

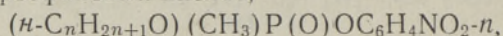
А. ААВИКСААР, М. ПЕЙПС, П. СИКК

# СПЕЦИФИЧНОСТЬ СУБТИЛИЗИНА КАРЛСБЕРГ В РЕАКЦИИ С О-*n*-АЛКИЛ-*n*-НИТРОФЕНИЛ-МЕТИЛФОСФОНАТАМИ

A. AAVIKSAAR, M. PEIPS, P. SIKK. CARLSBERGI SUBTILISIINI SPETSIIFILISUS REAKTSIOONIS O-*n*-ALKÜÜL-*p*-NITROFENÜÜL-METOÜLFOSFONAATIDEGA

A. AAVIKSAAR, M. PEIPS, P. SIKK. SPECIFICITY OF SUBTILISIN CARLSBERG IN THE REACTION WITH O-*n*-ALKYL-*p*-NITROPHENYL METHYLPHOSPHONATES

В одной из публикаций нашей лаборатории совместно с лабораторией химии белка ВНИИ генетики и селекции промышленных микроорганизмов Главмикробиопрома была показана перспективность использования фосфорорганических ингибиторов сериновых эстераз для исследования топографии активных центров бактериальных протеиназ и приведены данные по кинетике взаимодействия ряда *n*-нитрофениловых эфиров О-*n*-алкил-метилфосфоновых кислот,



с субтилизином BPN' [1]. Влияние структуры фосфорильной части ингибиторов на их реакционную способность в фосфорилировании активного центра фермента у соединений с  $n=2-6$  описывалось уравнением  $\lg k_i = (-1,29 \pm 0,15) + (0,68 \pm 0,07)\pi$  ( $r=0,984$ ,  $s=0,112$ ), где  $k_i$  — бимолекулярная константа скорости фосфорилирования и  $\pi$  — константа гидрофобности заместителя  $C_nH_{2n+1}$  [2].

К настоящему времени выяснилось, что субтилизины BPN' и Карлсберг не являются экзопротеазами двух штаммов одного вида *Bacillus subtilis*, как предполагалось ранее, а синтезируются разными видами бацилл: продуцентом субтилизина BPN' оказался *Bacillus amyloliquefaciens*, а субтилизина Карлсберг — *Bacillus licheniformis* [3,4]. Этот факт хорошо согласуется с данными о значительных различиях в первичных структурах этих ферментов [5].

Представляло интерес выяснить, проявляются ли различия в первичных структурах субтилизинов BPN' и Карлсберг в специфичности их действия в реакции с низкомолекулярными субстратами и ингибиторами. В целях получения количественных данных для сравнения двух ферментов нами была изучена кинетика необратимого ингибирования субтилизина Карлсберг под действием серии О-*n*-алкил-*n*-нитрофенил-метилфосфонатов  $(n-C_nH_{2n+1}O)(CH_3)P(O)OC_6H_4NO_2-n$ , где  $n=2-8$ . Методика определения  $k_i$  и условия опытов были такими же, как в [1] в случае субтилизина BPN'. Синтез и очистка фосфорорганических ингибиторов проводились, как описано в [6]. Субтилизин Карлсберг (фирма «Sigma», США) использовался без дополнительной очистки.

Сравнивая бимолекулярные константы ингибирования субтилизина Карлсберг (см. таблицу), можно видеть, что увеличение числа атомов углерода  $n$  в нормальном алкоксильном радикале фосфорильной части ингибиторов от 2 до 6 приводит к 10-кратному увеличению константы скорости фосфорилирования активного центра фермента, что указывает на гидрофобное взаимодействие этого радикала с поверхностью фермента.

На рисунке эти данные, а также аналогичные данные для субтилизина BPN' [1] представлены в виде зависимости  $\lg k_i$  от  $\pi$ -константы



алкильного радикала ингибитора. Как видно, константы скоростей для соединений с  $n=2-5$  в пределах погрешностей измерения совпадают в случае обоих ферментов. Общее корреляционное уравнение, описывающее зависимость  $\lg k_i$  от  $\pi$  для ингибиторов с  $n=2-6$  для субтилизина BPN' и с  $n=2-5$  для субтилизина Карлсберг, имеет вид  $\lg k_i = (-1,27 \pm 0,10) + (0,67 \pm 0,05)\pi$  ( $r=0,979$ ,  $s=0,104$ ). Начиная же с  $n=6$  ( $\pi=3$ ) значения  $\lg k_i$  для субтилизина Карлсберг оказались значительно ниже, чем для субтилизина BPN' — на графике зависимости  $\lg k_i$  от  $\pi$  у первого образуется излом при  $\pi=2,5$  ( $n=5$ ), тогда как у другого — при  $\pi=3$  ( $n=6$ ). Возможно это связано с различной протяженностью гидрофобного участка в активном центре этих ферментов: у субтилизина Карлсберг он короче, чем у BPN'.

Отметим, что и в случае сложноэфирных субстратов различие в топографии активных центров этих протеиназ более четко проявляется при длинных радикалах в боковой части аминокислот. Так, отношение бимолекулярных констант скоростей гидролиза метиловых эфиров N-ацетиламинокислот под действием субтилизинов Карлсберг и BPN' в случае аланина равно 3, а в случае лейцина — 20. Кинетические данные по сравнительному исследованию специфичности действия субтилизинов с использованием представительной серии этих субстратов будут опубликованы нами отдельно.

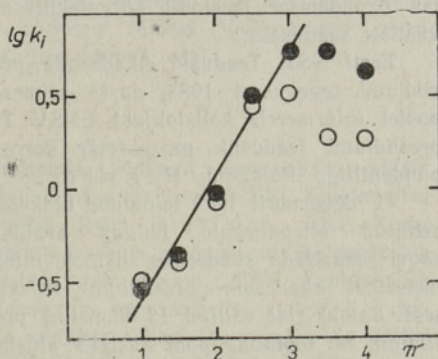
Зависимость  $\lg k_i$  от  $\pi$  для фосфорилирования активных центров субтилизинов под действием О-*n*-алкил-*p*-нитрофенил-метилфосфонатов,  $(n-C_nH_{2n+1}O)(CH_3)P(O)OC_6H_4NO_2-n$ . Темными кружками отмечены  $\lg k_i$  для субтилизина BPN', светлыми — для субтилизина Карлсберг. Условия опытов даны в таблице.

Бимолекулярные константы скорости ингибирования активности субтилизина Карлсберг под действием О-*n*-алкил-*p*-нитрофенил-метилфосфонатов,  $(n-C_nH_{2n+1}O)(CH_3)P(O)OC_6H_4NO_2-n$

$n$	$k_i, M^{-1}c^{-1}$
2	$0,33 \pm 0,07$
3	$0,42 \pm 0,12$
4	$0,95 \pm 0,11$
5	$2,84 \pm 0,32$
6	$3,33 \pm 0,24$
7	$1,92 \pm 0,79$
8	$1,92 \pm 0,38$

Условия опытов:

25 °C; pH 7,6; 0,04 М Na-веронал-HCl-буфер, содержащий  $10^{-3}$  М  $CaCl_2$  и ацетонитрил до 1 об. %.



## ЛИТЕРАТУРА

1. Aaviksaar, A., Peips, M., Sikk, P., Strongin, A. Ya., Markaryan, A. N., Stepanov, V. M. Organophosphorus inhibitors in comparative study of the specificities of bacterial proteinases: subtilisin BPN' and intracellular serine proteinase from *Bacillus amyloliquefaciens*. — QSAR in Pharmac. Chem. Biol., 1984 (в печати).
2. Fujita, T., Iwasa, J., Hansch, C. A new substituent constant,  $\pi$ , derived from partition coefficients. — J. Amer. Chem. Soc., 1964, **86**, 5175—5180.
3. Keay, L., Moser, P. W. Differentiation of alkaline proteases from *Bacillus* species. — Biochem. Biophys. Res. Commun., 1969, **34**, 600—604.
4. Калёбина Т. С., Рыженкова В. В., Кулаева И. С., Руденская Г. Н., Ходова О. М., Честухина Г. Г., Степанов В. М. Внеклеточная сериновая протеиназа *Bacillus brevis* — близкий аналог субтилизина BPN'. — Биоорган. хим., 1983, **9**, 815—823.
5. Markland, F. S., Smith, E. L. Subtilisins: primary structure, chemical and physical properties. — In: Enzymes, New York—London, 1971, 561—608.
6. Osa, A., Arukaeu, H., Aaviksaar, A. Preparative purification of alkyl methylphosphonic acid *p*-nitrophenyl esters on Sephadex LH-20. — J. Chromatogr., 1977, **135**, 196—199.