



УДК 577.156.41

ОСТАТОК ТИРОЗИНА В СУБСТРАТСВЯЗЫВАЮЩЕМ УЧАСТКЕ  
АКТИВНОГО ЦЕНТРА ПЕПСИНАЗавада Л. Л., Козлов Л. В., Волкова Л. И.,  
Антонов В. К.Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина  
Академии наук СССР, Москва

Модифицирование одного остатка тирозина в пепсине *n*-нитрофенилдиазоний-хлоридом приводит к потере пептидазной и снижению протеиназной активности. В реакцию азосочетания вступает преимущественно остаток Tyr<sup>189</sup>. Азопепсин обнаруживает индуцированный эффект Коттона с экстремумами при 340 и 460 нм, который исчезает при связывании ингибитора — пепстатина. Метилловый эфир фенилаланина защищает остаток тирозина от модифицирования. Сделан вывод об участии Tyr<sup>189</sup> в субстратсвязывающем участке активного центра пепсина.

Модифицированию остатков тирозина в пепсине и пепсиногене свиньи (КФ 3.4.23.1) посвящено большое число работ [1—14]. Во всех этих работах наблюдалось изменение ферментативной активности и модифицированию подвергалось несколько остатков тирозина, что не позволяло судить о роли какого-либо конкретного остатка в каталитическом акте или в связывании субстрата (табл. 1).

Из табл. 1, отражающей влияние модифицирования на протеиназную активность, видно, что нитрование пепсина приводит к уменьшению лишь протеиназной активности, в то время как пептидазная полностью сохраняется [9]. Ацетилирование пепсина повышает пептидазную и эстеразную активности и понижает протеиназную [4, 6]. Иодирование же пропорционально снижает все гидролитические способности пепсина [2, 6]. В связи с этим уместно упомянуть различное влияние на пептидазную и эстеразную активности модифицирования остатка тирозина-248 в активном центре карбоксипептидазы А. Этот остаток тирозина также претерпевает различные модификации с изменением активности, однако его роль до последнего времени окончательно не выяснена [16—21].

Более определенные сведения об ограниченном числе функционально важных остатков тирозина в пепсине следуют из данных по защите от модификации субстратом или его аналогами. Так, этиловый эфир фенилаланина защищает от нитрования ~1 остаток тирозина [9], Ac-DL-Phe-DL-Phe предотвращает ацетилирование 2 остатков тирозина ацетилимидазолом и уменьшает падение активности по гемоглобину при ацетилировании [4], а при модификации протеиназы из *Rhizopus chinensis*, близкой

Сокращения: AzoTyr — азотирозин, *n*-нитрофенилдиазо-*L*-тирозин; азопепсин — пепсин, модифицированный с помощью *n*-нитрофенилдиазонийхлорида; TyrNO<sub>2</sub> — 3-нитротирозин.

## Влияние модифицирования остатков тирозина в пепсине на протеиназную активность (по гидролизу гемоглобина)

Модифицирование	Реагент	Число модифицированных Туг	Активность, %	Литература
Иодирование	KI <sub>3</sub>	2	25	[2]
Ацетилирование	Кетен	3	60	[3]
»	Ацетилимидазол	4	67	[4]
»	»	9,5	12	[4]
»	»	9-10	40	[5]
»	»	4	25	[6]
Малонилирование	Недокись углерода	4	50	[7]
Нитрование	Тетранитрометан	4	43	[9]
»	»	6	20	[9]
» *	»	3	50	[14]
Диазосочетание **	<i>n</i> -Нитрофенилдиазонийфторборат	2,9	3 ***	[15]

\* Нитрование пепсиногена с последующей активацией.

\*\* Кислая протеиназа *Rhizopus chinensis*.

\*\*\* Активность по гидролизу казеина.

по свойствам пепсину, *n*-нитрофенилдиазонийфторборатом Glu-Glu-Phe специфически прикрывает 1 остаток тирозина от модификации [15].

Для того чтобы более избирательно модифицировать тирозиновый остаток пепсина, возможно присутствующий в активном центре фермента, мы решили воспользоваться реакцией азосочетания. Однако известно, что тирозин вступает в реакции азосочетания в щелочной среде, т. е. в условиях инактивации пепсина. Поэтому мы выбрали наиболее активную азосоставляющую — соль *n*-нитрофенилдиазония. Кроме того, у нас была надежда, что тирозиновый остаток в активном центре может отличаться по своей реакционной способности от других доступных остатков тирозина. Наконец, специфичность, проявляемая пепсином в катализируемых им реакциях, свидетельствовала о гидрофобно-ароматической природе связывания субстрата [22], вследствие чего *n*-нитрофенилдиазоний мог выступать в качестве аффинной метки. Как отмечалось выше, этот модификатор применялся в случае кислой протеиназы из *Rhizopus chinensis* [15]. Условия, применяемые для модификации этой протеиназы (рН 7), не пригодны для пепсина из-за щелочной денатурации последнего при рН  $\geq 6$ . Кроме того, в этих условиях в протеиназе модифицировалось несколько остатков тирозина.

Мы исследовали инактивацию пепсина *n*-нитрофенилдиазонийхлоридом в широком диапазоне рН и нашли, что потеря активности пепсином наблюдается при обработке реагентом уже при рН 2, однако с ростом рН скорость инактивации возрастает (см. рис. 1). Обработка пепсина солью диазония в присутствии 50 мМ метилового эфира фенилаланина при рН 4,1 приводит к инактивации пепсина со скоростью в 3,8 раза меньшей, чем в отсутствие PheOMe. Как показывают несложные расчеты, при этой концентрации PheOMe свободного фермента в растворе меньше в  $3,3 \pm 0,4$  раза ( $K_i = 22 \pm 3$  мМ [23]). Следовательно, субстратный аналог — PheOMe защищает фермент от модифицирования тирозинового остатка, существенного для ферментативной активности.

Для препаративного получения пепсина, модифицированного *n*-нитрофенилдиазонийхлоридом (азопепсина), обработку белка проводили при рН 4,0—5,0 130-кратным молярным избытком реагента, контролируя время обработки. После гель-фильтрации через сефадекс G-25 получили препараты, содержащие  $\sim 1$  остаток модифицированного тирозина, с активностью по гемоглобину  $\sim 65\%$  от исходной.

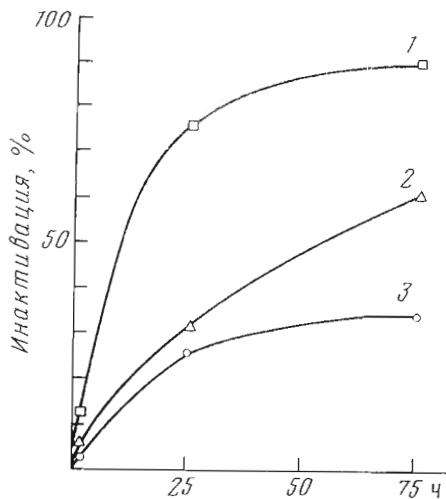


Рис. 1.

Рис. 1. Кинетика потери активности пепсина (по гемоглобину) при его модифицировании *n*-нитрофенилдиазонийхлоридом. рН: 1 — 4,1; 2 — 4,1 в присутствии 0,05 М PheOMe; 3 — 2,0

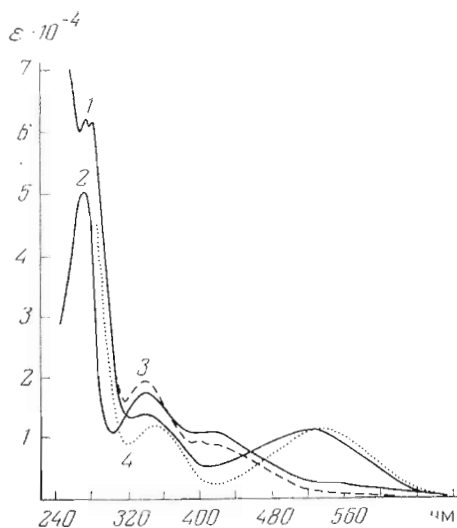


Рис. 2

Рис. 2. Спектры поглощения азопепсина (1, 2) и ацетилазотирозина (3, 4). рН: 1 — 10,35; 2 — 6,55; 3 — 5,1; 4 — в 0,1 н. NaOH

Для определения числа модифицированных остатков и оценки спектральных характеристик препарата было синтезировано модельное соединение — *N*-ацетил-*n*-нитрофенилазотирозин (ацетилазотирозин). На рис. 2 приведены спектры модельного соединения и пепсина при кислых и щелочных значениях рН. Как следует из сопоставления спектров, молекула азопепсина содержит ~1 остаток модифицированного тирозина. По литературным данным [15], модельное соединение в 0,1 н. NaOH имеет две полосы поглощения в видимой и близкой УФ областях спектра:  $\epsilon_{352}$  12 700 и  $\epsilon_{530}$  11 400. Мы получили в этих же условиях значения:  $\epsilon_{350}$  11 800 и  $\epsilon_{510}$  11 250. При рН 5,1 в 0,1 н. ацетатном буфере имеется полоса поглощения  $\epsilon_{335}$  19 200 и плечо при 400 нм  $\epsilon_{400}$  9300. Белок имеет небольшие отличия в величинах экстинкций, однако общий характер спектров одинаков.

Следует отметить, что препарат азопепсина, содержащий 1 остаток модифицированного тирозина, обладая 65% активности (от исходной) в отношении гидролиза белкового субстрата — гемоглобина, не катализирует гидролиз низкомолекулярного субстрата Ac-Phe-Tyr. Эти данные наряду с данными по защите от модификации PheOMe позволяют предположить, что в пепсине специфически модифицируется остаток тирозина, расположенный в активном центре (или вблизи него).

Это предположение подтверждается также данными спектров кругового дихроизма азопепсина, его комплекса со специфическим ингибитором — пепстатином и модельного соединения (рис. 3). Азопепсин имеет две полосы дихроичного поглощения с экстремумами при 340 нм ( $[\theta]^{25} = -8000$ ) и при 460 нм ( $[\theta]^{25} = +4000$ ). При связывании пепстатина характерный спектр КД практически исчезает. Так же слабо выражен спектр КД модельного соединения.

Полученные спектры поглощения и КД азопепсина укладываются в общие закономерности спектров азобелков, рассмотренные в обзоре [24]: наличие максимума при 340 нм, плеча при 400 нм, «хвоста», тянущегося до 500 нм, характерно для моноазотирозина. В спектре КД азобелков, как правило, наблюдаются 2—3 полосы с центрами при 320—340, 375—

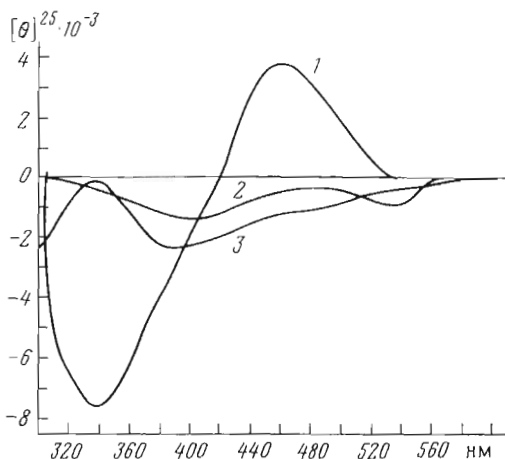


Рис. 3. Спектры КД азопепсина (1), его комплекса с пепстатином (2) и азотиросина (3)

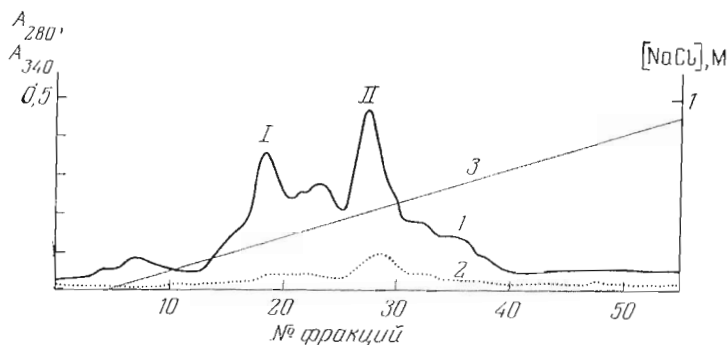


Рис. 4. Разделение на DEAE-целлюлозе DE-32 фрагментов I и II автолитического расщепления азопепсина (остатки 1—179 и 180—327 соответственно). Скорость элюции 15 мл/ч, объем фракций 5 мл. 1 —  $A_{280}$ , 2 —  $A_{340}$ , 3 —  $[NaCl]$ , М

395 и 420—455 нм [24]. Спектр КД азопепсина очень похож на спектр азорибонуклеазы [24], а в случае арсанилазохимотрипсина спектр КД существенно изменялся (по амплитуде и знаку эллиптичности при 440 нм) при активации, т. е. превращении в арсанилазохимотрипсин [25]. Как отмечают в своем обзоре Риордан и Вэйли [26], исследование индуцированного эффекта Коттона азотиросина является хорошим средством для изучения окружения модифицированных остатков.

Исследование доступности тирозиновых остатков пепсина пертурбанту — этиленгликолю [27] показало, что при связывании пепстатина количество их уменьшается на 1,5 остатка. Это позволяет предполагать участие  $\sim 1$  остатка тирозина в связывании ингибиторов и субстратов. По-видимому, этот остаток тирозина и подвержен модификации диазореагентом, поскольку связывание пепстатина меняет окружение азохромофора в азопепсине, что приводит к изменению эффекта Коттона, регистрируемому спектрами кругового дихроизма.

Спектрофотометрическое титрование азотиросина в модельном соединении и азопепсине обнаруживает небольшое различие в величинах  $pK_a$ : для белка (определение проводилось для  $\lambda_{\text{макс}}$  520 нм)  $pK_a$   $9,0 \pm 0,3$ , для модели ( $\lambda_{\text{макс}}$  535 нм)  $8,8 \pm 0,2$ .

С целью локализации модифицированного остатка тирозина в молекуле пепсина мы осуществили автолитическое расщепление азопепсина на два фрагмента, представляющих две половины молекулы пепсина: N-

Аминокислотный состав I и II фрагментов автолитического расщепления азопепсина и нитропепсина

Аминокислота	I фрагмент		II фрагмент			Аминокислота	I фрагмент		II фрагмент		
	азо-пепсин	пепсин (1—179)	нитро-пепсин	азо-пепсин	пепсин (180—327)		азо-пепсин	пепсин (1—179)	нитро-пепсин	азо-пепсин	пепсин (180—327)
Asp	23,8	23	15,8	15,6	19	He *	12,9	11	6,8	11,2	15
Thr *	13,2	15	10,8	8,5	11	Leu	15,8	17	6,7	10,8	8
Ser *	26,4	26	14,9	14,5	18	Tyr *	4,1	11	4,7	5,1	5
Glu	17,5	14	12,6	13,1	12	Phe	8,5	10	4,1	3,0	4
Pro	6,8	8	6,7	6,3	7	His	0,5	1	0,1	0,2	0
Gly	23,4	21	14,0	14,0	14	Lys	0,0	0	1,0	0,6	1
Ala	8,4	7	8,8	7,5	9	Arg	0,0	0	1,5	1,1	2
Cys *	2,2	2	2,0	0,3	4	Trp **	—	2	—	—	3
Val *	12,5	10	9,5	8,3	12	TyrNO <sub>2</sub>	—	—	1,2	—	—
Met *	1,0	1	—**	1,2	3	AzoTyr	0,07	—	—	0,4	—

\* Заниженное содержание известно и объясняется либо разрушением в ходе гидролиза, либо неполнотой гидролиза.

\*\* Не определяли.

Таблица 3

Аминокислотный состав фрагмента СРI

Аминокислота	Относительное количество	Аминокислота	Относительное количество
Asp	0,1	Gly	0,9
Ser	0,3	Ala	0,1
Glu	0,1	AzoTyr *	1,0

\* Определяли по светопоглощению.

концевую (остатки 1—179) и С-концевую (180—327) [28, 29] (см. также аминокислотную последовательность пепсина [30]). Разделение пиков на DEAE-целлюлозе (рис. 4) показало, что большая часть окраски присутствует во втором пике. Аминокислотный состав двух фрагментов приведен в табл. 2; азотирозин определяли, исходя из светопоглощения фракций при 340 нм. Таким образом, можно было показать, что модификации подвергается один из пяти тирозиновых остатков: 189, 268, 275, 310, 311.

Азопепсин был подвергнут последовательному гидролизу химотрипсином и пепсином. Гидролизат фракционировали гель-фильтрацией через колодку с биогеом Р-4 (рис. 5), аналогично описанному для выделения пептидов нитротирозина из гидролизата нитрокарбокисептидазы [21]. Как следует из рис. 5, максимально окрашенными были два пика, слабо поглощающие при 280 нм и выходящие из колонки в районе низкомолекулярных соединений (СРI и СРII). Каждую из этих двух фракций подвергли хроматографии на DEAE-сефадексе А-25 (как описано в работе [21]) (рис. 6) и обессоливали гель-фильтрацией через сефадекс G-10. Фракция СРII задерживалась на колонке с DEAE-сефадексом А-25 значительно слабее, чем фракция СРI, и, кроме того, выходила из колонки с сефадексом G-10 с солями. После колонки с сефадексом G-10 во фракции СРI содержание азотирозина (определенное по светопоглощению) было в 3 раза выше, чем во фракции СРII.

Судя по аминокислотному составу СРI (табл. 3), пептид содержит остатки азотирозина и глицина. В пепсине имеется три таких дипептида:

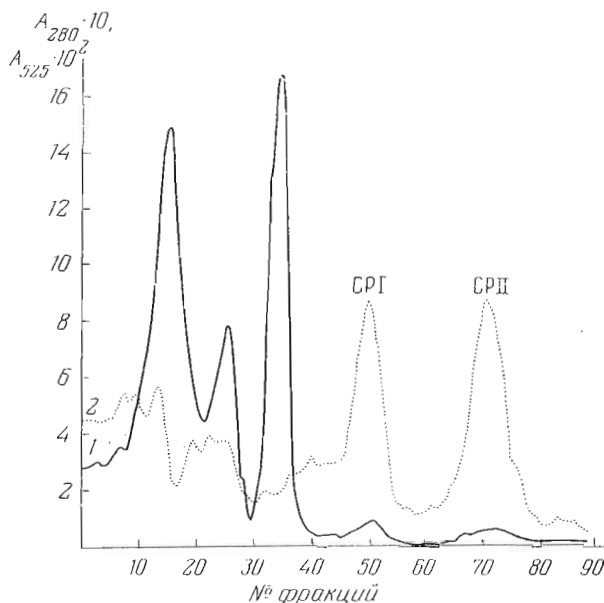


Рис. 5. Разделение продуктов химотрипсинового и пепсинового гидролиза азопепсина на биогеле Р-4. 1 —  $A_{260}$ , 2 —  $A_{525}$

Tyr<sup>75</sup> — Gly<sup>76</sup>, Gly<sup>85</sup> — Tyr<sup>86</sup> и Gly<sup>188</sup> — Tyr<sup>189</sup>. Поскольку окрашивается преимущественно С-концевой фрагмент пепсина, т. е. последовательность 180—327, СРІ представляет собой скорее всего дипептид Gly<sup>188</sup> — Tyr<sup>189</sup>.

Определение N-концевой аминокислоты данселированием показало наличие во фракции СРІ двух данселируемых аминокислот: главное пятно на хроматограмме Dns-Gly и в следах Dns-Ser. Необходимо отметить, что свободный Dns-Ser присутствует в данселированной фракции СРІ и до полного кислотного гидролиза. Очистка Dns-пептида ТСХ и последующий гидролиз привели к обнаружению пятна только Dns-Gly.

Что касается фракции СРІІ, то ее аминокислотный состав пришлось определять с помощью данселирования полного кислотного гидролизата фракции, поскольку в ней присутствовали соли, которые не удавалось отделить гель-фильтрацией через сефадекс G-10. Данселирование в данселированном гидролизате обнаружено не было. (Азотирозин разрушается при полном кислотном гидролизе [26].) Тот факт, что фракция была характерно окрашена и окраска изменялась при изменении рН, позволяет предполагать, что СРІІ является свободным азотирозином, образовавшимся в результате ферментативного гидролиза азопепсина. Известно, что пепсиновый гидролиз пепсина (автолиз) может приводить к отщеплению до 40% тирозина в виде свободной аминокислоты [31].

Таким образом, на основании данных, изложенных выше, можно заключить, что сочетание пепсина с *n*-нитрофенилдиазонийхлоридом приводит к преимущественному модифицированию остатка Tyr<sup>189</sup>, по-видимому находящегося в субстратсвязывающем участке активного центра фермента.

Поскольку ранее [9] нами были исследованы свойства пепсина, модифицированного нитрованием остатков тирозина, представляло определенный интерес определить, какие остатки тирозина нитруются тетранитрометаном. В связи с этим вначале мы решили определить, затрагивает ли нитрование и иодирование одни и те же остатки тирозина в пепсине. Для этого пепсин был подвергнут иодированию по методу [2], согласно которому иодируются 9-й и 174-й остатки тирозина. Иодированный пепсин обладал

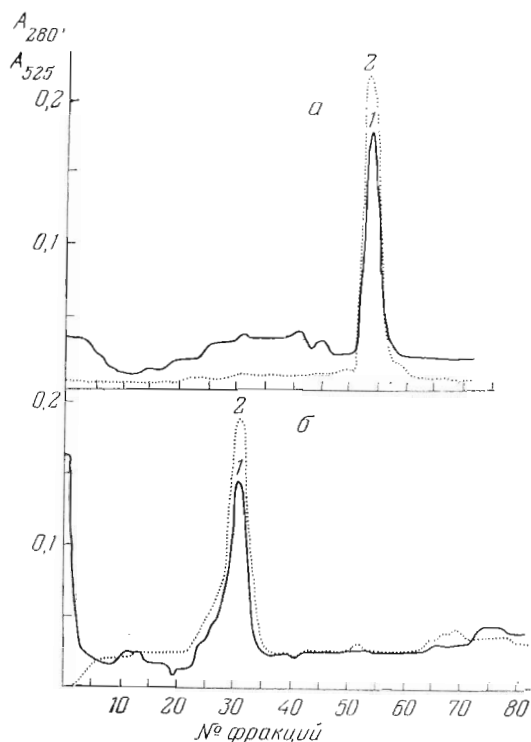


Рис. 6. Хроматография фрагментов СРІ (а) и СРІІ (б) на DEAE-сефадексе А-25. 1 —  $A_{280}$ , 2 —  $A_{525}$

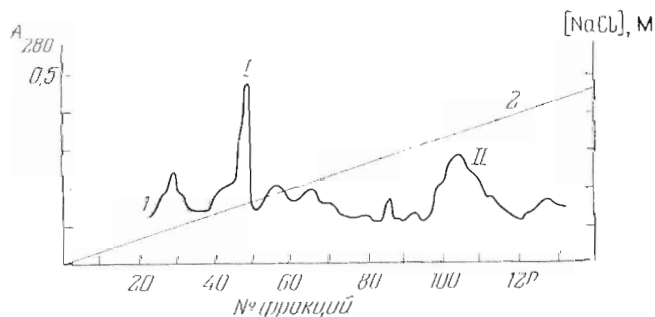


Рис. 7. Разделение на DEAE-целлюлозе DE-32 фрагментов I и II (остатки 1—179 и 180—327 соответственно) автолитического расщепления пепсиногена. Скорость элюции 24 мл/ч, объем фракций 4 мл. 1 —  $A_{280}$ , 2 —  $[NaCl]$

23,1% остаточной активности, что согласуется с данными работы [2]. Спектрофотометрическое определение числа остатков нитротирозина в молекуле нитропепсина показало, что в иодпепсине нитруется 1,7 остатка тирозина, т. е. на 2,3 остатка меньше, чем в немодифицированном пепсине. Этот результат свидетельствует, что при нитровании пепсина модифицируются наряду с другими те же остатки тирозина, которые иодируются:  $Tyr^9$  и  $Tyr^{174}$ .

Был также получен препарат нитропепсина, содержащий 3,8 остатка нитротирозина и обладающий 44% активности (от исходной) по расщеплению гемоглобина. Нитропепсин был подвергнут автолитическому расщеплению на два фрагмента с последующим хроматографическим их разделением (рис. 7). Фрагмент II был очищен гель-фильтрацией через колонку с сефадексом G-75 [29]. Его аминокислотный состав представлен в табл. 2. Следовательно, кроме остатков  $Tyr^9$  и  $Tyr^{174}$  N-концевого фрагмента мо-

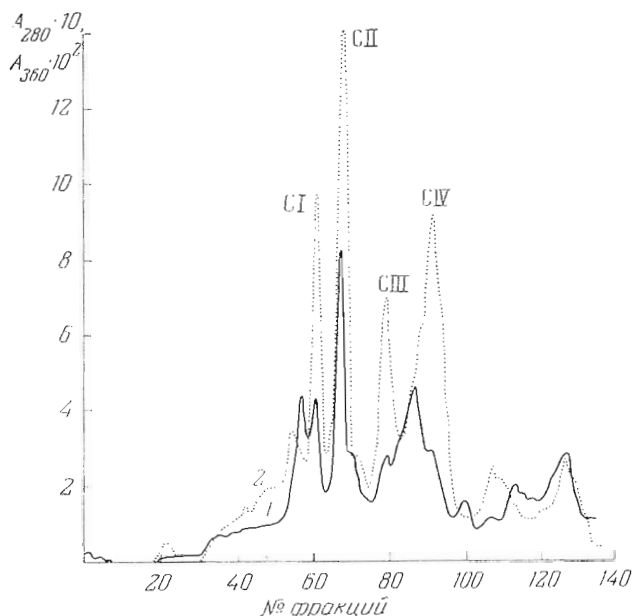


Рис. 8. Разделение на сефадексе G-25 продуктов химотрипсинного гидролиза нитропепсина. 1 —  $A_{280}$ , 2 —  $A_{360}$

дифицируется какой-то тирозиновый остаток С-концевого фрагмента — последовательности 180—327 (см. табл. 2). Химотрипсиновый гидролизат нитропепсина был фракционирован на колонке с сефадексом G-25 аналогично выделению подтирозиновых пептидов [2] (рис. 8). Фракции были очищены хроматографией на бумаге в системе пиридин — бутанол — уксусная кислота — вода (10 : 15 : 3 : 12, по объему). Аминокислотный состав фрагмента CIII близок к пептидной последовательности 176—190, а фрагмента CIV — к 167—175, что подтверждает данные о модифицировании  $\text{Tyr}^{174}$  (способного иодироваться) и  $\text{Tyr}^{189}$  (вступающего в реакцию азосочетания). Таким образом, остатком тирозина С-концевого фрагмента 180—327, способным нитроваться, является тот же 189-й остаток. Отмеченные ранее особенности каталитического поведения нитропепсина [9], вероятно, обусловлены нитрованием  $\text{Tyr}^{189}$ . Лучшая защита от нитрования с помощью  $\text{PheOEt}$  по сравнению с  $\text{AcPhe}$  [9] позволяет предположить, что этот остаток тирозина ответствен за связывание аминокислоты, образующей в субстрате расщепляемую пептидную связь своей аминогруппой (связывающейся по участку II связывания субстрата-дипептида [9]).

В пространственной структуре пенициллопепсина, приведенной в работе Хсу и др. [32], остаток  $\text{Phe}$ , соответствующий  $\text{Tyr}^{189}$  молекулы пепсина [33], находится недалеко от  $\text{Asp}^{32}$  и  $\text{Asp}^{215}$  — каталитического центра фермента. О важной роли  $\text{Tyr}^{189}$  в реакциях гидролиза можно судить, сопоставляя данные о катализе этих реакций пенициллопепсином [34], ацетилпепсином [35] и пепсином. Пенициллопепсин (замена  $\text{Tyr}^{189}$  на  $\text{Phe}$ ) катализирует реакции транспептидации по типу аминпереноса хуже, чем пепсин [34]. То же можно сказать об ацетилпепсине [35], содержащем 5 из 16 остатков  $\text{Tyr}$  в пепсине в виде О-ацетильных производных. Правда, в последнем случае Ричман и Фрутон [35] объясняют снижение эффективности транспептидации ускорением гидролиза продуктов транспептидации. Замена  $\text{Tyr}$  на  $\text{AcOTyr}$  приводит к ускорению гидролиза низкомолекулярного субстрата [4, 6, 35], а замена  $\text{Tyr}$  на  $\text{Phe}$  — к изменению специфичности в отношении 2-го участка связывания, поскольку в случае пепсина (по сравнению с пенициллопепсином) резко выражено требование присутствия в этом месте субстрата ароматической аминокислоты [34].



## Экспериментальная часть

*Пепсин* свиный Олайнского завода химреактивов дополнительно очищали хроматографией на DEAE-сефадексе А-50 [36] или на SE-сефадексе G-25 [37];  $\alpha$ -химотрипсин — препарат Олайнского завода химреактивов.

*Иодирование пепсина* [2]. К 100 мг пепсина в 100 мл 0,1 М фосфатного буфера (рН 6,0) добавляли 3,13 мл раствора  $KI_3$  (0,5 г  $KI$  в 10 мл  $H_2O$  + + 30 мг  $I_2$ ) и выдерживали 30 мин при 37°. Затем добавляли ~1 мл раствора  $Na_2S_2O_3$  (23 мг  $Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$  в 10 мл  $H_2O$ ) до полного обесцвечивания раствора, обессоливали на колонке с сефадексом G-25 и лиофильно высушивали.

*Нитропепсин* получали, как описано в работе [9].

*Нитрование иодированного пепсина* проводили аналогично. К 50 мг иодированного пепсина в 45 мл 0,2 М ацетатного буфера (рН 5,6) добавляли раствор тетранитрометана в спирте (1,25 мл тетранитрометана и 3,75 мл спирта). Смесь оставляли на 17 ч при перемешивании, затем обессоливали на колонке с сефадексом G-25 и лиофильно высушивали.

*Автолитическое расщепление нитропепсина и азопепсина* [29]. 50 мг белка растворяли в 50 мл 0,1 М ацетатного буфера (рН 5,1), доводили рН до 6,45 с помощью 5 н.  $NaOH$ , добавляли 1,7 мг пепсина в 1,7 мл воды, смесь инкубировали 15 мин при 33°, доводили рН до 5,1 с помощью 50%  $CH_3COOH$  и наносили на колонку с DEAE-целлюлозой DE-32 (1,5 × × 15 см). Элюировали линейным градиентом  $NaCl$  в 0,1 М ацетатном буфере (рН 5,1) со скоростью 15 или 24 мл/ч.

*Гидролиз нитропепсина  $\alpha$ -химотрипсином*. К 60 мг нитропепсина в 15 мл 1% бикарбоната аммония (рН 7,9) добавляли 5 мг химотрипсина и инкубировали при 37° в течение 18 ч, затем добавляли еще 5 мг химотрипсина и инкубацию продолжали 7 ч. Гидролизат лиофильно высушивали, затем растворяли в 2 мл 0,25%  $CH_3COOH$  и фракционировали на колонке с сефадексом G-25 (сверхмелкий) (2,5 × 81 см) в 0,25%  $CH_3COOH$  со скоростью 20 мл/ч, собирая фракции по 5 мл.

*N-Ацетил-n-нитрофенилазотирозин (ацетилазотирозин)*. К 0,005 моль N-Ас-L-Тур в 20 мл 2 н.  $NaOH$  при перемешивании добавляли раствор n-нитрофенилдиазонийхлорида, полученного диазотированием 0,006 моль n-нитроанилина в 10 мл 50%  $HCl$  при 5° раствором 0,008 моль нитрита натрия в 2 мл воды. Выпавший ярко-оранжевый осадок фильтровали, промывали насыщенным раствором  $NaCl$ , холодной водой и высушивали на воздухе. Выход динатриевой соли ацетилазотирозина 83,3%. 0,002 моль полученной динатриевой соли суспендировали в 30 мл воды, доводили рН до 9 с помощью 1 н.  $NaOH$ , нерастворившийся осадок отфильтровывали, а фильтрат подкисляли до рН 2 концентрированной  $HCl$ . Осадок промывали на фильтре холодной водой, высушивали в вакуум-эксикаторе, а затем кристаллизовали из смеси ацетон — этилацетат (7 : 13, по объему). Выход 74%. Т. пл. 223—224°. Лит. данные [15]: т. пл. 220° для Ас-DL-AzoТур.

*Кинетику инактивации пепсина* исследовали, используя раствор пепсина 1 мг/мл в 0,5 М ацетатном буфере (рН 4,1) или в 0,01 н.  $HCl$  (рН 2,0) и 13-кратный молярный избыток диазонийхлорида в присутствии или в отсутствие 0,05 М PheOMe. Через 2, 25 и 75 ч отбирали пробы и определяли активность по гемоглобину [38].

*Препаративное получение азопепсина*. Пепсин в концентрации 1 мг/мл в 0,5 М ацетатном буфере (рН 4,0; 4,5 или 5,0) инкубировали с 130-кратным молярным избытком n-нитрофенилдиазонийхлорида в течение соответственно 3 ч, 30 мин или 7 мин. Процесс останавливали подкислением до рН 3,0, обессоливали азопепсин на колонке с сефадексом G-25 и лиофильно высушивали.

*Ферментативный гидролиз азопепсина*. 120 мг азопепсина растворяли в 12 мл 1%  $NH_4HCO_3$  (рН 8,2), добавляли 12 мг  $\alpha$ -химотрипсина, инкуби-

рвали 40 ч при 37° и лиофильно высушивали. Химотрипсиновый гидролизат растворяли в 12 мл 0,01 н. HCl, добавляли 12 мг пепсина и инкубировали при 37° в течение 24 ч. Гидролизат лиофильно высушивали, затем растворяли в 5 мл 0,5% NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>, для полного растворения добавляли каплю концентрированного NH<sub>4</sub>OH и наносили на колонку (2,5 × 83 см) с биогеом Р-4. Элюировали 0,5% NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> со скоростью 54 мл/ч, собирая фракции по 9 мл.

Хроматографию фрагментов СРI и СРII проводили на колонке (1 × 7 см) с ДЕАЕ-сефадексом А-25, используя градиентную элюцию 0,02 М LiCl в 0,1 М Трис-HCl-буфере, рН 8,3 (200 мл) — 0,5 М LiCl в том же буфере (200 мл) со скоростью 10 мл/ч, объем фракций 4 мл.

Спектры поглощения снимали на спектрофотометре СФ-4А или Сагу-15 (США), спектры КД — на дихрографе III CNRS-Roussel-Jouan (Франция).

Авторы благодарят Н. М. Чехляеву за помощь при выполнении спектральных исследований и обсуждение соответствующей части работы, а также И. Е. Федулову за проведение аминокислотных анализов.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Herriott R. M. (1937) *J. Gen. Physiol.*, **20**, 335—352.
2. Mains G., Burchell R. H., Hofmann T. (1973) *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, **54**, 275—282.
3. Herriott R. M. (1935) *J. Gen. Physiol.*, **19**, 283—299.
4. Локшина Л. А., Орехович В. Н. (1966) *Биохимия*, **31**, 143—150.
5. Perlmann G. E. (1966) *J. Biol. Chem.*, **241**, 153—157.
6. Hollands T. R., Fruton J. S. (1968) *Biochemistry*, **7**, 2045—2053.
7. Tracy A. H., Ross W. F. (1942) *J. Biol. Chem.*, **146**, 63—73.
8. Philpot S. J. L., Small P. A. (1938) *Biochem. J.*, **32**, 542—551.
9. Козлов Л. В., Коган Г. А., Завада Л. Л. (1969) *Биохимия*, **34**, 1257—1265.
10. Глотов Б. О., Козлов Л. В., Завада Л. Л. (1976) *Молекулярн. биология*, **10**, 161—174.
11. Глотов Б. О., Козлов Л. В., Завада Л. Л. (1976) *Молекулярн. биология*, **10**, 530—537.
12. Sokolovsky M., Riordan J. F., Vallee B. L. (1966) *Biochemistry*, **5**, 3582—3589.
13. Gorbunoff M. J. (1968) *Biochemistry*, **7**, 2547—2554.
14. Sokolovsky M., Riordan J. F. (1969) *Israel J. Chem.*, **7**, 575—581.
15. Tsuru D., Fujiwara K., Watanabe R., Yoshimoto T., Hayachida S., Tomimatsu M., Okoshi Y. (1974) *J. Biochem.*, **75**, 261—268.
16. Vallee B. L., Riordan J. F., Coleman J. E. (1963) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **49**, 109—116.
17. Riordan J. F., Vallee B. L. (1963) *Biochemistry*, **2**, 1460—1468.
18. Simpson R. T., Riordan J. F., Vallee B. L. (1963) *Biochemistry*, **2**, 616—622.
19. Riordan J. F., Sokolovsky M., Vallee B. L. (1967) *Biochemistry*, **6**, 358—361.
20. Sokolovsky M., Vallee B. L. (1967) *Biochemistry*, **6**, 700—708.
21. Muszynska G., Riordan J. F. (1976) *Biochemistry*, **15**, 46—51.
22. Козлов Л. В., Гиноман Л. М., Орехович В. Н. (1967) *Докл. АН СССР*, **172**, 1207—1209.
23. Inouye K., Fruton J. S. (1968) *Biochemistry*, **7**, 1611—1615.
24. Fairclough G. F., Jr., Vallee B. L. (1970) *Biochemistry*, **9**, 4087—4094.
25. Fairclough G. F., Jr., Vallee B. L. (1971) *Biochemistry*, **10**, 2470—2477.
26. Riordan J. F., Vallee B. L. (1967) *Methods in Enzymology*, **11**, 521—531.
27. Nakatani H., Kitagishi K., Hiromi K. (1976) *Biochim. et biophys. acta*, **452**, 521—524.
28. Гиноман Л. М., Грейль Т. О., Орехович В. Н. (1962) *Реф. секц. сообщ. V Междунар. биохим. конгр., секции 1—13, № 2.40, с. 69, Изд-во АН СССР, М.*
29. Ревина Л. П., Вахитова Э. А., Баратова Л. А., Белянова Л. П., Степанов В. М. (1975) *Биоорган. химия*, **1**, 958—964.
30. Tang J., Sepulveda P., Marciszyn J., Jr., Chen K. C. S., Huang W.-Y., Tao N., Liu D., Lanier J. P. (1973) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **70**, 3437—3439.
31. Ingram V. M. (1951) *Nature*, **167**, 83.
32. Hsu I.-N., Delbaer L. T. J., James M. N. G., Hofmann T. (1976) *Can. J. Biochem.*, **54**, 902—914.
33. Cunningham A., Wang H.-M., Jones S. R., Kurosky A., Rao L., Harris C. I., Rhee S. H., Hofmann T. (1976) *Can. J. Biochem.*, **54**, 902—914.
34. Wang T. T., Hofmann T. (1977) *Can. J. Biochem.*, **55**, 286—294.
35. Richman P. G., Fruton J. S. (1976) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **73**, 3915—3917.

36. Rajagopalan T. G., Moore S., Stein W. H. (1966) *J. Biol. Chem.*, **241**, 4940—4950.  
37. Trujillo R., Schlamowitz M. (1969) *Analyt. Biochem.*, **31**, 149—158.  
38. Козлов Л. В., Гинодман Л. М., Орехович В. Н. (1967) *Биохимия*, **32**, 1011—1019.

Поступила в редакцию  
5.VI.1977

## A TYROSYL RESIDUE IN THE SUBSTRATE BINDING SITE OF PEPSIN ACTIVE CENTRE

ZAVADA L. L., KOZLOV L. V., VOLKOVA L. I.,  
ANTONOV V. K.

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

Modification of one tyrosyl residue in pepsin by *p*-nitrophenyldiazonium hydrochloride abolishes the peptidase and reduces the proteolytic activities of the enzyme. This reaction was shown to effect primarily the Tyr 189 residue. Azopepsin manifested an extrinsic Cotton effect with the extrema at 340 and 460 nm. This effect disappeared upon binding the inhibitor — pepstatin. Methyl phenylalaninate protected tyrosyl residue against modification. It is concluded that the Tyr 189 residue participates in the binding of substrates by pepsin.

---