



УДК 577.156.2.02

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ДЕЙСТВИЕ ПАНКРЕАТИЧЕСКОЙ ЭЛАСТАЗЫ  
И ЭЛАСТОЛИТИЧЕСКОГО ФЕРМЕНТА  
ИЗ *ACTINOMYCES RIMOSUS* НА НЕКОТОРЫЕ  
ОЛИГО- И ПОЛИПЕПТИДЫ

Раджабов Л. Р., Рассулин Ю. А., Марьян Л. И.,  
Шибнев В. А.

Институт молекулярной биологии, Институт органической химии  
им. П. Д. Зелинского Академии наук СССР, Москва

Изучено сравнительное гидролитическое действие панкреатической эластазы и эластолитического фермента *Act. rimosus* на некоторые олиго- и полипептиды, содержащие глицин, пролин, аланин, лизин и аргинин. Показано, что оба фермента по своей гидролитической специфичности имеют большое сходство. Однако аргининсодержащие полипептиды полностью ингибировали эластолитическую активность фермента *Act. rimosus* и оказывали менее заметное действие на эластолитическую активность панкреатической эластазы.

Ранее мы сообщали о выделении из культуры микроорганизма *Actinomyces rimosus* гомогенного эластолитического фермента, активность которого в 2 раза выше, чем у панкреатической эластазы [1]. Известно, что последняя расщепляет преимущественно пептидные связи, образованные алифатическими аминокислотами [2]. Так, в В-цепи инсулина расщепляется пептидная связь между  $-Ala^{14}-Leu^{15}-$ , в цепи А в двух местах: между  $-Ala^8-Ser^9-$  и  $Ser^{12}-Leu^{13}$  [3]. В S-пептиде рибонуклеазы расщепляется связь  $-Ala^6-Lys^7-$  [4]. В связи с этим было интересно выяснить, обладает ли эластаза из *Actinomyces rimosus* аналогичной или близкой специфичностью, несмотря на большое филогенетическое различие источников их получения. Для этого мы использовали два типа субстратов. Первый включает полипептиды регулярного строения с остатками аланина, лейцина и аргинина (см. таблицу, соединения (1) — (15)). Вторым несколько необычен для эластаз: наряду с остатками аланина, глицина содержит и пролин (см. таблицу, соединения (16) — (20)). Из данных таблицы следует, что обе эластазы гидролизуют соединения, в которых чередуются фрагменты  $-Ala-Ala-$  (1) — (3), а также  $Lys-Lys-Ala-$  (4). Аналогичное наблюдается и в отношении соединений (16) — (18), т. е. олигопептидов, содержащих остатки пролина. Остальные соединения не гидролизуются, за исключением соединения (19), которое имеет остаток D-аланина и может гидролизываться только панкреатической эластазой. Следует отметить и соединение (5), которое не гидролизуется обеими эластазами, хотя в нем имеется трипептидный фрагмент  $-Ala-Ala-Ala-$ . Известно, что  $Ac-Ala-Ala-Ala-OCH_3$  является одним из лучших субстратов для панкреатической эластазы [5]. Также представлялось интересным найти среди

Сравнительное действие эластаз на олиго- и полипептиды  
 «+» — фермент гидролизует субстрат, «—» — фермент не гидролизует субстрат

Полипептиды	Эластаза <i>Actinomyces rimosus</i>		Эластаза панкреатическая	
	гидролиз	остаточная активность, %	гидролиз	остаточная активность, %
(1) H-(Lys-Ala-Ala) <sub>21</sub> -NH <sub>2</sub>	+	95	+	75
(2) H-(Lys <sub>2</sub> -Ala <sub>2</sub> ) <sub>10</sub> -NH <sub>2</sub>	+	86	+	70
(3) H-(Orn <sub>2</sub> -Ala <sub>2</sub> ) <sub>12</sub> -NH <sub>2</sub>	+	90	+	72
(4) H-(Lys <sub>2</sub> -Ala) <sub>12</sub> -NH <sub>2</sub>	+	85	+	100
(5) H-(Ala <sub>3</sub> -Lys) <sub>4</sub> -OH	—	90	—	88
(6) H-(Lys <sub>3</sub> -Ala) <sub>17</sub> -NH <sub>2</sub>	—	60	—	75
(7) H-(Lys <sub>2</sub> -Gly <sub>2</sub> ) <sub>10</sub> -OH	—	80	—	82
(8) H-(Lys-Arg-Ala) <sub>26</sub> -NH <sub>2</sub>	—	0	—	95
(9) H-(Lys-Arg-Gly) <sub>25</sub> -NH <sub>2</sub>	—	0	—	75
(10) H-(Arg-Arg-Gly) <sub>17</sub> -NH <sub>2</sub>	—	0	—	64
(11) H-(Arg-Arg-Ala) <sub>18</sub> -NH <sub>2</sub>	—	0	—	80
(12) H-(Gly-Ala-Arg) <sub>27</sub> -NH <sub>2</sub>	—	40	—	76
(13) Протамин	—	40	—	35
(14) Суммарная фракция гистонов	—	86	—	85
(15) H-Lys <sub>8</sub> -NH <sub>2</sub>	—	30	—	20
(16) Z-Gly-Pro-Glu-Gly-Pro-Gly-OCH <sub>3</sub>	+		+	
(17) Z-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Ala-OCH <sub>3</sub>	+		+	
(18) Z-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Ala-OCH <sub>3</sub>	+		+	
(19) Z-Ala-Gly-Pro-D-Ala-OCH <sub>3</sub>	—		+	
(20) Z-Gly-Pro-Tyr-Gly-Pro-Gly-OCH <sub>3</sub>	—		—	

указанных в таблице соединений ингибиторы. Было обнаружено, что эластаза из *Actinomyces rimosus* полностью ингибировалась политрипептидами, содержащими остаток аргинина, исключением являлось соединение (12). В то же время эти полипептиды (8) — (11) ингибируют панкреатическую эластазу так, что остаточная активность фермента колеблется от 95 до 64%. Ингибирующий эффект соединений, включающих остатки лизина, орнитина, аланина и глицина (1) — (3), (5) — (7), в отношении обеих эластаз сравнительно небольшой, и остаточная активность составляет ~70—80%. Это указывает, что данные субстраты не позволяют обнаружить существенных различий между обоими эластазами. В то же время соединение (4) не оказывает ингибирующего действия на панкреатическую эластазу. Поскольку лизин- и аргининсодержащие пептиды отчасти похожи на гистоны и протамины, в качестве возможных ингибиторов мы исследовали также эти белки. Было найдено, что ни суммарная фракция гистонов, ни протамин не гидролизуются обоими ферментами, а наибольший ингибирующий эффект отмечен для протамин с *M* 5000 (13) и октализина (15). То, что аргининсодержащие полипептиды проявляют более сильное ингибирующее действие, возможно, связано с их высокой основностью. Некоторое представление о характере ингибирования в зависимости от концентрации пептидов дают рис. 1 и 2 соответственно для эластазы из *Actinomyces rimosus* и панкреатической. В заключение следует отметить, что обе эластазы не способны расщеплять олигомеры Z-(Gly-Pro-Pro)<sub>n</sub>-OCH<sub>3</sub> (*n* = 1—6), являющиеся наилучшими субстратами для коллагеназ [6]. Это еще раз подчеркивает существенную роль остатков аланина в субстратах эластаз.

## Экспериментальная часть

Эластаза *Actinomyces rimosus* выделена по методу [1] с удельной активностью 180 ед/мг белка. Панкреатическая эластаза получена из препарата фирмы «Koch-Light» (Англия), дважды перекристаллизована и дополнительно очищена на DEAE-целлюлозе и сефадексе G-75. Препарат был гомогенен по данным диск-электрофореза при pH 4,3 и 8,3. Его удельная активность составляла 80 ед/мг белка. Эластолитическую активность определяли по гидролизу эластина, полученного из вьюной связки крупного рогатого скота, который был окрашен красителем Remazol Brilliant Blue (RBB) фирмы «Hoechst» (ФРГ) и который, согласно варианту метода Риндеркнехта и соавт. [7], называется как RBB-эластин. Для этого к 20 мг RBB-эластина в 6 мл 0,1 М глицинового буфера (pH 8,8), содержащего  $1 \cdot 10^{-4}$  М ацетата кальция добавляли 1 мл раствора фермента в том же буфере, выдерживали 1 ч при 40° с периодическим перемешиванием, прибавляли 1 мл насыщенного раствора NaCl для прекращения реакции. Окрашенный раствор фильтровали через бумажный фильтр и колориметрировали на ФЭК-56 при 596 нм. Количество гидролизованного RBB-эластина находили по калибровочной кривой. За единицу эластазной активности принято количество фермента, которое переводит в раствор 1 мг RBB-эластина в данных условиях.

**Субстраты.** Полипептиды регулярного строения, содержащие остатки лизина и аргинина, получены полимеризацией 2,4,5-трихлорфениловых эфиров соответствующих пептидов по ранее разработанному методу [8]. Синтез защищенных метиловых эфиров карбобензоксигексапептидов описан в работе [9]. Синтез и характеристика субстратов коллагеназ  $Z-(\text{Gly-Pro-Pro})_n\text{-OCH}_3$  ( $n=1-6$ ) приведены в [6]. Протамин — суммарная фракция выделена из молока осетровых рыб. Гистон — суммарная фракция выделена из тимуса телят.

**Гидролиз пептидов (16) — (20).** 20 мг субстрата растворяли в 1,0 мл 0,02 М трис-НСl буфера (pH 8,85), содержащего 0,002 М ацетата кальция. К 0,5 мл этого раствора добавляли равный объем раствора фермента в этом же буфере; весовое отношение фермент — субстрат (E : S) ~ 1 : 10. Гидролиз проводили при 37° в течение 48 ч. Одновременно ставили контрольные опыты. Состав контрольных проб: 1) 0,5 мл субстрата + 0,5 мл трис-НСl буфера, 2) 0,5 мл раствора фермента + 0,5 мл трис-НСl буфера. В инкубационную смесь добавляли 1 и. НСl для высасывания белка, центрифугировали при 5000 об/мин и надосадочную жидкость наносили на пластинку (25 × 75 мм) с незакрепленным слоем силикагеля. Хроматогра-

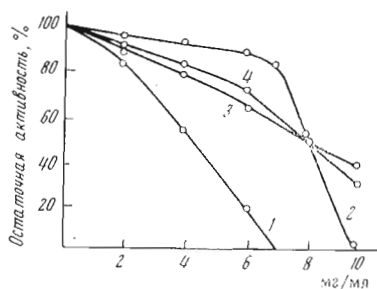


Рис. 1

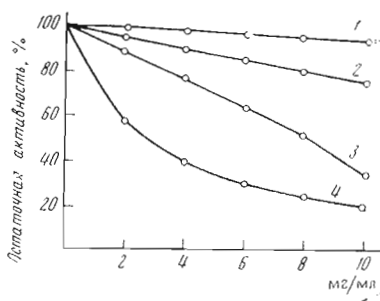


Рис. 2

Рис. 1. Зависимость ингибирующего эффекта полипептидов на эластазу из *Actinomyces rimosus* от концентрации пептидов: 1 —  $\text{H}-(\text{Lys-Arg-Ala})_{26}\text{-NH}_2$ ; 2 —  $\text{H}-(\text{Lys-Arg-Gly})_{25}\text{-NH}_2$ ; 3 — протамин; 4 —  $\text{H-H-Lys}_8\text{-NH}_2$ .

Рис. 2. Зависимость ингибирующего эффекта полипептидов на панкреатическую эластазу от концентрации пептидов: 1 —  $\text{H}-(\text{Lys-Arg-Ala})_{26}\text{-NH}_2$ ; 2 —  $\text{H}-(\text{Lys-Arg-Gly})_{25}\text{-NH}_2$ ; 3 — протамин; 4 —  $\text{H-Lys}_8\text{-NH}_2$ .

фирование проводили в системе *втор*-бутанол — 3%-ный аммиак (100 : 44) или н.бутанол —  $\text{CH}_3\text{COOH}$  — вода (100 : 10 : 30). Хроматограммы проявляли парами  $\text{I}_2$ . Одновременно с опытом ставили контрольную пластинку. О гидролизе судили по появлению на хроматограмме дополнительных по сравнению с контролем пятен.

*Гидролиз полипептидов (I) — (15)* проводили аналогично гидролизу пептидов. Его результаты оценивали по данным электрофореза анализируемых проб на бумаге: 1500В, 15 мА, 40 мин при рН 2,7. Электрофореграммы проявляли нингидрином.

*Ингибирующее действие полипептидов, протаминов и гистонов (I) — (15)*. 20 мг полипептида или белка-субстрата растворяли в 1 мл 0,1 М глицинового буфера (рН 8,85), содержащего  $2 \cdot 10^{-4}$  М ацетата кальция и добавляли к равному объему раствора фермента в этом же буфере (Е : S равно  $\sim 1 : 10$ ). Смесь выдерживали 1 ч при 20° и определяли остаточную активность по описанному выше методу [1]. В качестве контроля служила проба без полипептида, активность которой была принята за 100%. Аналогично были проведены опыты по ингибирующему действию некоторых субстратов в зависимости от их концентрации (рис. 1, 2).

Авторы выражают благодарность за помощь в работе сотруднику Института молекулярной биологии АН СССР М. П. Финогеновой.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Рассулин Ю. А., Раджабов Л. Р., Каверзнева Е. Д., Шибнев В. А., Ермаков Г. С. (1974) Изв. АН СССР. Сер. хим., 3, 687—692.
2. Naughton M. A., Sanger F. (1961) Biochem. J., 78, 156—163.
3. Narayanan A. S., Anwar R. A. (1969) Biochem. J., 114, 11—17.
4. Atlas D., Levit S., Schechter I., Berger A. (1970) Fed. Eur. Biochem. Soc., 11, 281—288.
5. Gertler A., Hofmann T. (1970) Canad. J. Biochem., 48, 384—389.
6. Шибнев В. А., Гречишко В. С., Порошин К. Т. (1971) Докл. АН СССР, 198, 608—610.
7. Rinderknecht H., Geokas M. C., Silvermann P., Haverback V. J. (1968) Clin. chim. acta, 21, 197—203.
8. Шибнев В. А., Марьяш Л. И., Порошин К. Т. (1972) Докл. АН СССР, 207, 625—627.
9. Шибнев В. А. (1972) Синтез регулярных полипептидов и применение их для изучения структуры коллагена, докт. дисс., М.

Поступила в редакцию\*  
10.VII.1974

#### COMPARATIVE STUDIES OF PANCREATIC ELASTASE AND ELASTOLYTIC ENZYME FROM *ACTINOMYCES RIMOSUS* WITH OLIGO AND POLYPEPTIDES

RADJABOV L. R., RASSULIN Ju. A., MARJASH L. I., SHIBNEV V. A.

*Institute of Molecular Biology and N. D. Zelinsky  
Institute of Organic Chemistry, Academy of Sciences of the USSR,  
Moscow, State University of Tadzhikistan, Dushanbe*

The specificity of action of pancreatic elastase and elastolytic enzyme from *Actinomyces rimosus* was compared using synthetic oligo and polypeptides. These enzymes proved very similar in their action. The inhibitory activity of polypeptides consisting of lysine, alanine and glycine residues was not markedly different for both enzymes. The polypeptides containing arginine completely inhibited the action of elastase from *Act. rimosus* and to a much lesser extent that of pancreatic elastase. Protamine and octalysine amide exerted the most pronounced inhibitory effect on both elastases.

\* Статья из портфеля редакции журнала «Химия природных соединений»; дата поступления — 2.VII.1973 г.