



УДК 577.157.2

О СТЕРЕОСПЕЦИФИЧНОСТИ УРОКИНАЗЫ

Христова Е. И., Петков Д. Д.

Институт органической химии Болгарской Академии наук, София

Были синтезированы N^{α} -ацетил- и N^{α} - ϵ -аминокапроил-*L*- и *D*-лизины и соответствующие амиды, которые являются конкурентными ингибиторами реакции гидролиза *n*-нитроанилида N^{α} -ацетил-*L*-лизина урокиназой. Показано, что стабильность фермент-ингибиторного комплекса зависит от структуры α -ациламиногруппы, карбоксильной группы и от конфигурации α -углеродного атома ингибитора; показана строгая стереоспецифичность урокиназы в реакции гидролиза *n*-нитроанилидов. На основе результатов ингибиторного анализа и результатов гидролиза метилового эфира N^{α} - ϵ -ампиокапроил-*L*-лизина сделан вывод о существовании непродуктивного связывания между ферментом и субстратом. Кроме того, на примере гидролиза метилового эфира ϵ -аминокапроновой кислоты показано, что реакция гидролиза определяется наличием α -ациламиногруппы в субстрате.

Активирование человеческого плазминогена до плазима (КФ 3.4.21.7) урокиназой (КФ 3.4.99.26) происходит путем расщепления связи между остатками аргинина и валина [1—4]. Для моделирования этой связи мы синтезировали низкомолекулярные субстраты — анилиды N^{α} -ацетил-*L*-лизина с различными заместителями в *n*-положении [5, 6]. Производные основных аминокислот лизина и аргинина являются субстратами как для трипсина, так и для урокиназы. Поэтому можно было предположить, что урокиназа — это трипсиноподобная протеаза, которая, как и трипсин, участвует в специфических ионных взаимодействиях в ходе реакции гидролиза [6, 7]. Это дает нам основания интерпретировать результаты исследований, исходя из гипотезы о существовании трех участков, в которых происходит связывание при образовании фермент-субстратного или фермент-ингибиторного комплекса. Эта гипотеза была выдвинута впервые Ниманном [8] для объяснения механизма ингибирования α -химотрипсина фрагментами его субстратов. Мураматы и сотр. [9] применили ее при исследовании механизма гидролиза синтетических и природных субстратов трипсином. По терминологии Ниманна, которой мы в дальнейшем будем пользоваться, α -ацетиламинная, боковая и сложноэфирная (или амидная) группы субстрата или ингибитора R_1 , R_2 , R_3 при правильном, продуктивном способе связывания соответствуют комплементарным участкам фермента ρ_1 , ρ_2 и ρ_3 .

На основании результатов, полученных при изучении гидролиза производных лизина и аргинина под действием трипсина в присутствии различных конкурентных ингибиторов — производных ϵ -аминокапроновой кислоты, было показано [9], что связывание фермента с субстратом в участках ρ_2 и ρ_3 приводит к образованию фермент-субстратного или фермент-ингибиторного комплекса, в то время как связывание в участке ρ_1 существенно для проведения реакции гидролиза.

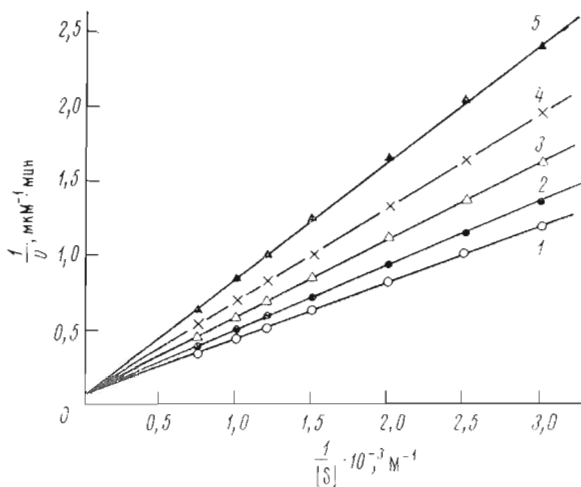


Рис. 1. Зависимость скорости гидролиза *n*-нитроанилида N^{α} -ацетил-*L*-лизина ($0,3 - 1,3 \cdot 10^{-3}$ М) урокиназой (330 ед. акт.) от концентрации субстрата; без ингибитора (1), в присутствии Ac-*L*-Lys-OH (2), Ac-*L*-Lys-NH₂ (3), εAhx-*L*-Lys-NH₂ (4), εAhx-*L*-Lys-OH (5)

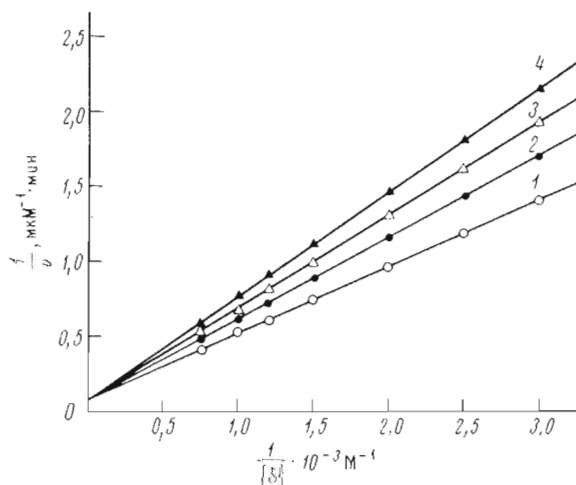


Рис. 2. Зависимость скорости гидролиза *n*-нитроанилида N^{α} -ацетил-*L*-лизина (условия см. рис. 1) без ингибитора (1), в присутствии Ac-*D*-Lys-NH₂ (2), Ac-*D*-Lys-NHPhNO₂ (3), εAhx-*D*-Lys-NH₂ (4)

В связи с этим нам представлялось интересным изучить реакцию гидролиза *n*-нитроанилида N^{α} -ацетил-*L*-лизина урокиназой в присутствии ингибиторов — производных *L*- и *D*-лизина. N^{α} -ацетил- и N^{ϵ} -ε-аминокапроил-*L*- и *D*-лизина и соответствующие амиды — конкурентные ингибиторы реакции гидролиза, что видно из рис. 1 и 2. Сравнивая значения константы ингибирования K_i при различных заместителях у α-аминогруппы и карбоксильной группы *L*- и *D*-лизина, можно сделать некоторые предположения о строении активного центра урокиназы и ее стереоспецифичности. Изучая реакцию гидролиза *n*-нитроанилида N^{α} -ацетил-*L*-лизина урокиназой, мы показали, что при замене в ингибиторе ацетильной группы на ε-аминокапроильную, т. е. при переходе от N^{α} -ацетил-*L*-лизина к N^{ϵ} -ε-аминокапроил-*L*-лизину K_i уменьшается на два порядка (табл. 1).

Константы ингибирования конкурентных ингибиторов гидролиза *n*-нитроанилида N^α -ацетил-*L*-лизина урокиназой

Ингибитор		$K_i \cdot 10^3, M$	Ингибитор		$K_i \cdot 10^3, M$
<i>L</i>	Ac-Lys-OH	305 ± 8,50	<i>D</i>	Ac-Lys-NH ₂	71,6 ± 6,60
	Ac-Lys-NH ₂	115 ± 7,40		Ac-Lys-NHPhNO ₂ **	48,0 ± 8,26
	ϵ Ahx-Lys-OH *	2,53 ± 0,51		ϵ Ahx-Lys-NH ₂	7,0 ± 0,50
	ϵ Alx-Lys-NH ₂	13,6 ± 0,70		ϵ Ahx-OH	15,0 ± 1,0 [5]
			ϵ Alx-OMe	2,28 ± 0,80	

* ϵ Ahx — ϵ -аминокапроил.** -NHPhNO₂ — остаток *n*-нитроанилина.

Эта большая разница в значениях K_i дает нам основание предположить, что в случае N^α - ϵ -аминокапроил-*L*-лизина осуществляются дополнительные взаимодействия между ϵ -аминогруппой аминоацильного остатка ингибитора и ферментом, что понижает свободную энергию фермент-ингибиторного комплекса и его константу диссоциации. Полученные результаты подтверждают ионный характер связывания $R_1 - \rho_1$ и согласуются с данными Фуджи и сотр. [10] о зависимости между строением N^α -ацетиламиногруппы субстрата и его сродством к ферменту. Авторы работы [10] установили, что антифибринолитическая активность N^α -(ω -аминоацил)-*L*-лизинув увеличивается с увеличением размеров ω -аминоацильной группы. Аналогичную зависимость мы наблюдали и при сравнении K_i соответствующих амидов: K_i для амида N^α - ϵ -аминокапроил-*L*-лизина на порядок меньше, чем K_i для амида N^α -ацетил-*L*-лизина (табл. 1).

Изменения конфигурации α -углеродного атома ингибитора не сказываются на характере дополнительных взаимодействий, что видно из полученных значений K_i для амидов N^α -ацетил- и N^α - ϵ -аминокапроил-*D*-лизина, которые, как и в случае *L*-изомера, отличаются на порядок при переходе от ацетильного к ϵ -аминокапроильному производному.

Изменения в структуре участка R_3 ингибитора тоже приводят к изменению стабильности фермент-ингибиторного комплекса. При переходе от карбоксильной к амидной группе в N^α -ацетил-*L*-лизине K_i уменьшается 2,5 раза (табл. 1). Превращение ϵ -аминокапроновой кислоты в ее метиловый эфир приводит к уменьшению K_i в 7 раз. Полученные нами результаты согласуются с данными Ниманна [8] о сравнительной стабильности фермент-ингибиторных комплексов, образуемых α -химотрипсином с *N*-ацетил-*L*-триптофаном или соответствующим амидом. Все это позволяет нам заключить, что уменьшение полярности участка R_3 повышает его сродство к ферменту. Обратная зависимость наблюдается при сравнении K_i для N^α - ϵ -аминокапроил-*L*-лизина и соответствующего амида (табл. 1). N^α - ϵ -Аминокапроил-*L*-лизин образует с ферментом стабильный фермент-ингибиторный комплекс при помощи связывания в участках ρ_1 и ρ_2 фермента и дополнительных взаимодействий, осуществляемых ϵ -аминогруппой аминоацильного остатка. Замена карбоксильной группы на амидную приводит к связыванию типа $R_3\rho_3$ и деформации фермент-ингибиторного комплекса, что в свою очередь повышает его свободную энергию и константу диссоциации. Этот результат согласуется с имеющимися в литературе данными о том, что ацетилтриптами ($R_3 = H$) лучше ингибирует α -химотрипсин, чем амид ацетил-*L*-триптофана [8].

В условиях гидролиза *n*-нитроанилида N^α -ацетил-*L*-лизина соответствующие производные *D*-лизина остаются стабильными. Этот результат доказывает строгую стереоспецифичность урокиназы в процессе гидролиза

n-нитроанилидов. Если сравнить константы ингибирования амидов N^α-ацетил-*L*- и *D*-лизина и амидов N^α-ε-аминокапроил-*L*- и *D*-лизина (табл. 1), то становится ясным, что производные *D*-лизина являются лучшими ингибиторами по сравнению с соответствующими производными *L*-лизина. Это дает нам основание предположить, что при образовании фермент-ингибиторного комплекса урокиназы с производными *D*-лизина осуществляются дополнительные взаимодействия между ферментом и α-углеродным атомом лизина. Подобные взгляды были ранее высказаны при рассмотрении стереоспецифичности трипсина и α-химотрипсина [14—15].

Далее, чтобы установить зависимость между стабильностью фермент-субстратного комплекса и его реакционной способностью, мы изучили гидролиз метилового эфира N^α-ε-аминокапроил-*L*-лизина и метилового эфира

Таблица 2

Кинетические константы реакции гидролиза метиловых эфиров N^α-ацетил- и N^α-ε-аминокапроил-*L*-лизинов

Производные ε-хлоргидратов лизина	$K_m \cdot 10^3$, М	$k_{кат}$, С ⁻¹
Ac- <i>L</i> -Lys-OMe	8,4 ± 1,4	10,01 ± 1,25
εAhx- <i>L</i> -Lys-OMe	1,35 ± 0,50	1,48 ± 0,30

ε-аминокапроновой кислоты. Полученные значения $k_{кат}$ реакции гидролиза метилового эфира N^α-ε-аминокапроил-*L*-лизина (табл. 2) показывают, что он гидролизуется с меньшей скоростью, чем метиловый эфир N^α-ацетил-*L*-лизина [16]. С другой стороны, данные ингибиторного анализа показывают, что в участке ρ₁ фермента N^α-ε-аминокапроильные производные *L*-лизина связываются лучше, чем соответствующие N^α-ацетильные производные. Эти результаты не подчиняются правилу, выдвинутому Ноулсом [17], — «лучшее связывание — лучшая реакция», — и позволяют нам сделать вывод, что между метиловым эфиром N^α-ε-аминокапроил-*L*-лизина и урокиназой осуществляется непродуктивное связывание. Так как ε-аминокапроильная группа (R₁) и боковая цепь лизина (R₂) имеют одинаковую структуру, они конкурируют в связывании участком ρ₁ фермента, что должно привести к непродуктивному фермент-субстратному комплексу. Несмотря на то что непродуктивное связывание типа R₁—ρ₂ и R₂—ρ₁ выражается в уменьшении $k_{кат}$ и K_m (табл. 2), отношение $k_{кат}/K_m$, как известно, в обоих случаях равно k_2/K_s [18] и не меняется при переходе от продуктивного к непродуктивному связыванию. Подобный результат мы получили, изучая гидролиз метилового эфира ε-аминокапроновой кислоты урокиназой. Значение K_i (табл. 1) для этого ингибитора показывает, что в этом случае образуется стабильный фермент-ингибиторный комплекс при связывании алкиламиногруппы R₂ и эфирной группы R₃ ингибитора с соответствующими участками фермента ρ₂ и ρ₃, однако известно, что метиловый эфир ε-аминокапроновой кислоты не гидролизуется урокиназой. Этот результат подтверждается также данными Мураматы и соотр. [9] о том, что в процессе образования фермент-субстратного комплекса происходит связывание типа R₂—ρ₂ и R₃—ρ₃, а реакция гидролиза имеет место только после связывания α-ациламиногруппы субстрата R₁ с участком ρ₁ фермента. В метиловом эфире ε-аминокапроновой кислоты ε-ациламиногруппа отсутствует и поэтому не происходит связывание в участке ρ₁ фермента и последующий гидролиз субстрата.

Экспериментальная часть

n-Нитроанилиды N^α-ацетил-*L*- и *D*-лизинов были синтезированы из N^ε-бензилоксикарбонил-*L*- и *D*-лизинов в две стадии, как было предложено нами ранее [5]. Ацетилирование N^ε-бензилоксикарбонил-*L*-лизина

проводили по методу Ирвинга и Гутмана [19], а N^α -(N -бензилоксикарбонил- ϵ -аминокапроил)- N^ϵ -бензилоксикарбонил- L -лизин получали по методу смешанных ангидридов из N -бензилоксикарбонил- ϵ -аминокапроновой кислоты и метилового эфира N^ϵ -бензилоксикарбонил- L -лизина и последующим гидролизом сложного эфира [20]. Метилловые эфиры L - и D -лизина были получены из соответствующих кислот реакцией с диазометаном, а амиды — путем аммонолиза соответствующих эфиров [5]. Хлоргидраты и бромгидраты субстратов и ингибиторов получали из соответствующих бензилоксикарбонильных производных по методу Бен-Изаи и Бергера [21] или каталитическим гидрогенолизом [19]. Метилловый эфир ϵ -аминокапроновой кислоты в виде хлоргидрата получали по методу Гармайзе и Швар-

Таблица 3

Физико-химические константы синтезированных соединений

Вещество	Брутто-формула	Т. пл., °С	$[\alpha]_D^{18-20}$, град (с 0,4 в метаноле)
Ac- L -Lys *	$C_{10}H_{25}O_5N_2$	243—245	+10,57 **
Ac- L -Lys-NH ₂	$C_8H_{15}O_2N_3Cl$	67—69	—5,30
ϵ Ahx- L -Lys	$C_{12}H_{27}O_3N_3Cl_2$	140—145	—6,13
ϵ Ahx- L -Lys-NH ₂	$C_{12}H_{28}O_2N_3Cl_2$	136—140	—3,70
ϵ Ahx- L -Lys-OMe	$C_{13}H_{29}O_3N_3Cl_2$	110—112	—12,10
Ac- D -Lys-NH ₂	$C_8H_{15}O_2N_3Cl$	85—89	+4,70
Ac- D -Lys-NHPhNO ₂	$C_{14}H_{23}O_5N_4Br$	115—118	+19,20
ϵ Ahx- D -Lys-NH ₂	$C_{12}H_{28}O_2N_4Cl_2$	120—125	+4,85

* В виде ацетата.

** В воде.

ца [22] из ϵ -капролактама. Чистота всех синтезированных соединений была доказана элементным анализом. Физико-химические константы полученных веществ представлены в табл. 3.

Урокиназа. В процессе работы применяли препараты урокиназы человека, полученные в нашей лаборатории [5], с амидазной активностью от 1000 до 1500 ед./мг белка. Амидазную активность растворов урокиназы в 0,5 М NaCl определяли по методу, описанному в работе [5]. Титрование активных центров урокиназы проводили при помощи n' -нитробензил- n -гуанидидлбензоата [6].

Методы исследования. Ферментолиз проводили при термостатировании ($37 \pm 0,1^\circ$) в спектрофотометре VSU-2-P (Carl Zeiss, Йена, ГДР), в трис (0,06M)-NaCl (0,09M)-буфере pH 8,5. Скорость реакции гидролиза n -нитроанилида N^α -ацетил- L -лизина в присутствии и в отсутствие ингибитора определяли по количеству выделенного n -нитроанилина, измеряемому в свою очередь по увеличению адсорбции при 400 нм. Концентрация раствора субстрата была равна или меньше K_m , а концентрация раствора ингибитора соответствовала количеству ингибитора, которое приводит к 25%-ному ингибированию реакции. Начальная скорость реакции в присутствии и в отсутствие ингибитора была определена при различных концентрациях субстрата и представлена в координатах Лайнуивера и Бэрка (рис. 1 и 2), а K_m , $k_{кат}$ и K_i были определены методом наименьших квадратов. Значения константы ингибирования K_i представлены в табл. 1.

Реакцию гидролиза урокиназой метилового эфира N^α - ϵ -аминокапроил- L -лизина проводили в термостатированной кювете pH-стага (pH 7,6) «Radiometer» (Дания) при температуре $37 \pm 0,1^\circ$. К раствору субстрата

соответствующей концентрации добавляли раствор урокиназы с концентрацией $6,25 \cdot 10^{-6}$ М и выделяющуюся кислоту титровали $4,6 \cdot 10^{-3}$ М КОН. Начальная скорость реакции, соответствующая 2%-ному превращению, была представлена в координатах Лайнуивера и Бэрка, а K_m и $k_{кат}$ были определены методом наименьших квадратов. Эти результаты вместе с результатами, полученными при гидролизе метилового эфира N^{α} -ацетил-*L*-лизина [16], представлены в табл. 2.

ЛИТЕРАТУРА

1. Duckert F. (1968) *Enzymes in Urine and Kidney* (Verlag H. H., ed.), p. 237—259, Bern — Stuttgart.
2. Robbins K., Summaria L., Hsieh B., Shan R. (1967) *J. Biol. Chem.*, **242**, 2333—2342.
3. Walter P., Steiman H., McKee P. (1974) *J. Biol. Chem.*, **249**, 1173—1181.
4. Sodetz J., Brockway W., Mann K., Castellino F. (1974) *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, **60**, 729—736.
5. Petkov D., Christova E., Karadjova M. (1973) *Trombos. Diath. Haemor.*, **29**, 276—285.
6. Petkov D., Christova E., Pojarliev I., Stambolieva N. (1975). *Eur. J. Biochem.*, **51**, 25—32.
7. Petkov D., Stambolieva N. (1974) *Communs Dept. Bulg. Acad. Sci.*, **7**, 711—716.
8. Huang H., Niemann C. (1952) *J. Amer. Chem. Soc.*, **74**, 101—105.
9. Muramatu M., Onichi T., Makino S., Hayakumo J., Fujii S. (1965) *J. Biochem.*, **58**, 214—218; (1967) *ibid.*, **62**, 408—418; (1969) *ibid.*, **65**, 17—26.
10. Fujii A., Tanaka K., Cook E. (1972) *J. Med. Chem.*, **15**, 378—380.
11. Fields P. Stein L., Zirin M. (1969) *J. Amer. Chem. Soc.*, **84**, 4163—4164.
12. Cohen S., Weinstein S. (1964) *J. Amer. Chem. Soc.*, **86**, 725—728, 5326—5330.
13. Purdie J., Demayo R., Seely J., Benoiton L. (1972) *Biochim. et biophys. acta*, **268**, 523—526.
14. Huang H., Niemann C. (1952) *J. Amer. Chem. Soc.*, **74**, 4634—4638.
15. Hein C., Niemann C. (1962) *J. Amer. Chem. Soc.*, **84**, 4487—4494.
16. Petkov D., Stoineva I. (1974) *Biochim. et biophys. acta*, **370**, 546—555.
17. Knowles J. (1965) *J. Theor. Biol.*, **9**, 213—215.
18. Березин И., Казанская Н., Клесов А. (1971) *Биохимия*, **36**, 227—235.
19. Irwing C., Gutman H. (1959) *J. Org. Chem.*, **24**, 1979—1983.
20. Walton P. (1967) *Biochim. et biophys. acta*, **132**, 104—114.
21. Ben-Ishai D., Berger A. (1952) *J. Org. Chem.*, **17**, 1564—1568.
22. Garmaise D., Schwartz R., McKay A. (1958) *J. Amer. Chem. Soc.*, **80**, 3332—3334.

Поступила в редакцию
23.VII.1975

ON THE STEREOSPECIFICITY OF UROKINASE

CHRISTOVA E. I., PETKOV D. D.

*Institute of Organic Chemistry, Bulgarian Academy
of Sciences, Sofia*

N^{α} -Acetyl- and N^{α} - ϵ -aminocaproyl-*L*- and *D*-lysines and their amides, which are competitive inhibitors of the urokinase catalyzed hydrolysis of N^{α} -acetyl-*L*-lysine *p*-nitroanilide, were synthesized. The value of K_i decreases by 1—2 orders of magnitude on passing from N^{α} -acetyl to N^{α} - ϵ -aminocaproyl derivatives of *L*- and *D*-lysine, thus indicating an additional enzyme-inhibitor interaction increasing the stability of the complex. To investigate the relationship between the enzyme-substrate complex stability and reactivity, the hydrolysis of N^{α} - ϵ -aminocaproyl-*L*-lysine and ϵ -aminocaproic acid methyl esters was studied. The results obtained revealed nonproductive binding between the enzyme and N^{α} - ϵ -aminocaproyl-*L*-lysine methyl ester and provided evidence for a crucial role of substrate α -acylamino group in the hydrolysis. It was also observed that urokinase displayed strong stereospecificity in the hydrolysis of *p*-nitroanilides.