



УДК 577.156.2+541.651.22

АРСАНИЛАЗОТИРОЗИН-248-КАРБОКСИПЕПТИДАЗА А:
ИЗУЧЕНИЕ ТОПОГРАФИИ АКТИВНОГО ЦЕНТРА ФЕРМЕНТА
МЕТОДОМ КД

Клесов А. А., Вэлли Б. Л.

*Химический факультет Московского государственного университета
им. М. В. Ломоносова;*

*Лаборатория биофизических исследований Гарвардской медицинской школы,
Бостон, Массачусетс, США*

Специфическая реакция диазоарсаниловой кислоты с остатком тирозина-248 активного центра карбоксипептидазы приводит к появлению двух различных хромофорных меток в активном центре, обнаруживаемых с помощью спектров КД. Одна из них отражает асимметрическое окружение остатка азотирозина-248, а другая сигнализирует о наличии внутримолекулярного координационного соединения азотирозина-248 с ионом металла в активном центре карбоксипептидазы. Для изучения взаимного расположения участков связывания эффекторов с активным центром фермента, а также степени их взаимозависимости или перекрываемости был применен метод двухкомпонентного спектрального титрования азофермента и выявлена степень конкуренции (или синергизма) между различными эффекторами при их одновременном взаимодействии с активным центром. Проведено изучение спектров КД Zn^{2+} -, Co^{2+} -, Ni^{2+} - и Mn^{2+} -замещенных производных азокарбоксипептидазы в присутствии ряда субстратов и ингибиторов. На основании данных спектрального титрования и результатов рентгеноструктурного анализа карбоксипептидазы составлена карта участков связывания субстратов, ингибиторов и активаторов с активным центром фермента. Карта иллюстрирует множественный характер взаимодействия эффекторов с ферментом и качественно объясняет причины различий в спектральных откликах, наблюдаемых при взаимодействии эффекторов с азокарбоксипептидазой.

Химическая модификация карбоксипептидазы А диазоарсаниловой кислотой приводит к специфическому диазотированию единственного аминокислотного остатка в молекуле фермента — тирозина-248 активного центра [1—4]. Получаемая таким образом арсанилазотирозин-248-карбоксипептидаза А* в значительной степени сохраняет ферментативную активность по отношению к пептидным и сложноэфирным субстратам [4, 5] и, что особенно важно, содержит хромофорную метку, чувствительную к локальным изменениям в области активного центра фермента [3, 4, 6]. Спектры КД азокарбоксипептидазы характеризуются экстремумами при 340 нм ($[\Theta]^{23} = -28\ 000$) и 420 нм ($[\Theta]^{23} = +22\ 000$), типичными для подобных спектров протонированных азофенольных хромофоров других белков [7, 8], отражающих асимметрическую ориентацию азофенольных групп в молекуле белка. Однако уникальной особенностью спектров

* Для краткости изложения арсанилазотирозин-248-карбоксипептидаза А в дальнейшем будет именоваться азокарбоксипептидазой или азоферментом. Везде, где не указан вид металла в активном центре фермента, имеется в виду Zn^{2+} -карбоксипептидаза А (КФ 3.4.12.2).

азокарбокисептидазы А является наличие интенсивной полосы при 510 нм как в спектрах оптического поглощения ($\epsilon = 8000$), так и в спектрах КД ($[\Theta]^{23} = -41\ 000$), отражающей специфическое комплексообразование между остатком азотирозина-248 и атомом цинка активного центра фермента в растворе [4, 6]. Образующееся при этом оптически активное внутримолекулярное координационное соединение в высшей степени спектрально чувствительно к изменению физического состояния фермента (кристаллизации или растворению), изменению рН среды, добавлению субстратов, ингибиторов или денатурирующих агентов, удалению иона металла. Во всех этих случаях происходит или исчезновение полосы при 510 нм (максимума оптической плотности или минимума КД), или изменение ее интенсивности [4].

Таким образом, специфическое сочетание диазоарсаниловой кислоты с остатком тирозина-248 карбокисептидазы А фактически приводит к появлению двух различных хромоформных меток, или «зондов», в активном центре фермента. Одна из них отражает спектральные пертурбации окружения остатка азотирозина-248, а другая сигнализирует об изменениях в спектральных свойствах хелата азотирозин-248—Zn (отражая фактически изменения в относительных концентрациях хелата и некоординированного азотирозинного атома цинка, так как спектральный отклик при 510 нм происходит по принципу «все или ничего»). Каждая хромоформная метка может отражать влияние как одинаковых, так и различных факторов, влияющих на локальную конформацию активного центра, тем самым в значительной степени расширяя возможности спектральных методов исследования топографии активного центра карбокисептидазы при взаимодействии фермента с субстратами и ингибиторами (эффекторами).

В предыдущей работе [6] нами было проведено спектральное изучение характера взаимодействия ряда ингибиторов конкурентного, неконкурентного и смешанного типа (как следует из данных стационарной кинетики), а также субстратов и модификаторов с активным центром азотирозин-карбокисептидазы А методом КД. В случае конкурентных ингибиторов (*L*-бензилсукцинат, *L*-фениллактат и *L*-фенилаланин), субстратов (глицил-*L*-тирозин и карбобензоксиглицил-глицин) и модификаторов (ингибиторы эстеразной и активаторы пептидазной активности, циклогексанол и карбобензоксиглицин) было показано, что связывание каждого из этих соединений с азоферментом приводит к разрушению внутримолекулярного координационного соединения азофермента остатка тирозина-248 с атомом цинка активного центра и соответственно к исчезновению полос оптического поглощения и КД при 510 нм [6]. Во всех случаях разрушение хелата азотирозин—Zn происходило в результате связывания одной молекулы ингибитора, субстрата или модификатора с активным центром, как было показано спектральным титрованием азофермента в присутствии добавленных соединений [6]. Отличительной особенностью спектральных откликов являлось то, что спектры оптического поглощения азокарбокисептидазы в присутствии всех добавленных эффекторов были качественно одинаковыми, в то время как общий вид спектров КД азофермента в присутствии перечисленных выше соединений различался практически в каждом отдельном случае (что выражалось в различиях по знаку изменения экстремумов КД при 340 и 420 нм, различных положениях изобестических точек спектров и различных по характеру спектральных сдвигах в присутствии добавленных соединений). В случае смешанных ингибиторов (β -фенилпропионат и фенилацетат) с активным центром азофермента связывались две молекулы ингибитора, приводя в свою очередь к новым специфическим изменениям характера спектров КД. Несомненно, различный вид спектров, характерных для связывания различных эффекторов с азоферментом, свидетельствует о сложной топографии активного центра карбокисептидазы А и о наличии нескольких различных участков связывания субстратов, ингибиторов и модификаторов

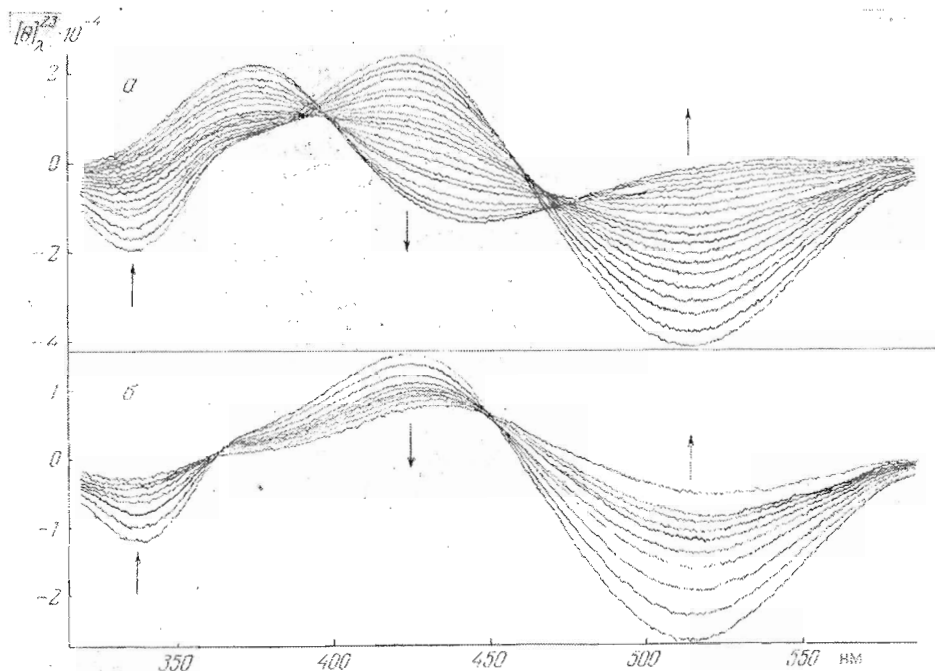


Рис. 1. Влияние β -фенилпропионата (а) и β -фенилпропионата в присутствии 184 мМ Z-Gly-Gly (б) на спектр КД азокарбоксипептидазы. Изменение концентрации β -фенилпропионата: 0—60 (а), 0—3,6 мМ (б). Стрелки указывают направления изменений интенсивности соответствующих спектральных полос при добавлении эффектора

в непосредственной близости от комплекса арсанилазотирозин-248·Zn, взаимодействие добавленных соединений с которыми изменяет ориентацию или расстояние между остатками азофенола и атомом цинка активного центра.

Естественно, изучение влияния отдельных соединений на спектры азофермента позволяет получать лишь информацию об эффективности взаимодействия (например, рассчитывая значения констант диссоциации комплекса эффектор — фермент) и делать качественные выводы о характере взаимодействия (на основании общей спектральной картины). Для изучения топографии активного центра, т. е. взаимного расположения участков связывания эффекторов (а также степени их взаимозависимости, или перекрываемости), необходимым представляется проведение двухкомпонентного спектрального титрования фермента и выяснение степени конкуренции между различными эффекторами при их одновременном взаимодействии с активным центром. Данная проблема и является предметом исследования в настоящей работе. Помимо этого для выяснения роли металла активного центра в формировании участков связывания эффекторов с ферментом нами было проведено изучение спектров КД Zn^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} и Mn^{2+} -азокарбоксипептидазы в присутствии ряда субстратов и ингибиторов.

Влияние β -фенилпропионата и карбобензоксиглицил-глицина на спектры КД арсанилазотирозин-248-карбоксипептидазы А. На рис. 1а видно, что при увеличении концентрации ингибитора от 0,7 до 60 мМ интенсивность отрицательных полос при 510 и 340 нм и положительной полосы при 420 нм уменьшается. Помимо этого точки пересечения спектральных линий (размытая «изобестическая область») постепенно смещаются от 455 до 480 и от 380 до 405 нм. Наконец, вместо положительной полосы при 420 нм появляется новая положительная полоса при 380 нм и отрицательная при 450 нм. Эти спектральные изменения сигнализируют по меньшей мере о

Константы диссоциации ($K_{\text{дис}}$) комплексов Zn^{2+} -арсанилазотирозин-248-карбоксипептидазы А с субстратами и ингибиторами *

| Эффектор ** | $K_{\text{дис}}$, мМ (длина волны, нм) | α *** |
|--|--|----------------|
| β -Фенилпропионат | 4,3±0,2 (550) 11,5±0,8 (445) | — — |
| β -Фенилпропионат + Z-Gly-Gly (92) | 4,3±0,4 (330) 1,5±0,1 (550) | — 0,09±0,01 |
| β -Фенилпропионат + Z-Gly-Gly (184) | 12±1 (445) 0,9±0,1 (550) | 1 0,08±0,01 |
| Z-Gly-Gly | 400±50 (510) 100±20 (510) | — 0,09±0,01 |
| Z-Gly-Gly + β -фенилпропионат (1,8) | 1,0±0,1 (510) | — |
| Gly-L-Тур | 1,0±0,1 (420) | — |
| Gly-L-Тур+Z-Gly-Gly (92) | 1,1±0,1 (510) | 2±1 |
| Gly-L-Тур+ β -фенилпропионат (1) | 1,0±0,1 (510) | 1 |
| Gly-L-Тур+ β -фенилпропионат (3) | 1,0±0,1 (420) | 1 |
| Gly-L-Тур+ β -фенилпропионат (5) | 1,0±0,1 (510) | 1 |
| L-Фенилаланин | 1,0±0,1 (420) | 1 |
| L-Фенилаланин + Z-Gly-Gly (92) | 2,6±0,2 (510) | — |
| L-Фенилаланин + Gly-L-Тур (1,27) | 3,3±0,2 (510) | >10 |
| β -Фенилпропионат + L-Фенилаланин (2,31) | 5,2±0,2 (510) | 10±3 |
| L-Фенилаланин + β -фенилпропионат (3) | 4,5±0,2 (550) | 1 |
| β -Фенилпропионат + Gly-L-Тур | 12±1 (420) | 1 |
| | 2,9±0,2 (510) | 1 |
| | Аномалии в спектрах | |

* Определены с помощью спектрального титрования азофермента методом КД (рН 8,2; 23°).

** В скобках приведена постоянная концентрация второго эффектора (мМ) при спектральном титровании фермента первым эффектором.

*** Коэффициент (схема 1), характеризующий степень взаимозависимости между участками связывания соответствующих двух эффекторов с активным центром фермента ($\alpha=1$, взаимозависимость; $\alpha>1$, конкуренция; $\alpha<1$, синергизм).

двух центрах связывания β -фенилпропионата с азоферментом [6] с соответствующими константами диссоциации 4,3 и 11,5 мМ (рассчитанными при рН 8,2 из концентрационной зависимости спектров КД при 550 и 445 нм соответственно, см. табл. 1).

Влияние Z-Gly-Gly, как и Z-Gly (см. [6]), на спектры КД азофермента гораздо проще и заключается в симметричном уменьшении интенсивности всех трех полос — при 510, 420 и 340 нм — с изобестическими точками при 455 и 370 нм. Значения констант диссоциации комплексов Z-Gly-Gly и Z-Gly с азоферментом, рассчитанные из спектральных измерений, равны 400 и 200 мМ соответственно. В первом случае эта величина близка к величине константы Михаэлиса в реакции гидролиза Z-Gly-Gly, катализируемой нативной карбоксипептидазой А (K_m 500 мМ [9]).

Характер спектров КД азокарбоксипептидазы принципиально изменяется, когда спектральное титрование β -фенилпропионатом проводится в присутствии второго компонента, Z-Gly-Gly (рис. 1б). При этом наблюдается: а) более ярко выраженное уменьшение интенсивности полосы при 510 нм, чем можно было предсказать на основании данных по раздельному влиянию β -фенилпропионата и Z-Gly-Gly; б) образование четкой изобестической точки положительной эллиптичности при 450 нм вместо размытой области (455—480 нм) отрицательной эллиптичности, наблюдаемой при добавлении одного β -фенилпропионата; в) образование изобестической точки при 360 нм вместо размытой области (380—405 нм) пересечения спектральных кривых; г) не происходит инверсии положительной полосы при 420 нм при высоких концентрациях β -фенилпропионата.

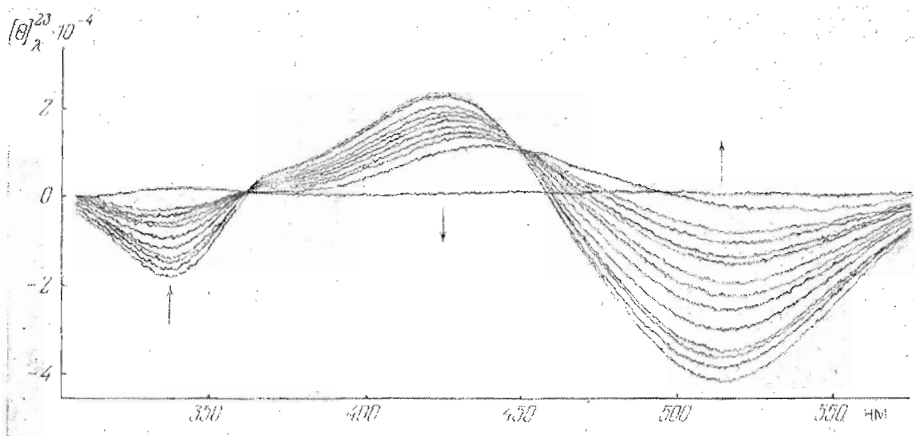


Рис. 2. Влияние Gly-*L*-Тур (0—4 мМ) на спектр КД азокарбоксипептидазы. Обозначения — в подписи к рис. 1

Поразительно, что в этом случае двухкомпонентного связывания спектральная картина совершенно отличается от влияния каждого соединения (β -фенилпропионата и Z-Gly-Gly) в отдельности, но качественно идентична влиянию «псевдосубстрата», Gly-*L*-Тур (рис. 2). Таким образом, все эти три соединения должны занимать свои отдельные участки связывания в активном центре азофермента, несмотря на то что два из них формально являются пептидными субстратами карбоксипептидазы. Видимо, различия в способах связывания Gly-*L*-Тур и Z-Gly-Gly вызваны тем, что первый из них имеет свободную α -аминогруппу, а у второго субстрата она защищена. В литературе неоднократно высказывалось мнение (см. [4, 10—13]), что субстраты карбоксипептидазы, α -аминогруппа которых свободна и которые, как правило, проявляют исключительно малую реакционную способность, образуют непродуктивный фермент-субстратный комплекс (например, с «неправильной» ориентацией потенциально расщепляемой пептидной связи по отношению к каталитически активным функциональным группам карбоксипептидазы). Здесь необходимо отметить, что основные выводы о механизме ферментативного действия карбоксипептидазы А, полученные в результате рентгеноструктурного анализа фермента, базируются на стереохимии комплекса карбоксипептидазы с Gly-*L*-Тур, который, по-видимому, непродуктивен [11, 12] (и во всяком случае отличается от способа связывания «истинного» пептидного субстрата * Z-Gly-Gly, как следует из данных спектрального титрования азокарбоксипептидазы в присутствии этих двух субстратов, см. ниже).

На основании полученных данных можно зафиксировать как минимум четыре центра связывания в активном центре азокарбоксипептидазы, взаимодействие эффикторов с которыми вызывает разрушение внутримолекулярного комплекса азотирозин — Zn или изменяет асимметрическое окружение азофенольной группы модифицированного остатка тирозина-248. Первый из них соответствует участку связывания пептидных субстратов (в данном случае Z-Gly-Gly) с активным центром карбоксипептидазы («пептидазный» центр), второй — «непродуктивный» центр связывания (участок связывания Gly-*L*-Тур) и два участка связывания β -фенилпропионата. Поскольку β -фенилпропионат является классическим кон-

* То, что способ связывания Z-Gly-Gly с карбоксипептидазой «продуктивен» и аналогичен способу связывания N-ацилированных пептидных субстратов, производных ароматических аминокислот, следует из линейных корреляций между гидрофобностью боковой цепи субстрата и значениями констант Михаэлиса ферментативных реакций [9].

курентным ингибитором пептидазной активности карбоксипептидазы и неконкурентным ингибитором эстеразной активности (см. [13] и ссылки там же), один из центров связывания β -фенилпропионата с азоферментом должен соответствовать «эстеразному» участку активного центра.

Для того чтобы выявить степень взаимозависимости между «эстеразным» и «пептидазным» участками активного центра карбоксипептидазы, было проведено количественное титрование азофермента β -фенилпропионатом в присутствии Z-Gly-Gly в постоянной концентрации (184 мМ) (рис. 1 б), а также титрование с помощью Z-Gly-Gly в присутствии β -фенилпропионата в постоянной концентрации (1,8 мМ). При этом был обнаружен синергизм в связывании двух данных эффекторов (табл. 1). Другими словами, в присутствии Z-Gly-Gly связывание β -фенилпропионата, проявляемое в подавлении интенсивности полосы КД при 510 нм, происходило гораздо эффективнее, чем под действием одного β -фенилпропионата, и наоборот (схема 1, $\alpha < 1$):



Данная схема относится к двухкомпонентному связыванию ингибиторов (I и I') с ферментом, где соответствующие константы диссоциации комплексов равны K_i и K_i' и коэффициент α характеризует степень взаимозависимости связывания ингибиторов с активным центром ($\alpha = 1$, взаимозависимость; $\alpha > 1$, конкуренция; $\alpha < 1$, синергизм).

Величина α определена с использованием выражения

$$K_{\text{дис}}^{(I+I')} = K_{\text{дис}}^{(I)} \frac{1 + [I']/K_i'}{1 + [I']/\alpha K_i'}$$

полученного при анализе схемы (1). Здесь $K_{\text{дис}}^{(I+I')}$ — эффективная константа диссоциации комплекса фермента с эффектором I, полученная в присутствии постоянной концентрации второго эффектора [I']. Расчет показал (табл. 1), что центры связывания β -фенилпропионата и Z-Gly-Gly с азоферментом, взаимодействие с которыми приводит к разрушению комплекса азотирозин-248—Zn (и к исчезновению полосы КД при 510 нм), кооперативны ($\alpha = 0,09$). Иначе говоря, взаимодействие β -фенилпропионата с комплексом азофермент—(Z-Gly-Gly) происходит приблизительно на порядок эффективнее, чем взаимодействие со свободной азокарбоксипептидазой, и наоборот. По-видимому, этот эффект отражает кооперативность между «эстеразным» и «пептидазным» участками в активном центре карбоксипептидазы. С другой стороны, связывание Z-Gly-Gly практически не влияет на присоединение второй молекулы β -фенилпропионата, обнаруживаемое по влиянию его на спектры КД азофермента при 445 нм (табл. 1, см. также [6]). Таким образом, участок связывания второй молекулы β -фенилпропионата не является «пептидазным», а также не перекрывается и не взаимодействует с ним (в данном случае с участком связывания Z-Gly-Gly). Для дальнейшего выяснения природы участка взаимодействия β -фенилпропионата было проведено двухкомпонентное связывание его как с Gly-L-Tyr, так и с L-фенилаланином (см. ниже).

Двухкомпонентное связывание Gly-L-Tyr и Z-Gly-Gly. На рис. 2 видно, что при увеличении концентрации псевдосубстрата Gly-L-Tyr от 0,09 до 4 мМ интенсивности отрицательных полос при 510 и 340 нм и положительной полосы при 420 нм уменьшаются, причем последняя полоса постепенно смещается в сторону более длинных волн с образованием изобестической точки при 450 нм. Помимо этого наблюдается образование второй изобестической точки при 360 нм. Спектральное титрование при 510 и 420 нм свидетельствует о наличии в активном центре азофермента

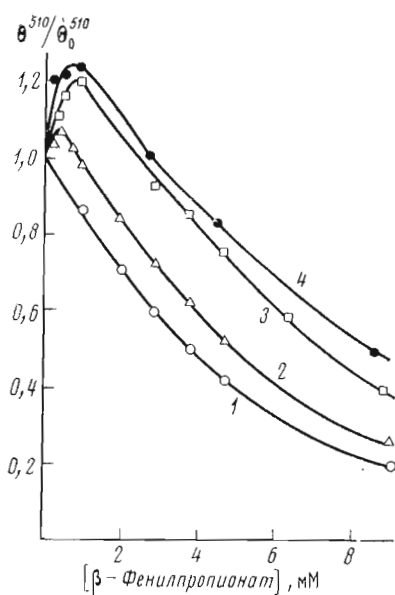


Рис. 3. Влияние β -фенилпропионата на относительную интенсивность полосы КД азонарбоксипептидазы при 510 нм в присутствии Gly-L-Tyr в концентрации 0 (1) 0,22 (2), 0,87 (3), 2,2 мМ (4)

ного титрования азофермента под действием Gly-L-Tyr, так что положения экстремумов КД и изобестических точек остаются неизменными. В принципе это могло бы означать либо полную перекрываемость участков связывания эфферторов, либо их полную независимость (во всяком случае тех участков, связывание с которыми разрушает комплекс азотирозин-248—Zn или влияет на спектры свободного азофенола). Действительно, как следует из количественных спектральных данных (табл. 1), β -фенилпропионат совершенно не влияет на связывание Gly-L-Tyr с активным центром азофермента.

Так как в данном случае изучается равновесное образование комплексов фермент—эффектор, можно было бы ожидать, что и Gly-L-Tyr не будет оказывать влияния на спектральное титрование азофермента под действием β -фенилпропионата. Однако было найдено, что Gly-L-Tyr влияет на спектральный отклик β -фенилпропионата, и притом необычным образом. При первоначальном добавлении аликвоты Gly-L-Tyr к раствору азонарбоксипептидазы происходит параллельное уменьшение интенсивности всех трех полос КД при 510, 420 и 340 нм, в полном соответствии с величинами констант диссоциации комплекса (табл. 1). Однако последующее добавление β -фенилпропионата приводит к увеличению интенсивности всех трех полос. При дальнейшем возрастании концентрации β -фенилпропионата величины эллиптичности проходят через максимум и затем уменьшаются (рис. 3). Это необычайное явление наблюдается только для спектрального титрования азофермента β -фенилпропионатом в присутствии Gly-L-Tyr и может свидетельствовать об увеличении концентрации внутримолекулярного координационного соединения азотирозин—Zn в данных условиях.

Таким образом, добавление эфферторов к карбоксипептидазе может не только нарушать взаимодействие между остатком тирозина-248 и атомом цинка активного центра, но и в определенных случаях приводит к образованию данной координационной связи. Значение этого принципиального факта для ферментативного катализа остается неясным и может быть

одного участка связывания Gly-L-Tyr с константой диссоциации 1,0 мМ (табл. 1). Эти результаты качественно совпадают с данными рентгеноструктурного анализа кристаллической карбоксипептидазы [11].

Чтобы выяснить отношение между «пептидазным» (для Z-Gly-Gly) и «непродуктивным» (для Gly-L-Tyr) участками активного центра, было изучено двухкомпонентное связывание этих соединений. Данные табл. 1 указывают на то, что участки связывания Gly-L-Tyr и Z-Gly-Gly либо независимы, либо незначительно перекрываются (коэффициент α близок к 1, схема 1). Таким образом, участки связывания Gly-L-Tyr и β -фенилпропионата действительно различны (см. выше), так как Z-Gly-Gly практически не влияет на связывание первого соединения и проявляет синергизм по отношению ко второму.

Двухкомпонентное связывание β -фенилпропионата и Gly-L-Tyr. Присутствие в системе β -фенилпропионата в фиксированной концентрации практически не влияет на характер спектрального

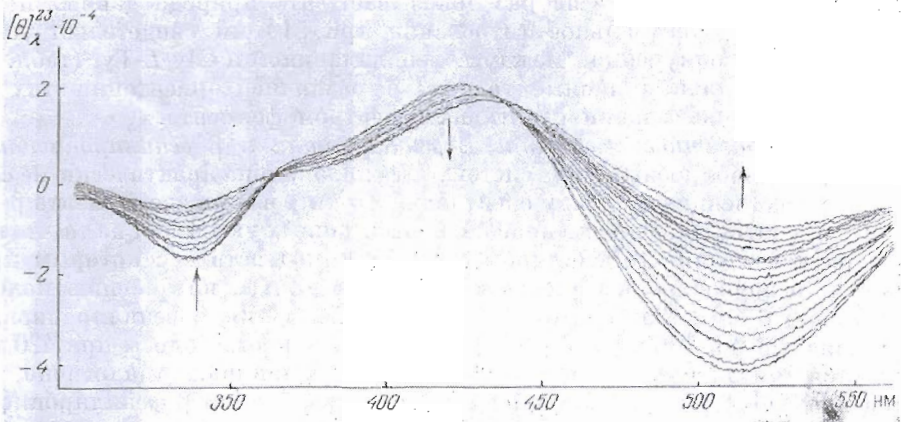


Рис. 4. Влияние *L*-фенилаланина (0—7 мМ) на спектр КД азокарбоксипептидазы. Обозначения — в подписи к рис. 1

выявлено лишь после проведения соответствующих экспериментов по влиянию β -фенилпропионата на кинетику ферментативного гидролиза Gly-*L*-Tyr.

Двухкомпонентное связывание *L*-фенилаланина и Z-Gly-Gly. Влияние *L*-фенилаланина на спектры КД азофермента (рис. 4) сходно с влиянием Gly-*L*-Tyr, за исключением некоторых деталей: а) изобестическая точка в положительной области спектра сдвинута с 450 до 438 нм и находится существенно ближе к максимуму спектральной полосы при 420 нм; б) спектральные изменения полосы при 420 нм при добавлении *L*-фенилаланина к азоферменту менее выражены, чем при добавлении Gly-*L*-Tyr. По-видимому, способы связывания этих двух эфферкторов лишь незначительно отличаются друг от друга. Константа диссоциации комплекса азофермент—*L*-фенилаланин, рассчитанная из данных спектрального титрования при 510 нм, равна 2,6 мМ (табл. 1).

Присутствие в системе Z-Gly-Gly в постоянной концентрации почти не влияет на характер спектральных изменений азокарбоксипептидазы под действием *L*-фенилаланина (за исключением некоторого смещения изобестической точки от 440 до 435 нм). Более того, количественная обработка данных по двухкомпонентному связыванию указывает на полную конкуренцию этих двух эфферкторов (табл. 1). Таким образом, *L*-фенилаланин связывается (или в значительной степени перекрывается) с «пептидным» участком активного центра фермента. Возможно, некоторые изменения в характере связывания *L*-фенилаланина по сравнению с Z-Gly-Gly обусловлены наличием положительно заряженной группы (при pH 8,2) в молекуле первого соединения.

Двухкомпонентное связывание *L*-фенилаланина и Gly-*L*-Tyr. Так как Z-Gly-Gly практически не конкурирует с Gly-*L*-Tyr в связывании с азоферментом (что, по-видимому, говорит о пространственном разделении «пептидазного» и «непродуктивного» участков связывания), но полностью конкурирует с *L*-фенилаланином, представляет интерес выяснить отношение между центрами связывания Gly-*L*-Tyr и *L*-фенилаланина.

Добавление Gly-*L*-Tyr к раствору азофермента и последующее спектральное титрование *L*-фенилаланином кардинально изменяет спектральную картину. Главным отличием спектров КД при двухкомпонентном титровании от спектров в присутствии отдельных компонентов (Gly-*L*-Tyr или *L*-фенилаланина) является отсутствие изобестической точки между экстремумами при 510 и 420 нм. Более того, последующее добавление *L*-фенилаланина к комплексу азофермента и Gly-*L*-Tyr приводит к уменьшению интенсивности полосы при 510 нм, но к возрастанию интенсивности

при 420 нм. Этот факт еще раз доказывает, что природа данных полос различна [6]. Спектральное титрование при 510 нм свидетельствует о значительной конкуренции между *L*-фенилаланином и Gly-*L*-Тур (табл. 1), однако спектральные данные говорят о различной ориентации этих эф-фекторов при связывании с активным центром фермента.

Двухкомпонентное связывание L-фенилаланина и β-фенилпропионата. Предварительное добавление в систему *L*-фенилаланина практически не влияет на качественную картину спектрального титрования азофермента β-фенилпропионатом. Количественная обработка данных указывает на то, что как участок связывания β-фенилпропионата, взаимодействие с которым приводит к разрушению комплекса тирозин-248—Zn (и подавлению полосы КД при 510 нм), так и второй участок связывания β-фенилпропионата (выявляемый по влиянию эффектора на интенсивность полосы при 420 нм) остаются интактными в присутствии *L*-фенилаланина. Аналогично, титрование азофермента *L*-фенилаланином в присутствии β-фенилпропионата свидетельствует о полной независимости двух ингибиторов при связывании с активным центром азокарбоксипептидазы (табл. 1). В этом случае предварительное добавление в систему β-фенилпропионата приводит лишь к некоторому смещению изобестической точки (от 440 до 430 нм) спектральных кривых титрования азофермента под действием *L*-фенилаланина.

Если бы центры связывания *L*-фенилаланина и β-фенилпропионата, обнаруживаемые по влиянию на полосу КД при 510 нм, полностью перекрывались, то можно было бы ожидать, что Z-Gly-Gly будет проявлять синергистические действие по отношению к *L*-фенилаланину (как это наблюдалось по отношению к β-фенилпропионату, см. выше). Однако Z-Gly-Gly полностью конкурирует с *L*-фенилаланином в связывании (табл. 1). Таким образом, участки связывания β-фенилпропионата и *L*-фенилаланина действительно не являются перекрывающимися.

Для определения роли металла активного центра карбоксипептидазы в связывании эффекторов было проведено спектральное титрование также Co^{2+} , Ni^{2+} и Mn^{2+} -арсанилазотирозин-248-производных карбоксипептидазы, полученных заменой металла в активном центре Zn^{2+} -азофермента.

Спектры КД Co^{2+} , Ni^{2+} и Mn^{2+} -азокарбоксипептидазы А. Замена иона цинка на кобальт в активном центре арсанилазотирозин-248-карбоксипептидазы А приводит к значительному уменьшению интенсивности полосы КД при 510 нм (от $-41\,000$ град·см²/дмоль для Zn^{2+} -азофермента до $-14\,000$ для Co^{2+} -азофермента при рН 8,2). Величины молекулярной эллиптичности полос при 420 и 340 нм в этом случае уменьшаются в меньшей степени (от $+22\,000$ до $+18\,000$ и от $-19\,000$ до $-12\,000$ соответственно).

Замена иона цинка на марганец или никель в азоферменте приводит к почти полному исчезновению отрицательной полосы КД при 510 нм, величина молекулярной эллиптичности которой для Ni^{2+} -азокарбоксипептидазы равна $+6400$ при рН 8,2 и -1300 при рН 7,4 (оптимуме рН-зависимости спектрального отклика), а для Mn^{2+} -азокарбоксипептидазы равна -4800 (рН 8,2). Полоса КД при 340 нм полностью исчезает в случае Ni^{2+} -или Mn^{2+} -азофермента. Наконец, величины молекулярной эллиптичности полос при 420 нм также уменьшаются для Ni^{2+} - и Mn^{2+} -азокарбоксипептидазы и равны $+15\,000$ (при рН 7,4) и $+6600$ (при рН 8,2) соответственно, в то время как для Zn^{2+} -азофермента эта величина составляет $+22\,000$.

Влияние β-фенилпропионата на спектры КД Co^{2+} , Ni^{2+} и Mn^{2+} -азокарбоксипептидазы. Картина спектрального титрования Co^{2+} -азокарбоксипептидазы под действием β-фенилпропионата (рис. 5а) качественно аналогична титрованию Zn^{2+} -азофермента (рис. 1а). Увеличение концентрации β-фенилпропионата от 2 до 4 мМ приводит к уменьшению интенсивности отрицательной полосы КД при 510 нм (но не подавляет ее полностью вследствие перекрывания данной полосы с вновь образующейся под дей-

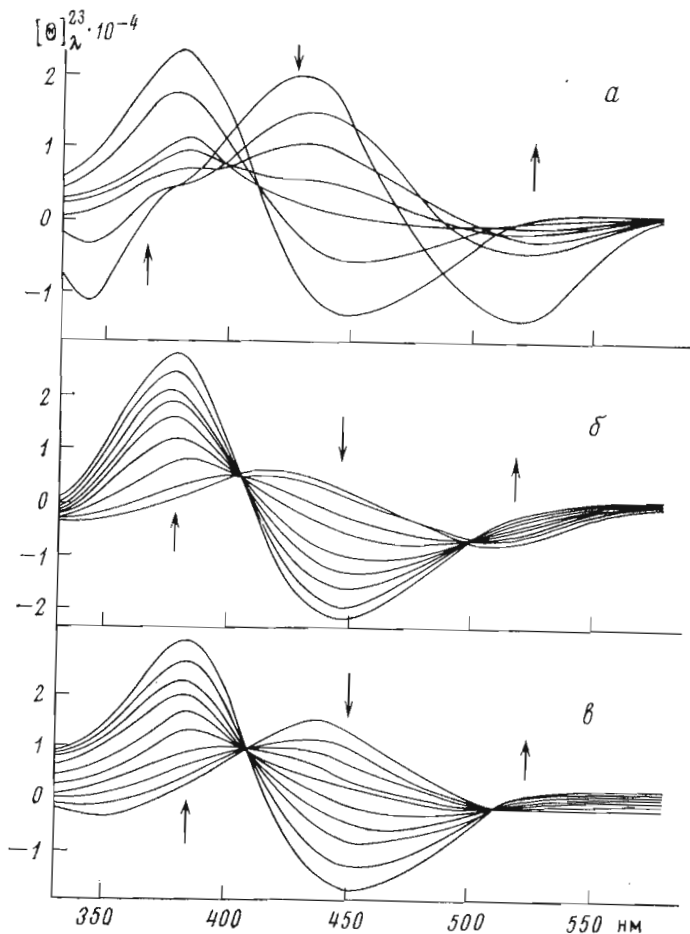


Рис. 5. Влияние β-фенилпропионата на спектры циркулярного дихроизма Co^{2+} - (а), Mn^{2+} - (б), Ni^{2+} -арсениазотирозин-248-карбокисептидазы (в). Изменение концентрации β-фенилпропионата: 0—41 (а), 0—20 (б), 0—7,1 мМ (в). Обозначения — в подписи к рис. 1

ствием β-фенилпропионата интенсивной полосой при 450 нм). При этом вместо полос при 420 и 340 нм происходит формирование двух новых экстремумов: отрицательного при 450 нм и положительного при 380 нм (рис. 5а). Количественная обработка данных спектрального титрования указывает на то, что при замене цинка на кобальт в активном центре азофермента эффективность связывания β-фенилпропионата значительно увеличивается, что в свою очередь приводит к более эффективному подавлению полосы КД при 510 нм. Таким образом, разрушение внутримолекулярного координационного соединения остатка азотирозина-248 с металлом происходит при связывании β-фенилпропионата с ионом металла активного центра карбокисептидазы. С другой стороны, второй участок связывания β-фенилпропионата, взаимодействие с которым вызывает уменьшение интенсивности полосы КД при 420 нм, является металлнезависимым (см. табл. 2).

Известно, что как сложноэфирные, так и пептидные субстраты связываются с Co^{2+} -карбокисептидазой эффективнее, чем с Zn^{2+} -ферментом [13], что согласуется также с данными по спектральному титрованию соответствующих металлзамещенных азоферментов β-фенилпропионатом, если его рассматривать как аналог сложноэфирных субстратов (см. [11, 13—15]). Продолжая эту аналогию, можно ожидать, что связывание β-фенилпропионата с Mn^{2+} -азокарбокисептидазой должно ухудшаться по срав-

Константы диссоциации ($K_{\text{дис}}$) комплексов Zn^{2+} -, Co^{2+} -, Mn^{2+} и Ni^{2+} -содержащей арсенилазотирозин-248-карбоксипептидазы А с субстратами и ингибиторами *

| Эффектор | Ион двухвалентного металла в активном центре азофермента | $K_{\text{дис}}$, мМ (длина волны, нм) |
|--|--|--|
| β -Фенилпропионат | Zn | 4,3±0,2 (550) |
| | | 11,5±0,8 (445) |
| | | 4,3±0,4 (330) |
| | Co | 1,8±0,2 (550) |
| | | 11,0±0,5 (455) |
| | | 1,8±0,3 (330) |
| β -Фенилпропионат + Z-Gly-Gly (92 мМ) | Mn | 10±2 (445) |
| | Ni | 2,2±0,2 (445) |
| | Zn | 1,5±0,1 (550) |
| β -Фенилпропионат + Z-Gly-Gly (42 мМ) Gly-L-Тур | Zn | 12±1 (445) |
| | Mn | 10±2 (440) |
| | Zn | 1,0±0,1 (510) |
| | Co | 0,14±0,02 (510) |
| L-Фенилаланин | Zn | 2,6±0,2 (510) |
| | Co | 3,1±0,3 (510) |

* Определены с помощью спектрального титрования азофермента методом КД, рН 8,2 (за исключением Ni^{2+} -азокарбоксипептидазы — рН 7,4), 23°.

нению с Zn^{2+} -азоферментом, так как переход от Zn^{2+} - к Mn^{2+} -карбоксипептидазе характеризуется уменьшением эффективности связывания сложноэфирных субстратов [13, 16, 17]. Действительно, характер спектрального титрования Mn^{2+} -азокарбоксипептидазы под действием β -фенилпропионата (рис. 5б) свидетельствует о связывании всего одной молекулы ингибитора с азоферментом (наблюдаются две четкие изобестические точки вместо размытой области в случае Zn^{2+} - и особенно Co^{2+} -азокарбоксипептидазы, см. рис. 1а и 5а), причем взаимодействие ее происходит с металлнезависимым участком связывания азокарбоксипептидазы (табл. 2). По-видимому, связывание молекулы β -фенилпропионата, приводящее к разрушению комплекса азотирозина-248 с металлом, настолько ухудшается при замене цинка на марганец, что оно практически не проявляется при спектральном титровании азофермента. Таким образом, полученная спектральная картина (рис. 5б) отражает взаимодействие β -фенилпропионата с «вторичным», специфическим центром связывания ингибитора, который не связывает другие эффекторы, изучаемые в настоящей работе. При этом наибольший эффект наблюдается при 375 и 450 нм, где происходит образование новых интенсивных полос, аналогично спектральной картине титрования Zn^{2+} - и Co^{2+} -азокарбоксипептидазы, но более ярко выраженных в случае Mn^{2+} -азофермента.

Сопоставление полученных данных с результатами двухкомпонентного спектрального титрования Zn^{2+} -азокарбоксипептидазы позволяет заключить, что Z-Gly-Gly проявляет синергизм по отношению именно к той молекуле β -фенилпропионата, в связывании которой участвует металл активного центра (табл. 1, 2). Таким образом, можно было бы ожидать, что добавление Z-Gly-Gly не будет влиять на связывание β -фенилпропионата с Mn^{2+} -азокарбоксипептидазой, так как в этом случае спектральное титрование отражает только вклад специфического, металлнезависимого участка связывания β -фенилпропионата (взаимодействие с которым приводит к уменьшению интенсивности и к инверсии полосы КД при 420 нм). Действительно, как показывает количественная обработка спектральных данных, Z-Gly-Gly не проявляет синергизма (и не конкурирует) по

отношению к связыванию β -фенилпропионата с Mn^{2+} -азокарбокисептидазой (табл. 2) в отличие от титрования Zn^{2+} -азофермента (см. выше).

Картина спектрального титрования Ni^{2+} -азокарбокисептидазы β -фенилпропионатом (рН 7,4) качественно сходна с титрованием Mn^{2+} -азофермента (рис. 5в). При добавлении β -фенилпропионата наблюдаются две четкие изобестические точки (при 410 и 510 нм) и происходит формирование двух экстремумов: положительного при 380 нм и отрицательного при 455 нм. Следует отметить, что в присутствии β -фенилпропионата происходит полная (и количественная) инверсия полосы КД Ni^{2+} -азокарбокисептидазы при 435 нм, так что величина молекулярной эллиптичности изменяется от +15 000 (в отсутствие β -фенилпропионата) до -15 000 (в присутствии насыщающей концентрации ингибитора). На основании полученных данных можно заключить, что картина спектрального титрования Ni^{2+} -азокарбокисептидазы, как и в случае Mn^{2+} -азофермента, отражает взаимодействие β -фенилпропионата только с металлнезависимым специфическим участком связывания. Значительное улучшение константы диссоциации β -фенилпропионата с Ni^{2+} -азоферментом (при рН 7,4, табл. 2) по сравнению с результатами титрования Zn^{2+} -, Co^{2+} - и Mn^{2+} -замещенных производных (при рН 8,2) находится в согласии с ходом рН-зависимости константы диссоциации данного ингибитора [6]. Итак, связывание одной молекулы β -фенилпропионата с карбокисептидазой А происходит при участии иона металла активного центра (и является эффективным в случае Zn^{2+} - и Co^{2+} -производных азофермента), в то время как эффективность связывания второй молекулы ингибитора практически не изменяется при вариации иона металла в активном центре карбокисептидазы.

Влияние Gly-L-Tyr и Z-Gly-Gly на спектры КД металлопроизводных азокарбокисептидазы А. Добавление Gly-L-Tyr к раствору Co^{2+} -азокарбокисептидазы приводит к резко уменьшению интенсивности полосы КД при 510 нм. Заметный гидролиз субстрата под действием Co^{2+} -азофермента не позволил получить спектры КД, поэтому было проведено только спектральное титрование при 510 нм (табл. 2). При переходе от Zn^{2+} - к Co^{2+} -азокарбокисептидазе эффективность связывания Gly-L-Tyr возрастает в 6 раз, что свидетельствует о взаимодействии данного субстрата с металлом активного центра фермента.

Вследствие высокой скорости гидролиза Gly-L-Tyr в присутствии Mn^{2+} - и Ni^{2+} -азоферментов не удалось провести их спектральное титрование. По этой же причине не были получены спектральные данные для Co^{2+} -, Mn^{2+} - и Ni^{2+} -азокарбокисептидазы в присутствии пептидного субстрата Z-Gly-Gly. Однако качественная картина влияния Z-Gly-Gly на полосу КД при 510 нм показывает, что ион металла активного центра фермента практически не участвует в связывании пептидного субстрата. Таким образом, принципиальная разница между «непродуктивным» и «пептидазным» участками связывания в активном центре карбокисептидазы заключается в том, что в первом случае пептидный субстрат (Gly-L-Tyr) в значительной степени связывается с ионом металла активного центра (возможно, при участии незаряженной α -аминогруппы субстрата), в то время как связывание «истинного» пептидного субстрата и соответствующая ориентация его по отношению к каталитически активным группам фермента происходит без участия иона металла. В пользу этого предположения свидетельствуют также данные работы [13], согласно которой эффективность связывания пептидных субстратов с карбокисептидазой практически не изменяется при удалении иона металла из активного центра фермента (в то время как эффективность связывания сложноефирных субстратов при этом резко уменьшается).

Влияние L-фенилаланина на спектры КД Co^{2+} -азокарбокисептидазы. Добавление L-фенилаланина к Co^{2+} -азокарбокисептидазе приводит к уменьшению интенсивности полосы КД при 510 нм, как и в случае Zn^{2+} -азофермента. Однако если спектр Zn^{2+} -азокарбокисептидазы в присутствии

L-фенилаланина имел две изобестические точки (при 438 и 365 нм), спектральное титрование Co^{2+} -азокарбоксипептидазы *L*-фенилаланином не выявляет изобестических точек вообще и приводит к увеличению интенсивности полосы КД при 420 нм (со смещением максимума до 440 нм при высоких концентрациях ингибитора). Сопоставление констант диссоциации комплексов Zn^{2+} - и Co^{2+} -азофермента с *L*-фенилаланином (табл. 2) позволяет заключить, что металл активного центра фермента не участвует в связывании данного ингибитора.

Множественное связывание эффекторов с арсенилазотирозин-248-карбоксипептидазой А. На основании приведенных данных по спектральному изучению двухкомпонентного связывания эффекторов (субстратов и ингибиторов карбоксипептидазы А), а также связывания эффекторов с металлзамещенными производными азокарбоксипептидазы А можно сделать ряд выводов о взаимоотношениях между участками связывания субстратов и ингибиторов в активном центре фермента.

1. Участки связывания *L*-фенилаланина и *Z*-Gly-Gly являются частично перекрывающимися, но не идентичными (*Z*-Gly-Gly проявляет синергизм, а *L*-фенилаланин практически не конкурирует по отношению к связыванию β -фенилпропионата; кроме того, спектры КД Zn^{2+} -азофермента в присутствии *L*-фенилаланина и *Z*-Gly-Gly характеризуются различным положением изобестических точек). Из данных ферментативной кинетики также следует, что *L*-фенилаланин — ингибитор реакций гидролиза пептидных субстратов, катализируемых карбоксипептидазой [18]. Ион металла активного центра фермента не участвует в связывании *L*-фенилаланина и *Z*-Gly-Gly.

2. Участки связывания β -фенилпропионата и *Z*-Gly-Gly кооперативны (наблюдается взаимный синергизм). Обнаруженное явление может выражаться в кооперативности между «эстеразным» (металлзависимым) и «пептидазным» (металлнезависимым) участками в активном центре карбоксипептидазы и свидетельствует о пространственной разделенности данных участков (см. [13]). Помимо этого существует второй специфический (и металлнезависимый) участок связывания β -фенилпропионата, с которым больше не взаимодействует ни один из изученных в настоящей работе эффекторов.

3. Участок связывания *L*-фенилаланина (металлнезависимый) частично перекрывается с «непродуктивным» центром фермента (металлзависимым участком связывания Gly-*L*-Tyr) и совершенно не конкурирует с «эстеразным» центром (металлзависимым участком связывания β -фенилпропионата).

4. «Пептидный» и «непродуктивный» участки активного центра (связывающие в данном случае *Z*-Gly-Gly и Gly-*L*-Tyr соответственно) в значительной степени независимы.

5. «Эстеразный» и «непродуктивный» участки активного центра совершенно независимы (но при определенных условиях возможно некоторое взаимодействие между ними, приводящее к дополнительному увеличению концентрации внутримолекулярного координационного соединения тирозин-248—Zn, см. выше).

6. Взаимодействие Gly-*L*-Tyr с «непродуктивным» центром характеризуется эффективным связыванием с ионом металла активного центра, в то время как взаимодействие субстратов (*Z*-Gly-Gly) с «пептидазным» центром происходит без участия иона металла. Наконец, взаимодействие аналога сложноэфирного субстрата, β -фенилпропионата, с азоферментом характеризуется существенно менее эффективным связыванием с ионом металла, чем при взаимодействии Gly-*L*-Tyr. По-видимому, эти различия в связывании субстратов и ингибиторов при переходе от Zn^{2+} - к Co^{2+} -ферменту свидетельствуют о взаимодействии различных функциональных групп эффекторов с ионом металла. Можно полагать, что взаимодействие Gly-*L*-Tyr с ионом металла происходит при участии депротонированной

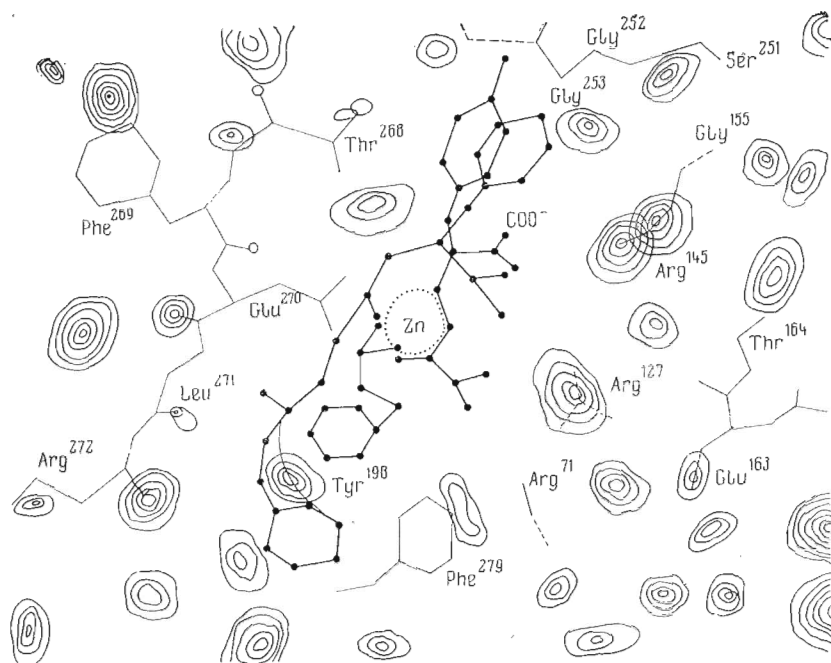


Рис. 6. Карта участков связывания активного центра карбоксипептидазы А, построенная на основании данных рентгеноструктурного анализа (см. [19]) и спектрального титрования арсенилазофермента (настоящая работа). Сплошными утолщенными линиями показаны скелеты субстратов и ингибиторов Gly-L-Тур, Z-Gly-Gly, L-фенилаланина и β-фенилпропионата

α-аминогруппы псевдосубстрата («непродуктивное связывание», см. также [11, 19]), а взаимодействие β-фенилпропионата (аналога сложноэфирного субстрата) происходит с участием карбоксильной группы.

Результаты, полученные с помощью спектрального титрования производных азокарбоксипептидазы совместно с данными рентгеноструктурного анализа [19], позволяют представить топографию участков связывания субстратов и ингибиторов в активном центре карбоксипептидазы (рис. 6). Помимо приведенных выше нужно отметить следующие особенности участков связывания активного центра:

1) отрицательно заряженная карбоксильная группа пептидного субстрата, а также непродуктивно связанного «псевдосубстрата», Gly-L-Тур, и ингибитора L-фенилаланина взаимодействует с группой положительно заряженных остатков аргинина-145, -71 и -127, в то время как отрицательно заряженная карбоксильная группа сложноэфирного субстрата взаимодействует с ионом металла активного центра;

2) неполярные боковые цепи N-ацилированного дипептидного субстрата в комплексе с ферментом расположены: а) в гидрофобной «полости» активного центра карбоксипептидазы, где, согласно данным рентгеноструктурного анализа [11], находится боковая цепь «псевдосубстрата» Gly-L-Тур, а также ингибитора L-фенилаланина; б) в гидрофобной области, созданной боковыми цепями остатков тирозина-198, фенилаланина-279 и лейцина-271. При связывании Z-Gly-Gly оба сорбционных центра не заняты, и первый из них взаимодействует с боковой цепью L-фенилаланина (который в свою очередь конкурирует с пептидным субстратом Z-Gly-Gly и Gly-L-Тур в связывании с остатком аргинина-145), а второй — с ароматической группой β-фенилпропионата (которая фактически «подстраивает» Z-Gly-Gly до «специфического» субстрата, приводя таким образом к синергизму в связывании Z-Gly-Gly и β-фенилпропионата). Этот же тип взаимодействия является причиной субстратной активации в реакции

гидролиза пептидов под действием карбоксипептидазы [9, 20]. Итак, центр связывания второй молекулы пептидного субстрата, вызывающей субстратную активацию [9], и «эстеразный» центр должны быть идентичны, и можно предсказать, что соответствующие субстраты («активирующий» пептидный и сложноэфирный) должны конкурировать в связывании с активным центром карбоксипептидазы. Эта же гипотеза полностью объясняет тот факт, что ряд эффекторов являются активаторами пептидазной активности и в то же время ингибиторами эстеразной активности (но не наоборот) [21—23]. Наконец, можно заключить, что кажущаяся независимость (и кажущаяся пространственная разделенность) участков связывания пептидных и сложноэфирных субстратов (см. [13—18]) обусловлена тем, что в качестве пептидных субстратов использовались производные, не имеющие заместителей во вторичном (от С-конца) аминокислотном остатке (например, Z-Gly-Phe, Z-Gly-Gly-Phe, Bz-Gly-Gly-Phe, Bz-Gly-Gly-Gly-Phe, Dns-Gly-Gly-Gly-Phe и т. д.), центр связывания которых в активном центре является общим для сложноэфирных и пептидных субстратов (взаимодействии с которым ингибирует связывание первых и активирует гидролиз последних);

3) карбоксильная группа остатка глутаминовой кислоты-270, которая, по-видимому, принимает определенное участие в катализе карбоксипептидазой (хотя конкретная ее роль остается неизвестной [24]), расположена в непосредственной близости от потенциально расщепляемой пептидной связи в Z-Gly-Gly. В то же время пептидная связь Gly-L-Tyr имеет совершенно другую, «непродуктивную» ориентацию в фермент-субстратном комплексе.

Схема участков связывания активного центра карбоксипептидазы, представленная на рис. 6, иллюстрирует характер множественного взаимодействия эффекторов (субстратов и ингибиторов) с ферментом и качественно объясняет причину различных спектральных откликов, наблюдаемых при взаимодействии эффекторов с арсенилазокарбоксипептидазой*. Наше следующее сообщение [25], посвященное изучению Co^{2+} -карбоксипептидазы методом магнитного КД, подтверждает множественный характер взаимодействия эффекторов с активным центром фермента.

Экспериментальная часть

Карбоксипептидаза A_γ , выделенная по методу Ансона [26], и карбоксипептидаза A_α , выделенная по методу Рокса [27], были получены от фирм Worthington Biochemical Corp. и Sigma соответственно в виде водной суспензии кристаллов. Zn^{2+} -арсенилазотирозин-248-карбоксипептидаза была приготовлена следующим образом: 8 мл 0,02 М раствора *n*-арсениловой кислоты в 0,2 н. HCl смешивали при 0° с 10 мл 0,02 М раствора NaNO_2 и полученную смесь перемешивали 30 мин при 0°. pH раствора увеличили до 7 добавлением 2 мл 1 н. NaOH и после этого объем раствора довели до 25 мл дистиллированной водой. Полученный раствор немедленно добавили к 16 мл водной суспензии кристаллов Zn^{2+} -карбоксипептидазы при 0° (50-кратный мольный избыток диазотированной *n*-арсениловой кислоты по отношению к ферменту); затем прилили 4,1 мл 0,11 М раствора KHCO_3 и pH довели до 8,8 с помощью 0,1 н. NaOH. Это значение pH поддерживали постоянным 10—15 мин при 0°. Полученный раствор перемешивали 3 ч в ледяной бане. Модифицированный фермент (кристаллы желтого цвета) отделяли центрифугированием, промывали пять раз дистиллированной водой, свободной от следов металлов, и растворяли в 0,05 М Трис-буфере, 0,5 М NaCl, pH 8,2. Количество остатков азотирозина и азогисти-

* Данная схема условна и не претендует на специфическую идентификацию остатков активного центра, участвующих в связывании эффекторов. Это вытекает, в частности, из того, что структура активного центра карбоксипептидазы в кристалле и в растворе может быть различной (см. [10]).

дина в ферменте было рассчитано по данным оптического поглощения азокарбокисептидазы при 460 и 500 нм [28] и оказалось равно $1,00 \pm 0,05$ и менее чем 0,05 на молекулу фермента соответственно.

Препараты кристаллической Co^{2+} -, Ni^{2+} - и Mn^{2+} -арсанилазокарбокисептидазы были приготовлены по специальной методике и любезно предоставлены И. Леггом из Университета штата Вашингтон (Пуллман, Вашингтон). Анализ данных препаратов методом атомной абсорбционной спектроскопии показал наличие в них менее 0,3% цинка.

Концентрацию белка определяли по оптическому поглощению при 278 нм, используя молярные коэффициенты экстинкции для нативной карбокисептидазы $6,42 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ [29] и для металламещенных производных арсанилазокарбокисептидазы $7,32 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ [1]. Все растворы обрабатывали 0,1% дитизином в четыреххлористом углеводе для устранения следов металлов [30]. Стеклопосуду и пипетки предварительно обрабатывали смесью (1 : 1) азотной и серной кислот и тщательно промывали дистиллированной водой, свободной от следов металлов.

Измерение КД проводили с использованием регистрируемого спектрополяриметра Cary-61 (США) (диапазон шкалы 0,02—0,05 град) при концентрации ферментов от $3 \cdot 10^{-6}$ до $7 \cdot 10^{-6}$ М в кварцевых кюветах объемом 1 мл и длиной светового пути 1 см. Величину эллиптичности выражали в виде молекулярной эллиптичности, $[\Theta]^{23} = (\Theta/l)(M/lc)$ в единицах град·см²/дмоль, где Θ — наблюдаемая эллиптичность, град; M — молекулярный вес (34 600 для карбокисептидазы А); l — длина светового пути, см; c — концентрация фермента, г/мл. Во всех случаях результаты спектрального титрования корректировались с учетом разбавления фермента при добавлении раствора эффектора.

Значения констант диссоциации комплексов азоферментов с эффекторами в большинстве случаев были рассчитаны с использованием координат двойных обратных величин $1/(\Theta_0 - \Theta)_\lambda$, $1/[I]$, где Θ_0 и Θ — эллиптичность азофермента в отсутствие и в присутствии эффектора (при длине волны λ) [1]. Отрезок, отсекаемый полученной прямой на оси абсцисс, в данных координатах равен $-1/K_{\text{дис}}$. При наличии двух участков связывания эффектора в активном центре (на что обычно указывает размытая область пересечения спектральных кривых вместо четкой изобестической точки) величину $K_{\text{дис}}$ определяли из данных титрования при тех длинах волн, где спектры, соответствующие различным способам связывания, не перекрывались, или при длине волны изобестической точки, отражающей лишь один способ связывания эффектора. В ряде случаев величину $K_{\text{дис}}$ рассчитывали как концентрацию эффектора, при которой интенсивность полосы в спектре КД уменьшалась в 2 раза (по отношению к интенсивности полосы при насыщающей концентрации эффектора).

ЛИТЕРАТУРА

1. Johansen J. T., Vallee B. L. (1971) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 68, 2532—2535.
2. Johansen J. T., Livingston D. M., Vallee B. L. (1972) Biochemistry, 11, 2584—2588.
3. Johansen J. T., Vallee B. L. (1973) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 70, 2006—2010.
4. Johansen J. T., Vallee B. L. (1975) Biochemistry, 14, 649—660.
5. Suh J., Kaiser E. T. (1976) J. Amer. Chem. Soc., 98, 1940—1947.
6. Johansen J. T., Klyosov A. A., Vallee B. L. (1976) Biochemistry, 15, 296—303.
7. Fairclough G. F., Jr., Vallee B. L. (1970) Biochemistry, 9, 4087—4094.
8. Fairclough G. F., Jr., Vallee B. L. (1971) Biochemistry, 10, 2470—2477.
9. Клесов А. А., Вэлли Б. Л. (1977) Биоорг. химия, 3, 806—815.
10. Spilburg C. A., Bethune J. L., Vallee B. L. (1974) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 71, 3922—3926.
11. Quijcho F. A., Lipscomb W. N. (1971) Adv. Prot. Chem., 25, 1—78.
12. Lipscomb W. N. (1973) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 70, 3797—3801.
13. Auld D. S., Holmquist B. (1974) Biochemistry, 13, 4355—4361.
14. Bunting J. W., Myers C. D. (1975) Can. J. Chem., 53, 1984—1992.
15. Bunting J. W., Myers C. D. (1975) Can. J. Chem., 53, 1993—2004.
16. Vallee B. L., Riordan J. F. (1968) Brookhaven Symp. Biol., 21, 91—117.
17. Auld D. S., Vallee B. L. (1970) Biochemistry, 9, 602—609.

18. French T. C., Yu N.-T., Auld D. S. (1974) *Biochemistry*, **13**, 2877—2882.
19. Ludwig M. L., Lipscomb W. N. (1973) in *Inorganic Biochemistry*, vol. 1, pp. 438—487, G. L. Eichhorn (ed.), Elsevier.
20. Schechter I., Zazepizki E. (1971) *Eur. J. Biochem.*, **18**, 469—473.
21. Davies R. C., Auld D. S., Vallee B. L. (1968) *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, **31**, 628—633.
22. Davies R. C., Riordan J. F., Auld D. S., Vallee B. L. (1968) *Biochemistry*, **7**, 1090—1099.
23. Lange L. G., Auld D. S., Riordan J. F. (1974) *Biochemistry*, **13**, 1983—1986.
24. Nau H., Riordan J. F. (1975) *Biochemistry*, **14**, 5285—5294.
25. Клесов А. А., Вэлш Б. Л. (1977) *Биоорг. химия*, **3**, 958—963.
26. Anson M. L. (1937) *J. Gen. Physiol.*, **20**, 777.
27. Cox D. J., Bovard F. C., Bargetzi J. P., Walsh K. A., Neurath H. (1964) *Biochemistry*, **3**, 44—47.
28. Tabachnick M., Sobotka H. (1960) *J. Biol. Chem.*, **235**, 1051—1054.
29. Simpson R. T., Riordan J. F., Vallee B. L. (1963) *Biochemistry*, **2**, 616—622.
30. Thiers R. E. (1957) *Methods Biochem. Anal.*, **5**, 273—335.

Поступила в редакцию
26.XI.1976

ARSANILAZOTYROZINE-248 CARBOXYPEPTIDASE A: CIRCULAR DICHROISM STUDY OF THE TOPOGRAPHY OF THE ENZYME ACTIVE CENTER

KLYOSOV A. A., VALLEE B. L.

*Department of Chemistry, M. V. Lomonosov State University, Moscow;
Biophysics Research Laboratory, Department of Biological
Chemistry, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts, USA*

Diazotized arsanilic acid reacts specifically with Tyr-248 residue of the active center of carboxypeptidase A. The resultant azotyrosine chromophore generates two different circular dichroism probes: azoTyr-248 itself and the azoTyr-248-Zn chelate. Both are environmentally sensitive and each can signal the same or different perturbations of vicinal, local conformations. This dual probe function greatly magnifies the possibility of mapping the topography of the active center with respect to sites of interaction of effectors, such as substrates or inhibitors. The number and nature of the binding subsites of zinc azoTyr-248 carboxypeptidase have been elucidated in this work by means of a method employing the reversible binding of effector pairs. An analysis of the simultaneous action of such effector pairs under equilibrium conditions reveals their mutual competition or synergism. In addition, the CD spectra of zinc (II), cobalt (II), nickel (II), and manganese (II)-carboxypeptidase have been studied in the presence of substrates and inhibitors. The resultant map of subsites for the binding of substrates, inhibitors and activators allows analysis of several apparent kinetic anomalies. The data and their interpretations are consistent with those of a model proposed earlier that was based on the kinetics of hydrolysis of di- and depsiptides.
