11], в которой снова постулировалось, что этот фермент осуществляет нуклеофильный катализ.

Объектом нашего исследования явилась система $\text{VzGlyOH} + \text{HPheOH}$, которая ранее была использована в работе [10]. С целью получения более убедительных результатов опыты проводили при двух значениях pH — 7,5 и 5,3. При этих значениях pH были определены кинетические параметры гидролиза VzGlyPheOH . Было найдено, что при pH 7,5 $k_{\text{cat}} = 3740 \text{ мин}^{-1}$, $K_m = 7,7 \cdot 10^{-3} \text{ М}$; при pH 5,3 $k_{\text{cat}} = 150 \text{ мин}^{-1}$, $K_m = 6 \cdot 10^{-3} \text{ М}$. Константу равновесия гидролиза при обоих значениях pH принимали равной соответствующей константе, найденной для AcPhePheOH при pH 7,5 (30 М, см. «Экспер. часть»). Это справедливо, поскольку энергия гидролиза пептидной связи практически не должна зависеть от природы аминокислот, образующих связь, а при переходе от pH 7,5 к pH 5,3 состояние ионизации ацильного и аминного продуктов практически не изменяется. Условия опытов, результаты расчета и экспериментов приведены в табл. 2.

Полученные данные показывают, что при введении аминного продукта ацильный продукт обменивает кислород со скоростью, согласующейся с расчетной. Согласно рассматриваемому подходу, эти результаты исключают функционирование карбоксипептидазы А по типу нуклеофильного

**Влияние аминных продуктов на скорость катализируемого химотрипсином
обмена кислорода AcPheOH**
[AcPheOH]=0,02 М, [E]=10⁻⁴ М, [аминный продукт]=0,5 М, рН 7,5, 20° С

Аминный продукт	Скорость собственного обмена, М/мин	Скорость обмена в присутствии аминного продукта, М/мин		
		расчетная		экспериментальная
		за счет реакции обратимого синтеза субстрата	суммарная *	
HAlaNH ₂	(3±0,6)·10 ⁻⁵	1,3·10 ⁻³	1,3·10 ⁻³	(1,5±0,3)·10 ⁻⁵
HGlyNH ₂	(3±0,6)·10 ⁻⁵	3,3·10 ⁻⁵	6,0·10 ⁻⁵	(2,1±0,4)·10 ⁻⁵

* В предположении об аддитивности скоростей собственного обмена и обмена за счет обратимой реакции синтеза субстрата.

Таблица 2

Скорость обмена кислорода VzGlyOH в присутствии HPheOH
[VzGlyOH]=[HPheOH]=10⁻² М, [E]=4,8·10⁻⁵ М (рН 7,5) или 6,3·10⁻⁵ М (рН 5,3), 20° С

рН	Скорость, М/мин	
	расчетная	экспериментальная *
7,5	1,2·10 ⁻⁴	(2,3±0,4)·10 ⁻⁴
5,3	1,5·10 ⁻⁵	(1,4±0,3)·10 ⁻⁵

* В условиях эксперимента собственный обмен кислорода VzGlyOH не наблюдался.

катализа; они подтверждают представление о том, что при гидролизе пептидов фермент осуществляет общий основной катализ.

На примере карбоксипептидазы можно рассмотреть также весьма важный вопрос о связи между способностью пептидгидролазы катализировать реакцию собственного обмена кислорода ацильного продукта и типом осуществляемого ею катализа. Ранее в нашей лаборатории было показано [5], что ряд ациламиноокислот, в частности AcPheOH, при инкубации с карбоксипептидазой А обменивает кислород с кислородом воды; предполагалось, что происходит собственный (прямой) обмен. Авторы работы [10] также зарегистрировали обмен кислорода AcPheOH при инкубации с карбоксипептидазой, однако полагали, что он обусловлен не собственным обменом, а обратимой реакцией синтеза AcPhePheOH за счет HPheOH, который освобождается при частичном гидролизе AcPheOH карбоксипептидазой. В работе [10] постулировалось также, что пептидгидролаза, осуществляющая общий основной катализ, не катализирует реакцию собственного обмена кислорода.

Нами было установлено, что при инкубации AcPheOH (2·10⁻² М) с ферментом (7,5·10⁻⁶ М) в течение 2 ч (рН 7,5; 20° С) обмен кислорода составил 60%, скорость обмена 1,8·10⁻⁴ М/мин. С помощью тринитробензолсульфокислоты (реагента на аминогруппу) было найдено, что концентрация HPheOH к концу инкубации составила 1,6·10⁻⁴ М (гидролиз AcPheOH прошел на 0,8%). Отметим, что эффективная (средняя за период инкубации) концентрация HPheOH была меньше 1,6·10⁻⁴ М. Поскольку фермент осуществляет общий основной катализ, ожидаемое ускорение обмена за счет обратимого синтеза AcPhePheOH можно приближенно рассчитать по уравнению Михаэлиса. Кинетические параметры гидролиза AcPhePheOH известны ($k_{cat}=8700 \text{ мин}^{-1}$, $K_m=9 \cdot 10^{-4} \text{ М}$, рН 7,5 [9]); константа равновесия этой реакции определена в данной работе. В резуль-

тате расчета найдено, что при $[H\text{PheOH}] = 1,6 \cdot 10^{-4}$ М скорость обмена кислорода $Ac\text{PheOH}$ составит $2,4 \cdot 10^{-6}$ М/мин; эта скорость примерно на два порядка ниже, чем скорость обмена, зарегистрированная в эксперименте. Следовательно, по данным расчета, наблюдаемый обмен кислорода $Ac\text{PheOH}$ не может быть объяснен обратимым синтезом $Ac\text{PhePheOH}$.

К такому же заключению привели и результаты эксперимента. Было найдено, что скорость обмена кислорода $Ac\text{PheOH}$ не увеличивается в присутствии $1,6 \cdot 10^{-4}$ М $H\text{PheOH}$ (исходная концентрация), т. е. в условиях, когда эффективная концентрация $H\text{PheOH}$ была по крайней мере в 2 раза выше, чем в опытах без добавления $H\text{PheOH}$. Если бы обмен кислорода был обусловлен образованием свободного $H\text{PheOH}$, то удвоение концентрации последнего должно было бы привести к ускорению обмена.

Таким образом, показано, что катализируемый карбоксипептидазой А обмен кислорода $Ac\text{PheOH}$ не является результатом обратимого синтеза $Ac\text{PhePheOH}$, следовательно, происходит собственный обмен. Отметим, что пепсин, осуществляющий общий основной катализ, также катализирует собственный обмен кислорода ацильного продукта [6].

В заключение подчеркнем, что ни наличие у фермента способности катализировать реакцию собственного обмена кислорода ацильного продукта, ни отсутствие такой способности (в конкретных условиях эксперимента) не позволяют сделать заключение о типе катализа. Только сопоставление скоростей обмена кислорода ацильного продукта в отсутствие (собственный обмен) и в присутствии аминного продукта (в условиях, предусмотренных предлагаемым подходом) позволяют решить вопрос о типе катализа.

Экспериментальная часть

В работе использовали: химотрипсин — кристаллический препарат Ленинградского мясокомбината, содержание активного фермента 85% (по данным титрования активных центров *N-транс*-диниамолимидазолом); карбоксипептидазу А (Merck, ФРГ), активность 35 МЕ (по скорости гидролиза $Bz\text{GlyPheOH}$ [12]); $H\text{PheOH}$, $\text{HCl} \cdot H\text{PheOMe}$, $\text{HCl} \cdot \text{HAlaOMe}$, $Bz\text{GlyOH}$, $Z\text{GlyNH}_2$, $Ac\text{TyrOEt}$ (Reanal, Венгрия); H_2^{18}O (тяжелокислородная вода, содержание ^{18}O 80 ат.%) и $[^{14}\text{C}]H\text{PheOH}$ (518 мКи/ммоль; Amersham, Англия); 2, 4, 6-тринитробензолсульфокислоту (Serva, ФРГ); остальные реактивы объединения «Союзреактив» марки не ниже х. ч.

$Ac\text{PheOH}$ получали ацелированием $H\text{PheOH}$ *N*-ацетоксисукцинимидом [4]. Выход 90%, т. пл. 173–174° С (вода), $[\alpha]_D^{20}$ 45° (с 1, этанол).

$\text{CH}_3\text{COOH} \cdot \text{HAlaNH}_2$. 5 г $\text{HCl} \cdot \text{HAlaOMe}$ растворяли в 15 мл MeOH , насыщали аммиаком при -10°C и выдерживали в запаянной ампуле 2 сут при 20°C . Раствор упаривали досуха, остаток растворяли в 10 мл MeOH , добавляли 1 экв. ледяной уксусной кислоты, а затем этилацетат до начала кристаллизации. Осадок отфильтровывали и перекристаллизовывали из смеси метанол — этилацетат. Выход 80%, т. пл. 231–233° С.

$HBr \cdot HGlyNH_2$ получали из $ZGlyNH_2$ действием раствора HBr в ледяной уксусной кислоте. Перекристаллизовывали из смеси метанол — этилацетат (5:1), т. пл. 241–242° С.

$BzGlyOMe$, $Ac\text{PheOMe}$ и $[^{14}\text{C}]H\text{PheOMe}$ получали этерификацией $BzGlyOH$, $Ac\text{PheOH}$ и $[^{14}\text{C}]H\text{PheOH}$ диазометаном. Вещество растворяли в метаноле или этилацетате и добавляли свежеперегнанный эфирный раствор диазометана до устойчивой (в течение 10 мин) желтой окраски. Полученный раствор упаривали досуха.

$BzGlyPheOH$, $BzGly[^{14}\text{C}]PheOH$ получали из $BzGlyOH$ и $H\text{PheOMe}$ ($[^{14}\text{C}]H\text{PheOMe}$) карбодимидным методом с использованием *N*-гидрооксипептидазола [13] с последующим омылением щелочью соответствующих эфиров. Выход 70%, т. пл. 146–147° С. При инкубации с карбоксипептидазой А пептид гидролизуются на 95%.

$Ac\text{Phe}^{18}\text{OH}$ и $Bz\text{Gly}^{18}\text{OH}$ получали путем омыления соответствующих метиловых эфиров в H_2^{18}O .

Радиоактивность препаратов определяли на автоматическом сцинтилляционном счетчике SI-40 (Intertechnique, Франция).

Содержание ^{18}O в метиловых эфирах *N*-ациламино кислот определяли на хромато-масс-спектрометре LKB 9000 (Швеция).

Катализируемый химотрипсином обмен кислорода в $Ac\text{PheOH}$; влияние HAlaNH_2 и $HGlyNH_2$. 2,07 мг (10 мкмоль) $Ac\text{Phe}^{18}\text{OH}$ и 4 мг (0,16 мкмоль) химотрипсина инкубировали 4 ч в 1 мл 0,1 М трис- HCl -буфера, pH 7,5, содержащего 0,1 М KCl , при 20°C в отсутствие аминного компонента или в присутствии 74 мг (500 мкмоль) $\text{CH}_3\text{COOH} \cdot \text{HAlaNH}_2$ либо 82 мг (500 мкмоль) $HBr \cdot HGlyNH_2$; реакцию останавливали подкислением HCl до pH 1. $Ac\text{PheOH}$ экстрагировали этилацетатом (3×3 мл), органический слой промывали водой, высушивали над безводным сульфатом натрия и

концентрировали в вакууме. АсPheOH этирфицировали диазометаном и содержание ^{18}O определяли масс-спектрометрически.

Определение константы равновесия реакции гидролиза АсPhePheOH.

а) *Достижение равновесия в направлении синтеза.* 20,7 мг (100 мкмоль) АсPheOH и 1,65 мг (10 мкмоль) ^{14}C HPheOH (2,1 мКи/мкмоль) растворяли в 1 мл 0,1 М трис-НСI-буфера, рН 7,5, содержащего 0,5 М NaCl, и добавляли раствор карбоксипептидазы А. Конечные концентрации: [АсPheOH]-0,1, [HPheOH]- 10^{-2} , [E]- 10^{-7} М. Инкубировали при 20° С, пробы реакционной смеси (10 мкл) отбирали через 5 и 10 мин и хроматографировали на пластинках *Siinfo* (ЧССР) в системе эфир-муравьиная кислота-вода, 4,7:0,3:0,15 (по объему). По окончании хроматографии пластинки высушивали, разрезали на полоски и определяли в них радиоактивности.

б) *Достижение равновесия в направлении гидролиза.* Реакционную смесь предыдущего опыта после 10-минутной инкубации разводили в 2 раза буферным раствором. Через 10 и 30 мин инкубации отбирали пробы по 10 мкл и хроматографировали в указанной выше системе.

Расчет константы равновесия проводили по формуле

$$K_p = \frac{[\text{AcPheOH}][\text{HPheOH}]}{[\text{AcPhePheOH}]},$$

при этом вместо отношения концентраций [HPheOH]/[AcPhePheOH] использовали отношение соответствующих радиоактивностей. Среднее значение $K_p=30$ М (рН 7,5; 20° С).

Кинетические параметры гидролиза VzGlyPheOH при рН 7,5 и 5,3. Гидролиз VzGlyPheOH при рН 7,5 проводили в 0,1 М трис-НСI-буфере, содержащем 0,5 М NaCl, при 20° С. За ходом реакции следили по изменению оптической плотности при 254 нм ($\Delta\varepsilon_{254}=360 \text{ M}^{-1}\cdot\text{см}^{-1}$). Диапазон концентраций VzGlyPheOH $2,2\cdot 10^{-4}$ – $3,7\cdot 10^{-5}$ М. Концентрация карбоксипептидазы А $4,5\cdot 10^{-8}$ М. Гидролиз VzGlyPheOH при рН 5,3 проводили в 0,2 М Na-ацетатном буфере, содержащем 0,5 М NaCl, при 20° С. Диапазон концентраций VzGlyPheOH 10^{-3} – $3\cdot 10^{-4}$ М. Концентрация фермента $4,5\cdot 10^{-7}$ М. Кинетические параметры реакции гидролиза (k_{cat} и K_m) определяли по методу Лайнуивера – Берка.

Обмен кислорода VzGlyOH в присутствии HPheOH.

а) *рН 7,5.* 1,79 мг (10 мкмоль) VzGly ^{18}O и 1,65 мг (10 мкмоль) HPheOH инкубировали с карбоксипептидазой А в 1 мл 0,1 М трис-НСI-буфера, содержащего 0,5 М NaCl, при 20° С в течение 1 ч. Конечные концентрации: [VzGly ^{18}O] 10^{-2} , [HPheOH] 10^{-2} , [E] $4,8\cdot 10^{-5}$ М. По окончании инкубации реакционную смесь подкисляли 1 М HCl до рН 1–2. VzGlyOH экстрагировали этилацетатом (3×3 мл). Органический слой промывали водой и высушивали над безводным сульфатом натрия. VzGlyOH этирфицировали и анализировали масс-спектрометрически.

б) *рН 5,3.* Постановка опытов была такой же, как описано выше. Использовали 0,2 М Na-ацетатный буфер, содержащий 0,5 М NaCl. Концентрация фермента $6,3\cdot 10^{-5}$ М. Инкубацию вели 20 ч.

Катализируемый карбоксипептидазой А обмен кислорода АсPheOH в отсутствие и в присутствии HPheOH. 5,15 мг (20 мкмоль) АсPhe ^{18}O инкубировали с ферментом в 2 мл 0,1 М трис-НСI-буфера, рН 7,5, содержащего 0,5 М NaCl, при 20° С. Конечные концентрации: [АсPheOH] 10^{-2} , [HPheOH] 0 или $2\cdot 10^{-4}$, [E] $7,5\cdot 10^{-6}$ М. Пробу отбирали через 2 ч. Выделение, метилирование и анализ АсPheOH проводили, так, как описано выше для опытов с VzGlyOH.

Определение количества HPheOH, освобождающегося из АсPheOH при инкубации с карбоксипептидазой А. Из описанной выше реакционной смеси (не содержащей в исходном состоянии HPheOH) отбирали пробы по 0,5 мл через 1, 2 и 4 ч. Определяли количество образовавшегося HPheOH, используя в качестве реагента на аминокгруппу тринитробензолсульфокислоту [14.]. Найдено, что концентрация HPheOH в смеси после 2 ч инкубации составляет $1,6\cdot 10^{-4}$ М.

ЛИТЕРАТУРА

1. Капитанников Ю. В. Нуклеофильный и общий основной катализ при функционировании пептидгидролаз: Дис. ... канд. хим. наук. М.: Ин-т биоорг. химии, 1984. С. 108.
2. Антонов В. К., Гинодман Л. М., Румш Л. Д., Капитанников Ю. В., Баршевская Т. Н., Явашев Л. П., Гурова А. Г., Волкова Л. И. // Биоорг. химия. 1980. Т. 6. № 3. С. 436–445.
3. Antonov V. K., Ginozman L. M., Rumsh L. D., Kapitannikov Y. V., Barshevskaya T. N., Yavashhev L. P., Gurova A. G., Volkova L. J. // Eur. J. Biochem. 1981. V. 117. № 1. P. 195–200.
4. Гурова А. Г., Гинодман Л. М., Антонов В. К. // Молекулярн. биология. 1973. Т. 7. С. 810–816.
5. Козлов Л. В. // Успехи соврем. биол. 1968. Т. 66. Вып. 1(4). С. 33–50.
6. Гинодман Л. М., Козлов Л. В., Мальцев Н. И., Орехович В. Н. // Механизм и кинетика ферментативного катализа. М.: Наука, 1964. С. 61–69.
7. Fastrez J., Fersht A. R. // Biochemistry. 1973. V. 12. № 11. P. 2025–2034.
8. Гурова А. Г., Гинодман Л. М., Антонов В. К. // Молекулярн. биология. 1977. Т. 11. № 5. С. 1155–1159.

9. Козлов Л. В. Исследование катализируемой пепсином реакции изотопного обмена кислорода ациламинокислот: Дис. ... канд. хим. наук. М.: Ин-т биоорг. химии, 1966. С. 65.
10. Breslow R., Wernick D. L. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1977. V. 74. № 4. P. 1303—1307.
11. Sander M. E., Witzel H. // Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1985. V. 132. № 2. P. 681—687.
12. Folk M. E., Schrimmer E. W. // J. Biol. Chem. 1963. V. 238. № 12. P. 3884.
13. König W., Geiger R. // Chem. Ber. 1970. V. 103. P. 788—798.
14. Ryle A. P., Porter R. R. // Biochem. J. 1959. V. 73. № 1. P. 75—86.

Поступила в редакцию
8.VI.1988

**TYPE OF PEPTIDEHYDROLASE CATALYSIS ESTABLISHED
BY THE RATE OF ISOTOPE EXCHANGE OF OXYGEN ATOM
IN ACYLAMINO ACIDS, PRODUCTS OF HYDROLYSIS
OF SPECIFIC SUBSTRATES**

GINODMAN L. M., KAPITANNIKOV Yu. V., RUMSH L. D., ANTONOV V. K.

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

An approach to establishing the type of catalysis (nucleophilic or general basic) for peptidehydrolases has been proposed basing on kinetics of exchange of carboxyl oxygen for oxygen of water ($H_2^{18}O$) in the acyl product of hydrolysis of a specific substrate. Rates of exchange of the carboxyl oxygen are compared in the absence and presence of the amine product under certain conditions found by calculation based on kinetic parameters and equilibrium constant of hydrolysis of the specific substrate. Using this approach, carboxypeptidase A has been shown to function upon hydrolysis of peptide substrates, via the general basic catalysis; it can catalyse direct exchange of the carboxyl oxygen of acyl product for water oxygen.