



УДК 577.152.344.135

НОВЫЙ ХРОМОГЕННЫЙ СУБСТРАТ ПЕПСИНА — *n*-НИТРОАНИЛИД ПИРОГЛУТАМИЛ-АЛАНИЛ-АЛАНИЛ-ФЕНИЛАЛАНИЛ-ЛЕЙЦИНА*Филиппова И. Ю., Лысогорская Е. Н., Оксенойт Е. С.,
Люблинская Л. А., Степанов В. М.**Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова,
химический факультет*

Сочетанием химического и ферментативного методов синтезированы *n*-нитроанилид пироглутамил-аланил-аланил-фенилаланил-лейцина. Заключительная стадия синтеза проводилась с помощью химотрипсина, что позволило получить оптически чистый продукт с высоким выходом. Показано, что соединение является субстратом карбоксильных протеиназ пепсина и аспергиллопепсина А. Для пепсина $K_m = 0,55$ мМ, $k_{кат} = 18,5$ с⁻¹, для аспергиллопепсина А $K_m = 0,66$ мМ, $k_{кат} = 0,326$ с⁻¹. Установлено, что удлинение пептидной цепи субстратов, содержащих остаток пироглутаминовой кислоты, на два остатка аланина не влияет на K_m , но $k_{кат}$ для пепсина возрастает в 1300 раз. Аспергиллопепсин А гидролизует субстрат несколько хуже, чем пепсин.

Синтетические субстраты широко используются для изучения специфичности ферментов, механизма их действия, при их выделении и очистке. Пепсин и другие карбоксильные протеиназы расщепляют в пептидах и белках связи, образованные гидрофобными аминокислотами — фенилаланином, нитрофенилаланином, тирозином, лейцином [1]. Карбоксильные протеиназы широко исследуются в ряде лабораторий, однако активность ферментов, как правило, определяется по белковым субстратам. Синтезировано большое число пептидных субстратов пепсина [2–5], но они не получили широкого применения как из-за сложности синтеза, так и из-за трудности контроля за продуктами гидролиза.

Ранее мы сообщали о синтезе серии *n*-нитроанилидов пироглутамилпептидов — хромогенных субстратов пепсина общей формулы $\langle \text{Glu-P}_1\text{-P}'_1\text{-pNA}$, где P_1 — фенилаланин, нитрофенилаланин, тирозин, P'_1 — лейцин, фенилаланин [6]. *n*-Нитроанилиды пироглутамилпептидов использовались для определения активности пепсина и аспергиллопепсина А двухферментным методом [6]. Карбоксильные протеиназы расщепляли связь $\text{P}_1\text{-P}'_1$. Образовавшийся *n*-нитроанилид фенилаланина или лейцина затем подвергался исчерпывающему гидролизу лейцинаминопептидазой. Реакция сопровождалась выделением *n*-нитроанилина, который определялся спектрофотометрически по поглощению при 410 нм.

Пепсин — фермент с протяженным участком связывания субстратов, поэтому удлинение пептидной цепи субстрата улучшает гидролиз. Лучшими субстратами пепсина в настоящее время являются пиридиловые эфиры или аминокпропилморфолиновые производные защищенных тетрапептидов [2–4].

Для улучшения свойств хромогенных субстратов мы синтезировали пептид $\langle \text{Glu-Ala-Ala-Phe-Leu-pNA}$, отличающийся от описанных ранее вставкой из двух остатков аланина. Синтез проводили, используя сочета-

Принятые сокращения: рNA — *n*-нитроанилид, СМЕС — N-циклогексил-N'-(2-морфолинэтил)карбодиамид-метил-*n*-толуолсульфонат, DMF — диметилформамид. Все аминокислоты L-ряда.

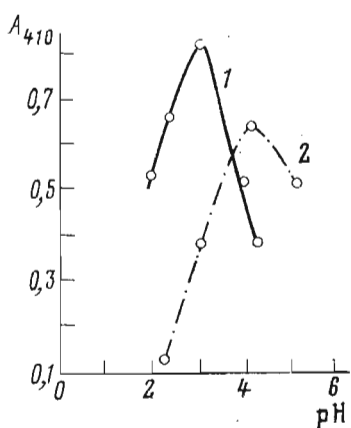


Рис. 1. Зависимость гидролиза субстрата пепсином (1) и аспергиллопепсином А (2) от рН

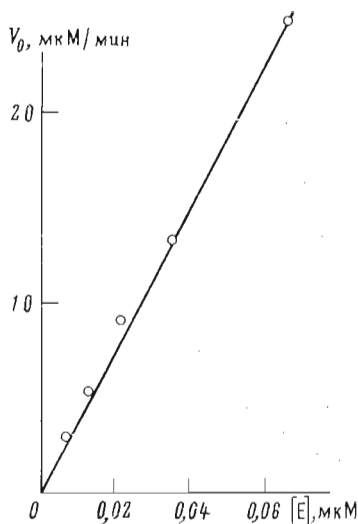
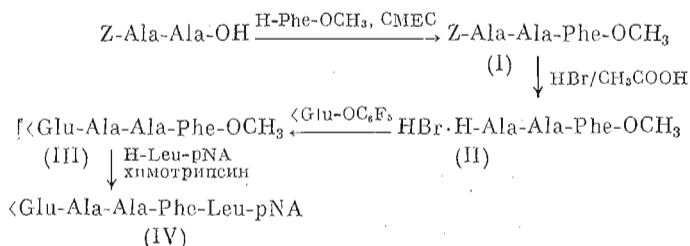


Рис. 2. Зависимость начальных скоростей гидролиза субстрата от концентрации пепсина

дние химического и ферментативного методов, по схеме



Применение химотрипсина в качестве конденсирующего агента на последней стадии синтеза позволило избежать омыления эфира тетрапептида и получить оптически чистый продукт. Одно из преимуществ ферментативного метода состоит в том, что небольшие примеси пироглутаминовой кислоты не влияли на ход ферментативного синтеза. Это позволило использовать в реакции с химотрипсином продукт конденсации (III) без дополнительной очистки.

Пепсин и аспергиллопепсин А расщепляли субстрат при рН 2–5 с образованием <Glu-Ala-Ala-Phe-OH и H-Leu-pNA, причем для пепсина оптимальное значение рН равно 3,0, а для аспергиллопепсина А – 4,0 (рис. 1). Максимальная скорость гидролиза пептидов типа <Glu-P₁-P₁'-pNA этими ферментами наблюдается при рН 4,0. Начальные скорости гидролиза являются линейной функцией концентраций ферментов и подчи-

Кинетические характеристики гидролиза субстрата пепсином и аспергиллопепсином А
20% раствор DMF в 0,1 М ацетатном буфере, рН 4,0, содержащий 0,5 М NaCl

Субстрат, мМ	Фермент [E], мМ	K _m , мМ	k _{кат} , с ⁻¹	k _{кат} /K _m , с ⁻¹ /мМ
<Glu-Ala-Ala-Phe-Leu-pNA, 0,15–1,5	Пепсин, 1,1·10 ⁻⁵	0,55	18,5	31,7
	Аспергиллопепсин, 2,3·10 ⁻⁴	0,66	0,326	0,49
<Glu-Phe-Leu-pNA, 0,05–1,6	Пепсин, 25·10 ⁻³	0,56	0,014	0,025

плются уравнению Михаэлиса — Ментен (рис. 2). Кинетические характеристики приведены в таблице.

Удлинение пептидной цепи субстрата на два остатка аланина не влияет на K_m , однако $k_{кат}$ пепсина возрастает в 1300 раз. При исследовании свойств субстрата оказалось, что снижение концентрации диметилформамида с 20 до 10% увеличивает $k_{кат}$ в 2 раза, не влияя на K_m . Аспергиллопепсин А — карбоксильная протеиназа микроскопического плесневого гриба — имеет близкое значение K_m , однако $k_{кат}$ в 50 раз ниже, чем у пепсина. Подобное явление наблюдалось для протеиназ из микроорганизмов. Так, один из лучших субстратов пепсина Z-Ala-Ala-Phe-Phe-ORpPy [7] только крайне слабо гидролизовался пенициллопепсином и протеиназой из *Asp. oryzae*. По данным Хофмана [8], для грибных протеиназ необходим более протяженный участок пептидной цепи после расщепляемой связи.

Удельные активности (мкмоль субстрата/ОЕ₂₃₀·мин) составили для пепсина 21 200, для аспергиллопепсина А — 224. Для сравнения укажем, что удельные активности по субстрату <Glu-Phe-Leu-pNA составили 3 и 1,7 соответственно.

Экспериментальная часть

Все температуры плавления даны без исправления. Гомогенность полученных соединений контролировали с помощью ТСХ на пластинках марки Silufol (ЧССР) в системах: *n*-бутанол — вода — пиридин — уксусная кислота, 15 : 12 : 10 : 3 (А), хлороформ — метанол, 9 : 1 (Б), этилацетат — пиридин — уксусная кислота — вода, 300 : 108 : 68 : 32 (В), бутанол — уксусная кислота — вода, 200 : 35 : 20 (Г). Оптическое вращение определяли на поляриметре МА-511-О Hilger Watts (Англия). Аминокислотный анализ выполняли на автоматическом анализаторе Durrum D-500 (США) после кислотного гидролиза 5,7 н. соляной кислотой при 105° С (48 ч).

В работе использовали очищенные препараты пепсина свиньи (ЕС 3.4.23.1) и аспергиллопепсина А [9], химотрипсин (ЕС 3.4.21.1), лейцинаминопептидазу микросомную из почек свиньи, тип IV (ЕС 3.4.11.1), тринитробензолсульфокислоту, *n*-нитроанилид лейцина — препараты фирмы Serva (ФРГ).

Z-Ala-Ala-Phe-OCH₃. К 1,2 г (5,56 ммоль) HCl·H-Phe-OCH₃ в 40 мл хлористого метилена добавляли 0,77 мл (5,56 ммоль) абс. триэтиламина, перемешивали 15 мин и прибавляли при 0° С 1,5 г (5,1 ммоль) Z-Ala-Ala-OH и 2,55 г (6 ммоль) СМЕС. Раствор перемешивали 30 мин при 0° С и 48 ч при 22° С и упаривали в вакууме. Масло закристаллизовалось при добавлении этилацетата. Белый кристаллический осадок многократно промывали на фильтре водой, 0,2 н. HCl, 5% NaHCO₃. Сушили над P₂O₅. Выход 2,2 г (95%), т. пл. 150—152° С, $[\alpha]_D^{20}$ -6° (*c* 0,5; DMF), R_f 0,8 (А), 0,71 (Б), 0,83 (В).

HBr·H-Ala-Ala-Phe-OCH₃. К 1 г (2,2 ммоль) Z-Ala-Ala-Phe-OCH₃ прибавляли 6 мл 33% HBr в ледяной уксусной кислоте, перемешивали 1,5 ч, разбавляли абс. эфиром. Кристаллический осадок промывали эфиром и сушили над щелочью. Получено 900 мг (99%), R_f 0,61 (А).

<Glu-Ala-Ala-Phe-OCH₃. К 942 мг (2,4 ммоль) HBr·H-Ala-Ala-Phe-OCH₃ в 5 мл тетрагидрофурана прибавляли 0,33 мл (2,4 ммоль) абс. триэтиламина, перемешивали 20 мин, осадок фильтровали и промывали тетрагидрофураном. Фильтрат концентрировали в вакууме до объема 5 мл и прибавляли к раствору 800 мг (2,7 ммоль) пентафторфенилового эфира пироглутаминовой кислоты [6] в 5 мл тетрагидрофурана. Через 30 с образовался гелеобразный осадок. Его фильтровали, промывали тетрагидрофураном и петролейным эфиром. Выход 645 мг (75%), т. пл. 138—140° С $[\alpha]_D^{20}$ -12° (*c* 1; DMF), R_f 0,63 (А), 0,38 (Б), 0,83 (В), 0,27 (Г). Аминокислотный анализ: Glu 1,0, Ala 1,8, Phe 1,0.

<Glu-Ala-Ala-Phe-Leu-pNA. К раствору 488 мг (1,13 ммоль) <Glu-Ala-Ala-Phe-OCH₃ и 283 мг (1,13 ммоль) H-Leu-pNA в смеси 1,5 мл DMF и 1,44 мл 0,2 М карбонат-бикарбонатного буфера, рН 9,9, прибавляли 3 мг химотрипсина. Через 5 мин образовался обильный осадок, его оставляли на 2 ч при 22° С и на 10 ч при 0° С, фильтровали, промывали 0,5 н. NaHCO₃,

водой, 0,2 н. HCl, водой, сушили над щелочью. Выход 517 мг (71%), т. пл. 250–252° С, $[\alpha]_D^{20}$ –28° (с 1; DMF), R_f 0,73 (A), 0,91 (B), 0,61 (Г). Аминокислотный анализ: Glu 1,06, Ala 2,01, Leu 1,00, Phe 1,04.

Кинетика гидролиза пептида. Измерение начальных скоростей ферментативного гидролиза пептида проводили по реакции с тринитробензолсульфоокислотой. К 2,3 мл 0,1 М ацетатного буфера, содержащего 0,5 М NaCl, прибавляли 0,6 мл раствора субстрата в диметилформамиде, выдерживали 5 мин при 37° С и добавляли 0,1 мл раствора пепсина. Через определенные промежутки времени пробы по 1 мл отбирали в пробирки, содержащие 2 мл 0,1 н. раствора тетрабората натрия, pH 9,0, и прибавляли 50 мкл 0,1 М раствора тринитробензолсульфоокислоты в воде. Через 40 мин растворы спектрофотометрировали на СФ-16 при 420 нм. Для каждой концентрации субстрата делали пять–семь определений. Кинетические параметры гидролиза рассчитывали графическим методом в координатах Эди – Хофсти.

Определение активности двухферментным способом. К 1 мл раствора субстрата (концентрация 1 мг/мл) в 0,1 М ацетатном буфере, содержащем 15% DMF, добавляли 0,1 мл раствора пепсина (концентрация 0,05–0,005 мг/мл) и инкубировали 15 мин при 37° С. Далее добавляли 1 мл трис-HCl-буфера, pH 8,7, и 30 мкл разбавленного в 200 раз коммерческого раствора лейцинаминопептидазы в 0,05 М трис-HCl-буфере, pH 7,6. Через 40 мин спектрофотометрировали при 410 нм.

ЛИТЕРАТУРА

1. Hofmann T. Adv. Chem. Ser., 1974, v. 136, p. 146–185.
2. Sachdev F., Fruton J. S. Biochemistry, 1970, v. 9, № 23, p. 4465–4471.
3. Inouye K., Fruton J. S. Biochemistry, 1966, v. 5, № 12, p. 2473–2479.
4. Дурир С., Дунн В. М. Anal. Biochem., 1983, v. 129, № 2, p. 502–512.
5. Тиходеева А. Г., Зилченко А. А., Румш Л. Д., Антонов В. К. Докл. АН СССР, 1974, т. 214, № 2, с. 355–360.
6. Лысогоorskая Е. Н., Филиппова И. Ю., Войцова С. Е., Оксенойт Е. С., Люблинская Л. А., Степанов В. М. Биоорг. химия, 1983, т. 9, № 4, с. 470–477.
7. Mains G., Takahashi M., Sodek I., Hofmann T. Can. J. Biochem., 1971, v. 49, № 10, p. 1134–1149.
8. Hofmann T., Hodges R. S. Biochem. J., 1982, v. 203, № 3, p. 603–610.
9. Ковалева Г. Г., Юсупова М. П., Баландина Г. Н., Лысогоorskая Е. Н., Степанов В. М. Биохимия, 1977, т. 42, № 3, с. 534–539.

Поступила в редакцию
2.IX.1983.

A NEW CHROMOGENIC PEPSIN SUBSTRATE — PYROGLUTAMYL-ALANYL-ALANYL-PHENYLALANYL-LEUCINE *p*-NITROANILIDE

FILIPPOVA I. Yu., LYSOGORSKAYA E. N., OKSENOIT E. S.,
LUYBLINSKAYA L. A., STEPANOV V. M.

Chemistry Department, M. V. Lomonosov State University, Moscow

Pyroglutamyl-alanyl-alanyl-phenylalanyl-leucine *p*-nitroanilide was obtained by combination of chemical and enzymatic methods of peptide synthesis. Chymotrypsin was used at the last stage of the synthesis, that allowed to obtain the optically homogeneous product with the high yield. The compound appeared to be a good substrate for aspartic proteinases pepsin and aspergillopepsin A. For pepsin $K_m=0,55$ mM, $k_{cat}=18,5$ s⁻¹ and for aspergillopepsin A $K_m=0,66$ mM, $k_{cat}=0,326$ s⁻¹. The pH-optimum for hydrolysis is 3,0 for pepsin and 4,0 for aspergillopepsin A. It was found that lengthening of the substrate peptide chain by two alanine residues does not influence K_m , but increases k_{cat} 1300-fold for pepsin. Aspergillopepsin hydrolyses the substrate somewhat slower than pepsin.