



УДК 577.15

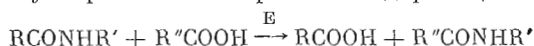
КИНЕТИКА КАТАЛИЗИРУЕМОЙ ПЕПСИНОМ РЕАКЦИИ
ТРАНСПЕПТИДАЦИИ ПО ТИПУ АМИНОПЕРЕНОСА:
ЗАВИСИМОСТЬ ОТ pH

Михайлова А. Г., Пожарский С. Б., Костецкий П. В.,
Руми Л. Д., Антонов В. К.

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

Изучена pH-зависимость катализируемой пепсином реакции транспептидации по типу аминопереноса в интервале pH 3,7—5,6 с использованием в качестве субстратов N-ацетил-L-фенилаланил-L-тирозина (Ac-Phe-Tyr-OH) и γ -морфолинопропиламида N-ацетил-L-фенилаланил-L-фенилаланина (Ac-Phe-Phe-АПП), а в качестве акцепторов — производных *n*-нитрофенилаланина. Показано, что наблюдаемые зависимости кинетических констант транспептидации согласуются со схемами, учитывающими ионизацию акцептора в случае субстрата (Ac-Phe-Phe-АПП) и ионизацию акцептора, субстрата и «аминофермента» в случае субстрата Ac-Phe-Tyr-OH. Показано, что константа скорости транспептидации в условиях эксперимента (pH 3,7—5,6) не зависит от pH.

Способность пепсина катализировать перенос C-концевого фрагмента гидролизуемого субстрата на карбоксилсодержащий акцептор [1—3]



свидетельствует в пользу образования при пепсиновом катализе промежуточного комплекса фермента с переносимым фрагментом субстрата. Однако такая реакция транспептидации происходит не во всем интервале pH активности пепсина. Данные ряда исследователей [3—6] показывают, что в области низких значений pH (~ 2) продукты транспептидации не удается обнаружить. Это позволило предположить, что образование «аминофермента» не является характерным свойством пепсинового катализа в pH-оптимуме его действия. Решение этого вопроса требовало детального кинетического исследования. Располагая удобным методом исследования кинетики реакции транспептидации, основанным на использовании хромофорного акцептора [7, 8], мы изучили pH-зависимость кинетических констант этого процесса с целью определения состояния ионизации участвующих в нем групп фермента, акцептора и субстрата. Была исследована pH-зависимость реакции транспептидации для двух типов субстратов: содержащего свободную карбоксильную группу N-ацетил-L-фенилаланил-L-тирозина (Ac-Phe-Tyr-OH) и для субстрата с защищенной карбоксильной группой γ -морфолинопропиламида N-ацетил-L-фенилаланил-L-фенилаланина (Ac-Phe-Phe-АПП). Ранее нами было показано, что субстраты последнего типа также являются донорами транспептидации [8]. В качестве акцептора использован N-бензилоксикарбонил-*n*-нитро-L-фенилаланин (Z-Phe(NO₂)-OH) или N-ацетил-*n*-нитро-L-фенилаланин (Ac-Phe(NO₂)-OH).

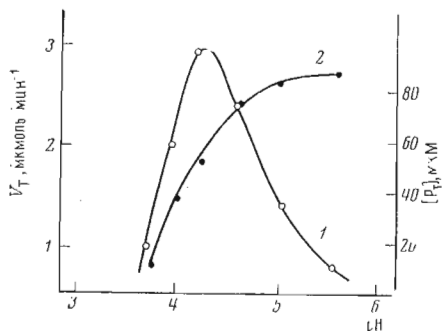


Рис. 1

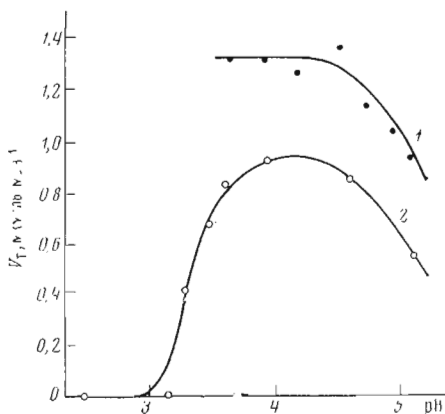


Рис. 2

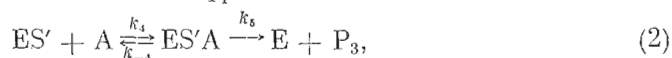
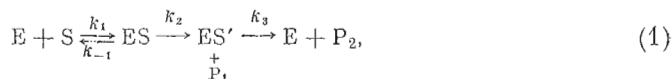
Рис. 1. pH-Зависимость начальной скорости образования продукта транспептидации (1) и максимальной концентрации продукта транспептидации (2) для субстрата Ac-Phe-Tyr-OH (10 мМ) и акцептора Z-Phe(NO₂)-OH (1 мМ); [E]₀ = 0,175 мМ

Рис. 2. pH-Зависимость начальной скорости образования продукта транспептидации для субстрата Ac-Phe-Phe-АПМ (7,9 мМ) и акцепторов (1 мМ) Z-Phe(NO₂)-OH (1) или Ac-Phe(NO₂)-OH (2); [E]₀ = 0,175 мМ

pH-Зависимость начальной скорости транспептидации (рис. 1, 1) и максимальной концентрации продукта транспептидации (рис. 1, 2) для Ac-Phe-Tyr-OH и акцептора Z-Phe(NO₂)-OH показывает, что, в то время как скорость процесса имеет максимум (при pH ~ 4,3), концентрация продукта монотонно возрастает. Очевидно, это объясняется изменением соотношения скоростей транспептидации и гидролиза субстрата при изменении pH. Низкая скорость транспептидации и низкая концентрация продукта при pH < 4 затрудняют обнаружение последнего.

Для защищенного по карбоксильной группе субстрата Ac-Phe-Phe-АПМ зависимость скорости транспептидации от pH имеет несколько другой характер (рис. 2). При использовании акцептора Z-Phe(NO₂)-OH (рис. 2, 1) в области pH 3,7—4,6 скорость реакции практически неизменна. Однако при использовании более растворимого акцептора Ac-Phe(NO₂)-OH (рис. 2, 2) оказалось, что скорость транспептидации при pH < 3,7 также уменьшается, становясь пренебрежимо малой при pH ~ 3.

Как было показано нами ранее [7], процесс транспептидации в начальный момент времени, когда гидролизом продукта можно пренебречь, происходит по схеме



где E — фермент, S — субстрат, A — акцептор транспептидации, ES' — «аминофермент», P₁ и P₂ — соответственно N- и C-концевые продукты гидролиза, P₃ — продукт транспептидации.

Обработка этой схемы по методу стационарных концентраций при условии, что [S]₀ ≫ [E]₀, [A]₀ > [E]₀ и k₂ ≪ k₃, позволяет получить следующее выражение для начальной скорости образования продукта транспептидации (в форме двойных обратных величин):

$$1/V_T = \frac{K_{T(\text{эфф})}}{k_5 [E]_0} \left(\frac{K_m + [S]_0}{[S]_0} \right) 1/[A]_0 + \left(\frac{1}{k_5 [E]_0} + \frac{K_m + [S]_0}{k_2 [E]_0 [S]_0} \right), \quad (3)$$

где $K_{T(\text{эфф})} = \left(\frac{k_{-1} + k_5}{k_4} \right) k_3 / k_2$.

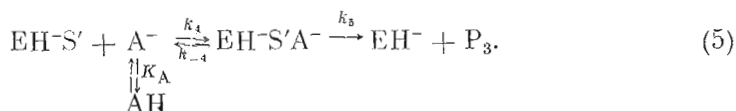
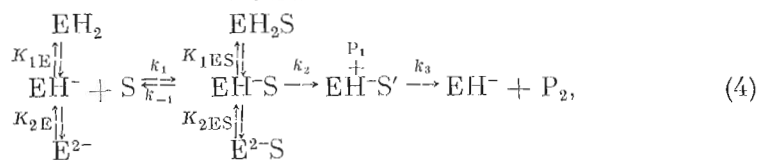
Уравнение (3) в координатах $1/V_T$ от $1/[A]_0$ позволяет из отрезков, отсекаемых на осях координат, получить значения констант транспептидации k_5 и $K_{T(\text{эфф})}$ для любого субстрата с известными константами гидролиза.

Чтобы выяснить причины изменений скорости транспептидации при различных значениях рН, мы исследовали рН-зависимость констант транспептидации k_5 и $K_{T(\text{эфф})}$, а также углового коэффициента и свободного члена в линейной зависимости (3). Для этого необходимо было получить зависимость начальной скорости (V_T) от концентрации акцептора при каждом значении рН. Однако низкая растворимость акцептора Z-Phe(NO₂)-ОН в области рН < 3,5 и значительное снижение скорости реакции с акцептором Ac-Phe(NO₂)-ОН в этих условиях (см. рис. 2, 1 и 2) не позволили пройти весь интервал интересовавших нас значений рН. рН-Зависимость констант транспептидации (акцептор Z-Phe(NO₂)-ОН) нам пришлось ограничить пределами 3,7—5,6.

Для обоих исследованных субстратов (табл. 1) было обнаружено, что величина k_5 практически не зависит от рН в исследованном интервале. Как известно [9—13], скорость гидролиза и величина $k_{\text{кат}}$ субстратов пепсина уменьшается при ионизации группы фермента с $pK_a \sim 4,5$. Наши данные свидетельствуют, что эта группа фермента не участвует в катализе стадии, определяющей скорость транспептидации.

Мы предположили, что рН-зависимость транспептидации субстрата Ac-Phe-Phe-АПМ, защищенного по карбоксильной группе, объясняется следующей схемой реакций, включающей ионизацию свободного фермента и фермент-субстратного комплекса, а также акцептора транспептидации (K_{1E} , K_{2E} , K_{1ES} , K_{2ES} и K_A — соответствующие константы ионизации):

Схема 1



Обозначим угловой коэффициент и свободный член в зависимости (3) соответственно через z_1 и z_0 .

Для реакции, протекающей по схеме 1 с учетом принципа стационарности, получаются следующие выражения для z_0 , z_1 и $K_{T(\text{эфф})}$ (см. Приложение):

$$z_0 = \frac{1}{\tilde{k}_2 [E]_0} \left(1 + \frac{\tilde{K}_m}{[S]_0} + \frac{\tilde{k}_2}{\tilde{k}_5} \right) \left(1 + \frac{1}{[H^+]} \cdot \frac{K_{2E} \left(1 + \frac{\tilde{K}_m}{[S]_0} \right)}{1 + \frac{\tilde{K}_m}{[S]_0} + \frac{\tilde{k}_2}{\tilde{k}_5}} \right), \quad (6)$$

$$z_1 = \left(\tilde{K}_T \frac{\tilde{k}_3}{\tilde{k}_2} / \tilde{k}_5 [E]_0 \right) \left(1 + \frac{\tilde{K}_m}{[S]_0} \right) \left(1 + \frac{[H^+]}{K_A} \right) \left(1 + \frac{K_{2E}}{[H^+]} \right), \quad (7)$$

$$K_{T(\text{эфф})} = \tilde{K}_T \frac{\tilde{k}_3}{\tilde{k}_2} \left(1 + \frac{[H^+]}{K_A} \right) \left(1 + \frac{K_{2E}}{[H^+]} \right), \quad (8)$$

\tilde{K}_m , \tilde{k}_2 и т. д. — предельные, т. е. рН-независимые, константы; константа ионизации карбоксильной группы фермента с $pK_{1E} = pK_{1ES} \sim 1$ не фигурировала в расчетах, так как измерения проводились в интервале рН 3,7—5,6.

Константы ионизации групп, важные для реакции транспептидации и подтверждения предложенного механизма процесса, определялись

рН-зависимость констант транспептидации; акцептор Z-Phe(NO₂)-ОН
(0,25–1,5 мМ)

S=Ac-Phe-Tyr-ОН, [E] ₀ =0,175 мМ			S=Ac-Phe-Phe-АПМ, [E] ₀ =0,0877 мМ		
рН	k ₅ ·10 ² , мин ⁻¹	K _T (эфф), мМ	рН	k ₅ ·10 ² , мин ⁻¹	K _T (эфф), мМ
3,77	5,85±1,7	5,94±0,8	3,77	4,92±1,6	1,80±0,6
3,98	5,20±0,8	1,09±0,34	3,98	4,70±0,9	1,75±0,4
4,27	3,90±0,29	0,337±0,039	4,27	4,46±0,98	1,72±0,4
4,62	3,10±0,4	0,156±0,085	4,61 **	4,65±0,54	1,70±0,2
5,11	4,71±0,67	0,563±0,047	4,79 **	4,52±0,98	2,50±0,55
5,34	2,92±0,58	0,876±0,061	4,97 **	3,77±1,7	2,70±0,7
5,57 *	4,48±0,49	2,47±0,25	5,11 ***	5,26±2,2	3,80±0,7

* [S]₀=20 мМ; ** [S]₀=7,9 мМ; *** [S]₀=6,35 мМ.

Таблица 2

Значения углового коэффициента и свободного члена в зависимости
 $1/V_T = z_1 \cdot (1/[A]_0) + z_0$

S=Ac-Phe-Tyr-ОН, [E] ₀ =0,175 мМ			S=Ac-Phe-Phe-АПМ, [E] ₀ =0,0877 мМ		
рН	z ₁ ·10 ⁻² , мин	z ₀ ·10 ⁻⁵ , мин·М ⁻¹	рН	z ₁ ·10 ⁻³ , мин	z ₀ ·10 ⁻⁵ , мин·М ⁻¹
3,77 *	15,8±0,14	1,46±0,22	3,77	0,53±0,05	2,32±0,78
3,98	3,98±0,25	1,18±0,39	3,98	0,54±0,05	2,44±0,6
4,27	1,85±0,08	1,64±0,13	4,27	0,56±0,04	2,56±0,56
4,62	1,78±0,008	2,06±0,22	4,61	0,54±0,02	2,45±0,2
5,11	5,36±0,14	1,80±0,20	4,79	0,82±0,04	2,53±0,5
5,34	7,92±0,24	2,13±0,43	4,97	1,05±0,11	3,02±1,43
5,57 **	7,54±0,19	1,15±0,26	5,11	1,12±0,07	2,17±0,9

* [E]₀=0,116 мМ. ** [E]₀=0,297 мМ.

при помощи симплексного метода минимизации [14]. Критерием качества математической модели служила сумма квадратов отклонений экспериментальной величины от ее теоретического значения (*F*).

Для субстрата Ac-Phe-Phe-АПМ использование этого метода дало следующие значения параметров кривой рН-зависимости K_{T(эфф)}:

$$\tilde{K}_T \frac{\tilde{k}_3}{\tilde{k}_2} = 0,86 \cdot 10^{-3} \text{ М}; K_A = 18,79 \cdot 10^{-5} \text{ М}; K_{2E} = 2,34 \cdot 10^{-5} \text{ М}.$$

Как видно из рис. 3, экспериментальные данные хорошо описываются формулой (8) с этими значениями констант. Величины $rK_A = 3,7$ и $rK_{2E} = 4,6$ оказались близкими к определенной нами константе ионизации акцептора 3,39 для Ac-Phe(NO₂)-ОН и к известному из литературы значению $rK_{2E} = rK_{2ES} \approx 4,7$.

Дальнейшая математическая обработка полученных данных заключалась в изучении рН-зависимости углового коэффициента z₁, вывод аналитического выражения которого значительно проще вывода K_{T(эфф)}. Это обстоятельство становится наиболее важным для рассматриваемой ниже реакции с субстратом Ac-Phe-Tyr-ОН. Что касается z₀, было найдено, что в выражении (6)

$$1/k_2 \left(1 + \frac{K_m}{[S]_0} \frac{\tilde{k}_2}{\tilde{k}_5} \right) = 21,9 \text{ мин},$$

а коэффициент при 1/[H⁺] близок к нулю, откуда следует, что z₀ от рН не зависит. В Приложении показано, что при этом константа k₅ не зависит от рН, что подтверждается экспериментальными данными (табл. 1).

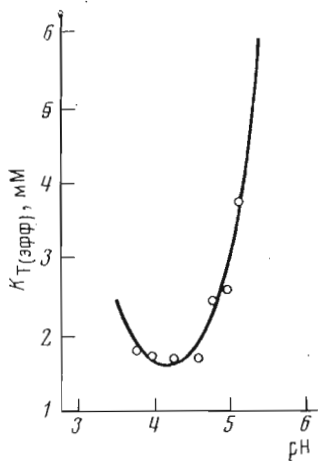


Рис. 3

Рис. 3. pH-Зависимость константы $K_{T(\text{эфф})}$ для субстрата Ас-Phe-Phe-АПМ

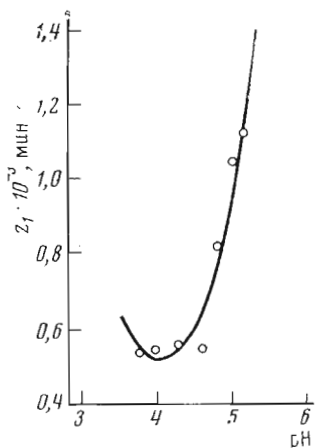


Рис. 4

Рис. 4. pH-Зависимость углового коэффициента z_1 для субстрата Ас-Phe-Phe-АПМ

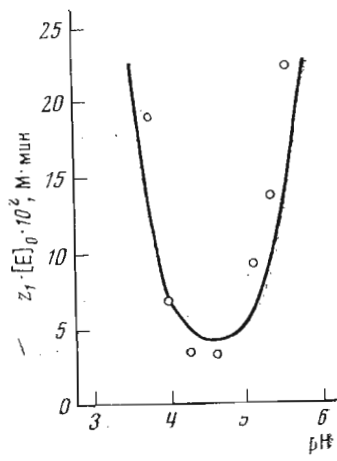


Рис. 5

Рис. 5. pH-Зависимость углового коэффициента z_1 для субстрата Ас-Phe-Tyr-ОН

На рис. 4 изображены экспериментальные точки (табл. 2) и ход теоретической зависимости z_1 от pH по уравнению (7) с найденными значениями констант (см. Приложение):

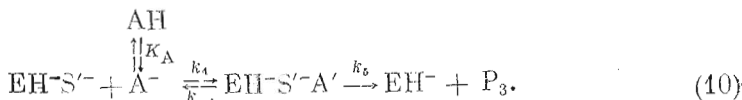
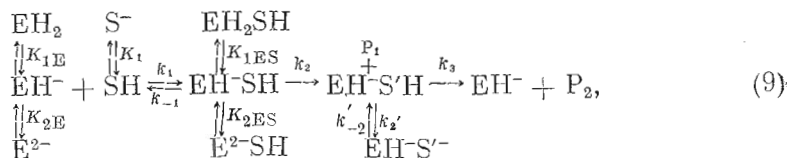
$$K_T \frac{\tilde{k}_3}{\tilde{k}_2} / \tilde{k}_5 (1 + \tilde{K}_m/[S]_0) = 3,24 \cdot 10^{-2} \text{ М} \cdot \text{мин};$$

$$K_A = 50,6 \cdot 10^{-5} \text{ М}; \quad K_{2E} = 1,66 \cdot 10^{-5} \text{ М}.$$

Рассчитанные значения $pK_A = 3,30$ и $pK_{2E} = pK_{2ES} = 4,78$ хорошо совпадают с известными константами ионизации карбоксильной группы акцептора и активного центра пепсина.

Для незащищенного по карбоксильной группе субстрата Ас-Phe-Tyr-ОН в результате проверки нескольких возможных механизмов была предложена схема 2, лучшим образом удовлетворяющая экспериментальные данные. Отличием данной схемы является ионизация субстрата (с константой K_1), а также ионизация аминофермента, который в этом случае содержит остаток субстрата со свободной карбоксильной группой (с константами k'_2 и k'_{-2}), причем с акцептором реагирует ионизованная форма:

Схема 2



С учетом предположения, что $K_{2E} = K_{2ES}$, была выведена следующая зависимость (см. Приложение):

$$z_1 = \tilde{K}_T \frac{\tilde{k}_3}{\tilde{k}_2} / \tilde{k}_5 [E]_0 \cdot \frac{k'_{-2}}{k'_2} \cdot \left(1 + \frac{\tilde{K}_m}{[S]_0}\right) \cdot [H^+] \cdot \left(1 + \frac{[H^+]}{K_A}\right) \cdot \left(1 + \frac{1}{[H^+]} \cdot \frac{\tilde{K}_m \cdot K_1}{[S]_0 + \tilde{K}_m}\right) \cdot \left(1 + \frac{K_{2E}}{[H^+]}\right). \quad (11)$$

Попытки одновременного определения четырех комплексов констант привели к значениям, отличающимся от ожидаемых на порядок. По-видимому, это связано со слишком большим числом переменных при ограниченном числе экспериментальных точек. При фиксировании K_A таким образом, чтобы pK_A равнялось экспериментальному значению 3,4, удалось качественно описать эту зависимость (рис. 5, табл. 2) при следующих значениях остальных констант:

$$\frac{K_T \frac{\tilde{k}_3}{\tilde{k}_2}}{\tilde{k}_5} \cdot \frac{k'_{-2}}{k'_2} (1 + \tilde{K}_m/[S]_0) = 302 \text{ мин};$$

$$\frac{\tilde{K}_m K_1}{[S]_0 + \tilde{K}_m} = 3,23 \cdot 10^{-5} \text{ М};$$

$K_{2E} = 3,23 \cdot 10^{-5} \text{ М}$ ($pK_{2E} = 4,5$). При этом значение $pK_{2E} = 4,5$ достаточно близко к известному из литературы.

Для pH-зависимости z_0 и соответственно k_5 в этом случае вследствие сложности получения математического выражения сделать вывод оказалось затруднительным. Однако экспериментальные данные (табл. 1) свидетельствуют, что, как и в предыдущем случае, k_5 мало изменяется в исследованной области pH.

Механизм, изображенный на схеме 2, является, по нашему мнению, определяющим, но не исключена также возможность параллельных процессов, например участия в реакции с акцептором неионизованной формы аминокфермента ЕН'С'Н. Можно предположить, что для такой реакции константа $K_{T(\text{эфф})}$ примерно на порядок больше, чем для соответствующей реакции (10). Такой вывод напрашивается при сравнении величин $K_{T(\text{эфф})}$ субстрата Ас-Phe-Тур-ОН и субстрата Ас-Phe-Phe-АПМ, образующего неионизирующий аминокфермент, при $pH > 4$ (табл. 1).

Таким образом, схемы 1 и 2 удовлетворительно описывают процесс транспептидации в случае обоих типов субстратов. Данные схемы предполагают, что акцептор участвует в реакции в ионной форме. Это предположение ранее выдвигалось рядом авторов, а теперь получило экспериментальное подтверждение.

Экспериментальная часть

N-карбобензоксип-нитро-*L*-фенилаланин получен способом, описанным в работе [15]. Т. пл. 132—133°; $[\alpha]_D^{20} - 8,5^\circ$ (*c* 1,2; C_2H_5OH).

N-ацетил-*p*-нитро-*L*-фенилаланин получен по методу, охарактеризованному в работе [16]. Т. пл. 168—169°; $[\alpha]_D^{20} - 5^\circ$ (*c* 1; диметилформамид).

N-ацетил-*L*-фенилаланил-*L*-тирозин синтезирован согласно методу, описанному в [17]. Т. пл. 230°; $[\alpha]_D^{20} + 18^\circ$ (*c* 1,2; C_2H_5OH).

γ -Морфолинопропиламид *N*-ацетил-*L*-фенилаланил-*L*-фенилаланина. А. 5 г (0,0167 М) *N*-карбобензоксип-*L*-фенилаланина растворяли в 40 мл абс. тетрагидрофурана, добавляли 2,3 мл (0,0167 моль) триэтиламина и охлаждали до -5° . Прибавляли 1,59 мл (0,0167 моль) этилового эфира хлоругольной кислоты [18] в 16 мл диметилформамида и через 25 мин при -5° раствор 2,44 мл (0,0167 моль) γ -аминопропилморфолина. Смесь перемешивали, постепенно нагревая до комнатной температуры, и оставляли на ночь. Выпавший осадок хлоргидрата триэтиламина отфильтровывали, растворитель отгоняли в вакууме. Полученное масло растворяли в этилацетате и пропускали через колонку с Al_2O_3 . Полученный раствор упаривали в вакууме досуха. Перекристаллизовывали из смеси этилацетат — гексан (1 : 1). Получали γ -морфолинопропиламид *N*-карбобензоксип-*L*-фенилаланина (*Z*-Phe-АПМ) с выходом 77%; т. пл. 110—111°; $[\alpha]_D^{20} + 6,3^\circ$ (*c* 1; C_2H_5OH); R_f 0,65 (Al_2O_3 , этилацетат — гексан, 1 : 1). Найдено, %:

C 67, 94; H 7,57; N 10,00. $C_{24}H_{31}O_4N_3$. Вычислено, %: C 67,74; H 7,34; N 9,88.

Б. 1 г (2,35 ммоль) Z-Phe-АПМ растирали в 1—2 мл ледяной уксусной кислоты и добавляли 2,35 мл насыщенного раствора HBr в ледяной уксусной кислоте. После прекращения выделения CO_2 (30 мин) добавляли 50 мл охлажденного абс. диэтилового эфира, оставляли на 1 ч при 0° , отфильтровывали выпавший осадок, тщательно промывали на фильтре охлажденным эфиром и высушивали в вакууме над КОН. Полученный дибромгидрат γ -морфолинопропиламида L-фенилаланина сразу использовали для следующей стадии.

В. 740 мг (2,47 ммоль) N-карбобензоксип-L-фенилаланина растворяли в 5 мл абс. тетрагидрофурана, добавляли 0,343 мл (2,47 ммоль) триэтиламина, охлаждали до -5° и вносили 0,234 мл (2,47 ммоль) этилового эфира хлоругольной кислоты. Затем перемешивали 15—20 мин при -5° , прибавляли охлажденный до -5° раствор γ -морфолинопропиламида L-фенилаланина (2,35 ммоль, стадия *Б*) в 5 мл абс. диметилформамида с добавленным для снятия бромгидрата 0,635 мл (4,7 ммоль) триэтиламина. Перемешивали реакционную смесь, постепенно нагревая до комнатной температуры. Прохождение пептидного синтеза контролировали по пингидриновой реакции на свободную аминогруппу. Через 5—6 ч отфильтровывали осадок хлоргидрата триэтиламина. Упаривали в вакууме, полученное масло растворяли в смеси этилацетат — этанол (9 : 1) и пропускали через колонку с Al_2O_3 , промывая той же смесью растворителей. Упаривая в вакууме, получали кристаллическое вещество. Перекристаллизовывали из смеси этилацетат — петролейный эфир. Выход γ -морфолинопропиламида N-карбобензоксип-L-фенилаланил-L-фенилаланина (Z-Phe-Phe-АПМ) 61%, т. пл. $192-193^\circ$; $[\alpha]_D^{20} -23,1^\circ$ (*c* 0,68; диметилформамид); R_f 0,5 (Al_2O_3 , этилацетат). *M* 572 (определено масс-спектрометрически); вычислено 572,68. Найдено, %: C 68,33; H 6,97; N 10,01. $C_{33}H_{40}O_5N_4$. Вычислено, %: C 69,21; H 7,04; N 9,78.

Г. 795 мг (1,325 ммоль) дибромгидрата γ -морфолинопропиламида L-фенилаланил-L-фенилаланина, полученного из Z-Phe-Phe-АПМ снятием карбобензоксизащиты по методике *Б*, растворяли в 2 мл абс. диметилформамида. Фильтрат охлаждали до 0° и вносили по каплям раствор 230 мг (1,46 ммоль) N-оксиацетилсукцинимид [19] в 2 мл диметилформамида. При перемешивании реакционную смесь нагревали до комнатной температуры. Продукт реакции постепенно выпадал в осадок. Дополнительную порцию вещества выделяли из фильтрата упариванием досуха и хроматографией на Al_2O_3 в смеси этилацетат — метанол (9 : 1). Перекристаллизовывали из этилацетата. Выход 50%; т. пл. $225-226^\circ$; $[\alpha]_D^{20} -22,2^\circ$ (*c* 0,9; диметилформамид); R_f 0,64 (Al_2O_3 , этилацетат — этанол, 9 : 1). *M* 480 (определено масс-спектрометрически); вычислено 480,59. Найдено, %: C 67,33; H 7,32; N 11,36. $C_{27}H_{36}O_4N_4$. Вычислено, %: C 67,47; H 7,55; N 11,66.

Очищенный препарат пепсина получали ионообменной хроматографией на DEAE-целлюлозе по методу [20] коммерческого препарата свиного пепсина Олайнского завода химреактивов. Активность фермента после очистки в ед./мг белка [21] составляла 2800—3000.

Кинетические измерения. Кинетические константы гидролиза субстратов были определены с помощью 2,4,6-тринитробензолсульфокислоты как реагента на свободную аминогруппу. Этот метод, описанный впервые в работе [22], был затем модифицирован в нашей лаборатории [23] для изучения кинетики пепсинового гидролиза.

Кинетику транспептидации субстратов с акцепторами Z-Phe(NO_2)-ОН и Ac-Phe(NO_2)-ОН изучали спектрофотометрически на спектрофотометре Cary-15. Кювета спектрофотометра (толщиной 0,5—2 см в зависимости от концентрации акцептора) содержала фермент, субстрат и акцептор в 0,1M ацетатном буфере, 37° . Кювета сравнения содержала те же компонен-

ты, за исключением фермента. Как впервые было показано в работе [5], при образовании продукта транспептидации из нехромофорного субстрата (Ac-Phe-Tyr-OH и Ac-Phe-Phe-АПМ) и хромофорсодержащего акцептора (Z-Phe(NO₂)-OH и Ac-Phe(NO₂)-OH) происходит уменьшение оптической плотности, причем Δε₃₂₀ составляет 1000 для всех исследованных нами субстратов в интервале рН 3,7—5,6. Таким образом, происходила запись кинетической кривой образования продукта транспептидации Z-Phe(NO₂)-Tyr-OH, Z-Phe(NO₂)-Phe-АПМ или Ac-Phe(NO₂)-Phe-АПМ, имеющей достаточно протяженный линейный начальный участок для точного определения начальной скорости транспептидации.

В отдельном опыте определяли изменение оптической плотности при λ 320 нм в системе, содержащей акцептор и пепсин. За время опыта (30—40 мин) «бездонорная» транспептидация была пренебрежимо мала.

Расчеты констант гидролиза, а также констант транспептидации проводили по методу двойных обратных величин на ЭВМ «Наири-2», используя метод наименьших квадратов. Расчеты кривых рН-зависимостей с использованием симплексного метода минимизации [14] проводились на ЭВМ ИР-9830А.

ПРИЛОЖЕНИЕ

Вывод математических зависимостей величин z_0 , z_1 и $K_{T(\text{эфф})}$ от рН осуществлялся методом стационарных концентраций с использованием рН-функций Михаэлиса и с пренебрежением ионизацией группы фермента с $pK_{1E} = pK_{1ES} \sim 1$, поскольку эксперимент проводили в интервале рН от 3,7 до 5,6. В результате было получено следующее выражение для обратной величины концентрации комплекса «аминофермент» — акцептор (схема 1):

$$\frac{[E]_0}{[EH^+S^+A^-]} = \tilde{K}_T \frac{\tilde{k}_3}{\tilde{k}_2} \left(1 + \frac{[H^+]}{K_A}\right) \cdot \left[\frac{\tilde{K}_m}{[S]_0} \left(1 + \frac{K_{2E}}{[H^+]}\right) + \left(1 + \frac{K_{2ES}}{[H^+]}\right) + \frac{\tilde{k}_2}{\tilde{k}_3} \right] \cdot \frac{1}{[A]_0} + \frac{\tilde{k}_3}{\tilde{k}_2} \cdot \left[\frac{\tilde{K}_m}{[S]_0} \cdot \left(1 + \frac{K_{2E}}{[H^+]}\right) + \left(1 + \frac{K_{2ES}}{[H^+]}\right) + \frac{\tilde{k}_2}{\tilde{k}_3} \right], \quad (12)$$

где \tilde{k}_T , \tilde{k}_3 , \tilde{k}_2 , \tilde{k}_5 — предельные, рН-независимые значения соответствующих констант, а смысл остальных обозначений ясен из схемы 1.

Разделив обе части этого выражения на $\tilde{k}_5[E]_0$ и приняв $\tilde{k}_2 \ll k_3$ и $K_{2E} = K_{2ES}$, получим

$$1/V_T = z_1 \cdot 1/[A]_0 + z_0, \quad (13)$$

в которой значения z_1 и z_0 соответствуют приведенным в формулах (6) и (7) (см. основной текст).

Сопоставляя формулы (13) и (3), получим

$$K_{T(\text{эфф})} = \frac{z_1/k_5[E]_0}{1 + K_m/[S]_0}, \quad (14)$$

$$k_5 = \frac{1}{z_0[E]_0 - (1/k_2) \cdot (1 + K_m/[S]_0)}. \quad (15)$$

Для стадии гидролиза (4) в схеме 1 имеем

$$k_2 = \frac{\tilde{k}_2}{1 + K_{2ES}/[H^+]}, \quad (16)$$

$$K_m = \tilde{K}_m \frac{1 + K_{2E}/[H^+]}{1 + K_{2ES}/[H^+]}, \quad (17)$$

так как $K_{2E} = K_{2ES}$, то $K_m = \tilde{K}_m$.

Используя значения z_1 и z_0 , а также формулы (14) — (17), получим выражение для $K_{T(\text{эфф})}$, представленное формулой (8).

Подставляя значение z_0 (формула (6)) и значения k_2 и K_m (формулы (16) и (17)) в выражение для k_5 (15), получим, что $k_5 = \tilde{k}_5$, т. е. константа k_5 в схеме 1 не зависит от рН.

Поиск характеризующих реакцию констант, наилучшим образом удовлетворяющих экспериментальные данные, сводился к нахождению минимума функции F —суммы квадратов отклонений экспериментальной величины от ее теоретического значения. Все константы были представлены в виде экспонент, и переменными, по которым велся поиск минимума F , служили их показатели. Это позволило ограничить область поиска положительными величинами констант. Так, формула (7) представлялась в виде

$$z_1 = (1/[E]_0) \exp(p_1) \cdot \left(1 + \frac{[H^+]}{\exp(p_2)}\right) \cdot \left(1 + \frac{\exp(p_3)}{[H^+]}\right), \quad (18)$$

где

$$p_1 = \ln \left[\frac{\tilde{K}_T \tilde{k}_3 / \tilde{k}_2}{\tilde{k}_5} \left(1 + \frac{\tilde{K}_m}{[S]_0}\right) \right], \quad p_2 = \ln K_A \quad \text{и} \quad p_3 = \ln K_{2E},$$

а формула (8) — в виде

$$K_{T(\text{эфф})} = \exp(p_1') \cdot \left(1 + \frac{[H^+]}{\exp(p_2')}\right) \cdot \left(1 + \frac{\exp(p_3')}{[H^+]}\right), \quad (19)$$

где

$$p_1' = \ln (\tilde{K}_T \tilde{k}_3 / \tilde{k}_2), \quad p_2' = p_2 \quad \text{и} \quad p_3' = p_3.$$

Поиск минимума велся по всем переменным p .

Формулу (11) для z_1 (схема 2) получали аналогичным образом, принимая, что $k'_2 / k'_{-2} \approx K_1$ и $\tilde{k}_2 \ll \tilde{k}_3$, и учитывая, что $[S]_0 < K_m$, а $K_{2E} = K_{2ES}$.

Для поиска минимума функции F формула (11) представлялась в виде

$$z_1 = \frac{1}{[E]_0} \exp(p_1'') \cdot [H^+] \cdot \left(1 + \frac{[H^+]}{\exp(p_2'')}\right) \cdot \left(1 + \frac{\exp(p_3'')}{[H^+]}\right) \cdot \left(1 + \frac{\exp(p_4'')}{[H^+]}\right), \quad (20)$$

где

$$p_1'' = \ln \left[\frac{\tilde{K}_T \tilde{k}_3 / \tilde{k}_2}{\tilde{k}_5} \cdot \frac{k'_{-2}}{k_2'} \cdot \left(1 + \frac{\tilde{K}_m}{[S]_0}\right) \right],$$

$$p_2'' = \ln K_A, \quad p_3'' = \ln \left[\frac{\tilde{K}_m K_1}{[S]_0 + \tilde{K}_m} \right] \quad \text{и} \quad p_4'' = \ln K_{2E}.$$

Значения p_1 , p_3 и p_4 были определены при фиксировании p_2 таким образом, чтобы pK_A было равно 3,4.

ЛИТЕРАТУРА

1. Neumann H., Levin Y., Berger A., Katchalski E. (1959) *Biochem. J.*, **73**, 33—41.
2. Fruton J. S., Fujii S., Knappenberger M. H. (1961) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **47**, 759—761.
3. Kitson T. M., Knowles J. R. (1971) *Biochem. J.*, **122**, 249—256.
4. Denburg J. L., Nelson R., Silver M. S. (1968) *J. Amer. Chem. Soc.*, **90**, 479—486.
5. Jackson W. T., Schlamowitz M., Shaw A., Trujillo R. (1965) *Arch. Biochem. and Biophys.*, **131**, 374—385.
6. Silver M. S., Stoddard M. (1972) *Biochemistry*, **11**, 191—200.
7. Antonov V. K., Rumsh L. D., Tikhodeeva A. G. (1974) *FEBS Lett.*, **46**, 29—33.
8. Тиходеева А. Г., Румш Л. Д., Антонов В. К. (1975) *Биоорган. химия*, **1**, 993—994.
9. Clement G. E., Snyder S. L. (1966) *J. Amer. Chem. Soc.*, **88**, 5338—5339.
10. Denburg J. L., Nelson R., Silver M. S. (1968) *J. Amer. Chem. Soc.*, **90**, 479—486.
11. Cornish-Bowden A. J., Knowles J. R. (1969) *Biochem. J.*, **113**, 353—362.
12. Clement G. E., Snyder S. L., Price H., Cartmell R. (1968) *J. Amer. Chem. Soc.*, **90**, 5603—5610.
13. Jackson W. T., Schlamowitz M., Shaw A. (1965) *Biochemistry*, **4**, 1537—1543.

14. Химмельблау Д. (1973) Анализ процессов статистическими методами, с. 396—400, «Мир», М.
15. Inouye K., Fruton J. S. (1967) *Biochemistry*, 6, 1765—1777.
16. Joshida M., Ishii S. (1972) *J. Biochem.*, 71, 185—191.
17. Baker L. E. (1951) *J. Biol. Chem.*, 193, 809—819.
18. Izumiya N., Greenstein J. P. (1954) *Arch. Biochem. and Biophys.*, 52, 203—212.
19. Ovchinnikov Yu. A., Ivanov V. T., Bystrov V. F., Miroshnikov A. I., Shepel E. N., Abdullaev N. D., Efremov E. S., Senyavina L. B. (1970) *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, 39, 217—225.
20. Гинодман Л. М. (1962) в сб. Актуальные вопросы современной биохимии, т. 2, с. 54, Медгиз, М.
21. *Worthington Enzyme Manual*, Worthington Bioch. Corp. (1972) pp. 122—124.
22. Mokrasch L. C. (1967) *Anal. Biochem.*, 18, 64—71.
23. Козлов Л. В., Завада Л. Л. (1975) *Молекулярн. биология*, 9, 735—741.

Поступила в редакцию
12.I.1977

THE KINETICS OF PEPSIN-CATALYZED AMINO-TRANSFER TRANSEPTIDATION: pH-DEPENDENCE

MIKHAILOVA A. G., POZHARSKY S. B., KOSTETSKY P. V.,
RUMSH L. D., ANTONOV V. K.

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

The pH-dependence of the pepsin-catalyzed amino-transfer transeptidation has been studied at pH 3.7-5.6 using N-acetyl-L-phenylalanyl-L-tyrosine (I) and N-acetyl-L-phenylalanyl-L-phenylalanine γ -morpholinopropylamide (II) as substrates and *p*-nitrophenylalanine derivatives as acceptors. It was demonstrated that the observed dependences of the transeptidation kinetic constants are consistent with the schemes which take into account the acceptor ionization in the case of substrate (II), or the acceptor, substrate, and «amino-enzyme» ionizations with (I) as a substrate. The transeptidation rate constant was shown to be pH-independent under experimental conditions.
