



УДК 577.152.342*43.042

© 1994 Н. И. Соловьева, Т. О. Балаевская,
М. П. Финогенова *, В. А. Шибнев *

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ КОЛЛАГЕНАЗ С НЕКОТОРЫМИ ПЕПТИДНЫМИ СУБСТРАТАМИ И ИНГИБИТОРАМИ

Институт биомедицинской химии РАМН, Москва;

* Институт вирусологии РАМН, Москва

Ключевые слова: коллагеназы; субстраты пептидные; ингибиторы пептидные.

Исследовано взаимодействие коллагеназ I и II (кlostридиопептидаз) из *Clostridium histolyticum* с гексапептидными субстратами типа Z-(Gly-Pro-Pro)₂-OCH₃, в которых некоторые остатки L-пролина заменены на их D-аналоги, а также с трипептидным хлорметилкетонem Z-Gly-Pro-Gly-CH₂Cl. Гексапептиды синтезированы методом смешанных ангидридов в растворе. Установлена роль стереоспецифичности индивидуальных аминокислотных остатков в субстратной последовательности, а также выявлены различия между коллагеназами в отношении их специфических требований к субстрату. Показано, что трипептидный хлорметилкетон является специфическим ингибитором коллагеназ, взаимодействующим с областью субстратсвязывающего участка в активном центре ферментов и модифицирующим, возможно, остатки лизина.

Исследование взаимодействия протеолитических ферментов с синтетическими субстратами и ингибиторами различной природы — важный этап в ходе изучения структуры и свойств этих ферментов, природы аминокислотных остатков, составляющих активный центр, механизма действия ферментов. В свою очередь расширяющиеся представления о специфичности и механизме действия ферментов дают реальную возможность целенаправленного синтеза высокоспецифических ингибиторов. За последние несколько лет был создан новый тип ингибиторов, моделирующих возможное переходное состояние субстрата в ферментативной реакции [1—3]. Представляют интерес и сохраняют свою актуальность исследования структуры и свойств ферментов с помощью ингибиторов — аналогов субстратов, содержащих реакционноспособные группировки, например хлорметилкетонные, которые могут образовывать стабильное ковалентное соединение с одним или несколькими аминокислотными остатками [4]. Весьма широко и подробно исследовано действие подобных специфических ингибиторов на сериновые [5], металлосодержащие [6] и цистеиновые [7] пептидгидролазы.

Объектом настоящего исследования явились коллагеназы I и II (кlostридиопептидазы I и II), выделенные нами ранее из *Clostridium histolyticum* [8]. Эти ферменты принадлежат к группе металлосодержащих пептидгидролаз, требующих

Сокращения: Nba — 4-нитробензиламид; все аминокислоты, кроме особо указанных, L-ряда.

для проявления активности ионы кальция. Коллагеназы специфически гидролизуют интерстициальные коллагены I, II и III типов и синтетические пептиды с коллагеноподобной последовательностью аминокислот типа R¹-Pro-X-Gly-Pro-R² (R¹, R² и X — любые аминокислотные остатки) по связи X—Gly при нейтральных значениях pH. К настоящему времени известно до 6 форм коллагеназ из *Cl. histolyticum*, отличающихся друг от друга по физико-химическим и ферментативным свойствам [9, 10].

Исследования специфичности коллагеназ, проведенные на большом количестве синтетических субстратов, позволили оценить вклад отдельных аминокислотных остатков в гидролиз субстрата и определить оптимальные для взаимодействия с ферментом размеры пептидной цепи [11, 12].

Ранее нами было установлено значение природы аминокислотных остатков в положении P₁(X) для эффективности гидролиза коллагеназой *Cl. histolyticum* коллагеноподобного гексапептида Z-Gly-Pro-X-Gly-Pro-Pro-OCH₃ [11]. В настоящей работе проведен синтез гексапептидов указанного выше типа (где X — остатки пролина), в которых остатки L-пролина в положениях P₂, P₂' и P₃' были заменены на остатки D-пролина, и изучено их взаимодействие с двумя коллагеназами — I и II из *Cl. histolyticum*. Следует отметить, что при гидролизе коллагена в положениях P₂ и P₂' находятся преимущественно остатки пролина, P₃' — различные аминокислотные остатки, в том числе и пролин, а в положениях P₁' и P₃ чаще всего находятся остатки глицина [13].

Учитывая, что пролин практически не склонен к рацемизации, защищенные гексапептиды синтезированы методом смешанных ангидридов в растворе по схеме, описанной нами для Z-(Gly-L-Pro-L-Pro)₂-OCH₃ [14]. Все пептиды получены с хорошими выходами в виде аморфных порошков после переосаждения из хлороформа эфиром, а при необходимости проведена дополнительная очистка на колонке с силикагелем. Индивидуальность полученных соединений контролировали ТСХ и данными аминокислотного анализа. Все соединения хорошо растворялись в буферных растворах. Характеристики гексапептидов и кинетические параметры их гидролиза коллагеназами I и II приведены в табл. 1. Полученные данные свидетельствуют о том, что замена L-пролина на D-пролин в положении P₂ (пептид (4)) вызывала значительное снижение константы скорости второго порядка ($k_{кат}/K_m$) гидролиза пептида обеими коллагеназами (в 150—200 раз) по сравнению с гексапептидом, содержащим все остатки пролина с L-конфигурацией (пептид (1)). Это снижение происходило за счет резкого уменьшения $k_{кат}$, в то время как сродство пептида к ферментам изменялось в значительно меньшей степени. Замена L-пролина на D-пролин в положении P₂' (пептид (3)) также приводила к существенному уменьшению константы скорости второго порядка гидролиза пептида обоими ферментами, хотя и в меньшей степени для коллагеназы II. При этом сродство пептида к коллагеназе I снижалось почти на порядок. Эти данные свидетельствуют о том, что конфигурация аминокислотных остатков в положениях P₂ и P₂' влияла в большей степени на скорость химического превращения комплекса фермента с субстратом для обеих коллагеназ и что ферменты различались по своим требованиям к субстрату в отношении стереоспецифичности остатков пролина в этих положениях. Пептид с остатками D-пролина в положениях P₂ и P₂' (не приведен в табл. 1) практически не гидролизывался коллагеназами.

Для обеих ферментов замена L-аминокислотного остатка на D-аналог в положении P₃' (пептид (2)) приводила к заметному снижению константы скорости второго порядка гидролиза пептида (4—7 раз), что сопровождалось увеличением K_m (в 2 и 7 раз), в то время как $k_{кат}$ практически не изменялась. Эти данные свидетельствуют о том, что остатки пролина с L-конфигурацией в положении P₃' важны для проявления субстратсвязывающих свойств коллагеназ.

Полученные результаты также позволили выявить различия между коллагене-

Характеристики гексапептидов, содержащих остатки L- и D-пролина и кинетические параметры их гидролиза коллагеназами I и II

Гексапептиды: Z-Gly-Pro-Gly-Pro-Gly-Pro-OCH₃

P₃-P₂-P₁-P₁'-P₂'-P₃'

№ пеп- тида	Конфигурация остатков пролина				[α] _D (с. СНСl ₃), град	t°, C	R _f		K _m · 10 ³ , M		k _{кат} , мин ⁻¹		k _{кат} /K _m · 10 ⁻³ M ⁻¹ · мин ⁻¹	
	P ₂	P ₁	P ₂ '	P ₃ '			A	Б	I	II	I	II		
														I
1	L	L	L	L	-181,5(0,74)*	23	0,56	0,54	0,8	0,4	1200	3300	1560	8000
2	L	L	L	D	-63,2(0,81)	24	0,56	0,53	1,7	2,8	700	3300	446	1180
3	L	L	D	L	-95,5(0,80)	22	0,56	0,53	6,9	2,1	32	880	4,7	423
4	D	L	L	L	-104,7(1,00)	20	0,56	0,53	1,9	2,0	18	76	9,5	38

* MeOH.

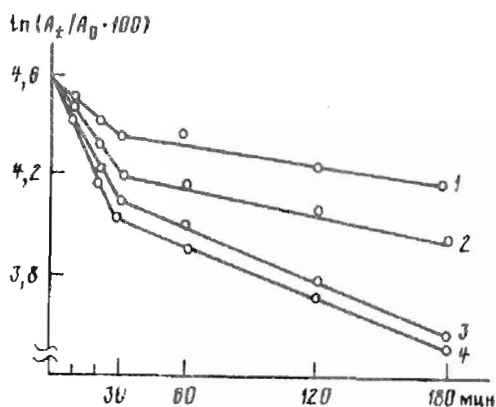


Рис. 1. Кинетика инактивации коллагеназы I под действием хлорметилкетона. [Хлорметилкетон] 0,76 (1), 2,0 (2), 3,8 (3) и 7,5 мМ (4). A_0 — активность фермента в отсутствие ингибитора, A_t — в присутствии ингибитора в момент времени t

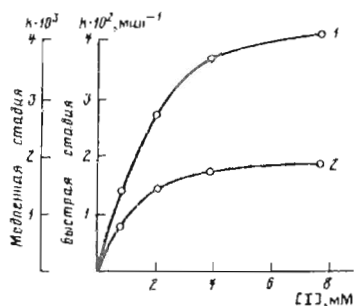


Рис. 2. Зависимость $k_{\text{каж}}$ быстрой (1) и медленной (2) стадий реакции инактивации коллагеназы I в присутствии хлорметилкетона от его концентрации

назами I и II в отношении их специфических требований к субстратам и сделать заключение, что коллагеназа I предъявляет более жесткие требования к стереоспецифичности аминокислотных остатков, чем коллагеназа II. Эти данные в основном согласуются с результатами других исследователей по изучению субстратной специфичности коллагеназ из *Cl. histolyticum* [12].

Предварительное исследование ингибирующего действия диастереомерных пептидов с *D*-пролином на коллагенолитическую активность коллагеназ показало, что они ингибировали эту активность на 10—25%, т. е. были плохими ингибиторами.

В результате проведенных ранее исследований по действию на протеолитическую активность коллагеназ I и II ряда синтезированных нами пептидных хлорметилкетонов, у которых реакционноспособная группировка находилась на С-конце пептида (Z-Gly-CH₂Cl, Z-Pro-Gly-CH₂Cl, Z-Gly-Pro-Gly-CH₂Cl и Z-Pro-Gly-Pro-Gly-CH₂Cl), показано, что исследованные хлорметилкетоны вызывают значительное ингибирование коллагеназ [15]. Полученные данные позволили предположить, что эти ингибиторы специфически взаимодействуют с областью активного центра ферментов. Следует отметить, что синтезированные другими исследователями галоацетильные производные пептидов-аналогов субстрата с реакционноспособной группировкой на N-конце пептида (ClCH₂CO-ProNH₂, ClCH₂CO-Pro-Nba, ClCH₂CO-Gly-Pro-Nba, ClCH₂CO-Gly-Pro-Ala-OCH₃) практически не ингибировали коллагеназу [16]. Причину отсутствия ожидаемого ингибирующего действия авторы не объясняли.

Продолжая наши исследования по выяснению природы аминокислотных остатков, составляющих активный центр, мы провели кинетический анализ ингибирования пептидазной активности коллагеназы I трипептидным хлорметилкетонном Z-Gly-Pro-Gly-CH₂Cl. Предварительные данные по ингибированию пептидазной активности коллагеназ I и II этим хлорметилкетонном показали, что эффект торможения для обоих ферментов был практически одинаковым [15]. Дальнейшие исследования проводили с коллагеназой I. В качестве субстрата использовали гексапептид Z-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Gly-OC₂H₅, в котором гидролизуется связь между остатками аланина и глицина.

Процесс инактивации коллагеназы под действием хлорметилкетона не соответствовал простой кинетике реакций псевдопервого порядка, а проходил по крайней мере в две стадии — быструю и медленную (рис. 1). Зависимость кажущихся псевдомномолекулярных констант скорости первого порядка ($k_{\text{каж}}$) быстрой и медленной стадий, рассчитанных из графика рис. 1, от концентрации

Кинетические характеристики инактивации коллагеназы I под действием хлорметилкетона

Стадии инактивации	K_i , мМ	$k_2 \cdot 10^2$, мин ⁻¹
Быстрая	$1,54 \pm 0,3$	$2,30 \pm 0,5$
Медленная	$2,20 \pm 0,4$	$0,56 \pm 0,1$

хлорметилкетона носит насыщающий характер (рис. 2), что свидетельствует, по-видимому, о наличии обратимого комплекса между ингибитором и ферментом до образования ковалентной связи. Схематически реакцию представляют следующим образом:



где K_i — константа диссоциации промежуточного комплекса, k_2 — константа скорости первого порядка образования ковалентного комплекса.

Линеаризация наблюдаемой концентрационной зависимости в двойных обратных координатах ($1/k_{\text{наж}}$ от $1/[I]$) позволила определить значения K_i и k_2 инактивации коллагеназы под действием пептидного хлорметилкетона. Линейное уравнение имеет следующий вид:

$$\frac{1}{k_{\text{наж}}} = \frac{1}{k_2} + \frac{K_i}{k_2 [I]}.$$

Значения констант представлены в табл. 2.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что превращение обратимого комплекса в модифицированный фермент — лимитирующая стадия реакции инактивации. Необходимо отметить, что рассчитанная величина константы связывания ($K_i = 1,5 - 2,2$ мМ) оказалась на порядок ниже K_i структурного аналога хлорметилкетона — Z-Gly-Pro-Gly (18 мМ), являющегося конкурентным ингибитором коллагеназы [17], и аналогична значению K_m (1,4 мМ) гидролиза гексапептидного субстрата Z-(Gly-Pro-Gly)₂-OC₂H₅ [11]. Эти данные свидетельствуют в пользу взаимодействия хлорметилкетона с субстратсвязывающим участком активного центра коллагеназы. Двухстадийный характер инактивации коллагеназы хлорметилкетона в условиях эксперимента (рН 7,3), возможно, обусловлен модификацией разной природы групп фермента, различающихся по реакционной способности, доступности для реагента. При этом значении рН в непротонированной форме и потому реакционноспособными могут быть карбоксильные группы, имидазол гистидина, а также ε-аминогруппы лизина, имеющие низкие значения рК.

Для выяснения природы групп, участвующих в реакции с хлорметилкетонам, проводили аминокислотный анализ нативного препарата коллагеназы; препарата, окисленного надмуравьиной кислотой, и алкилированной хлорметилкетонам коллагеназы, также окисленной надмуравьиной кислотой. В качестве метчика в стандартной смеси аминокислот был использован 3-карбоксиметилгистидин, синтезированный по методу [18], как возможное производное в реакции фермента с хлорметилкетонам. Анализ показал, что производное гистидина в спектре аминокислот модифицированного фермента отсутствовало. Возможно, это связано с малым его содержанием в препарате. Кроме того, частичное разрушение остатков гистидина после окисления надмуравьиной кислотой могло исказить результаты. Однако наблюдаемое уменьшение остатков лизина в спектре аминокислот модифицированного фермента по сравнению с аминокислотным составом нативного препарата могло указывать на участие этих остатков в реакции с

хлорметилкетон. Существенная роль остатков лизина для активности коллагеназы была продемонстрирована нами ранее в результате модификации фермента малеиновым ангидридом (рН 8,15) и диэтилпирокарбонатом (рН 7,5) [19], а также другими исследователями [20]. Данные аминокислотного анализа модифицированной хлорметилкетон коллагеназы носят предварительный характер.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что изученный хлорметилкетон является специфическим ингибитором коллагеназ (кlostридиопептидаз) и взаимодействует с областью субстратсвязывающего участка активного центра этих ферментов, возможно по остаткам лизина.

Экспериментальная часть

В работе использованы препараты коллагеназ (КФ 3.4.24.3), выделенные из свежей культуральной среды *Cl. histolyticum*, а также из коммерческого препарата (Serva, Германия), полученного из того же источника. Метод выделения и очистки ферментов описан в работе [8]. Из обоих препаратов были получены в гомогенном состоянии два фермента — коллагеназы I и II (кlostридиопептидазы) с M 100 и 80 кДа соответственно.

В синтезе диастереомерных гексапептидов использовали аминокислоты и их производные (Reanal, Венгрия; Sigma, США).

ТСХ пептидов осуществляли на пластинах Silufol (Чехо-Словакия) в системах А (метанол — хлороформ, 13 : 60), Б (втор-бутанол — 3% аммиак, 100 : 44). Хроматограммы проявляли в парах иода, а также при нагревании. Очистку пептидов проводили на колонках с силикагелем L 40/100 мкм (Chemapol, Чехо-Словакия) в системе этанол — хлороформ, 1 : 9.

Удельное оптическое вращение пептидов измеряли на поляриметре Perkin — Elmer 241 mc (Швеция).

Гидролиз гексапептидов регистрировали по освобождению нингидринположительных продуктов ферментативной реакции по методу [11]. Степень гидролиза оценивали по увеличению в реакционной среде аминного азота [21].

Гидролиз Z-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Gly-OC₂H₅ проводили 15 мин при 29° С в 0,3 мл 0,05 М медиал-ацетатного буфера, рН 7,6, содержащего 10⁻³ М CaCl₂, при концентрации субстрата 3,33·10⁻³ М, коллагеназы — 3,3·10⁻⁷ М. Реакцию останавливали добавлением 2,5% ТСА и в смеси определяли аминный азот.

Взаимодействие коллагеназ с диастереомерными гексапептидами проводили при 37° С в 0,01 М трис-НСl-буфере, рН 7,6, содержащем 10⁻³ М CaCl₂, при концентрации коллагеназ I и II (4,75—9,5)·10⁻⁸ М и (2,2—4,4)·10⁻⁸ М соответственно и пептидов (7,5—22,5)·10⁻⁴ М. Объем реакционной смеси 1 мл. Через определенные интервалы времени реакцию останавливали добавлением 2,5% ТСА и в смеси определяли аминный азот.

Взаимодействие коллагеназы I с трипептидным хлорметилкетон проводили при 20° С в 0,01 М трис-НСl-буфере, рН 7,3, или в 0,05 М медиал-ацетатном буфере, рН 7,3. Оба буфера содержали 10⁻³ М CaCl₂. Хлорметилкетон растворяли в смеси этанола с буфером и добавляли к раствору фермента (1—5 мкМ), используя соотношения фермент — ингибитор, равные 1 : 150, 1 : 450, 1 : 750 и 1 : 1500. Конечная концентрация этанола в пробе была 1—6%. Через определенные промежутки времени отбирали аликваты и определяли пептидазную активность по гидролизу гексапептида нингидриновым методом. В качестве контроля использовали пробы, содержащие соответствующие концентрации этанола.

Кинетические параметры инактивации рассчитывали по методу [22].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Яковлева Г. М. // Биоорганич. химия. 1987. Т. 13. № 4. С. 437—497.
2. Kortylewicz Z. P., Galarzy R. E. // J. Med. Chem. 1990. V. 33. P. 263—273.
3. Otake S., Okayama T., Obata M., Morikawa T., Hattori S., Hori H., Nagai Y. // Chem. Pharm. Bull. 1991. V. 39. № 6. P. 1489—1494.

4. Shaw E.//The Enzymes (3 rd ed.). V. 1//Ed. P. Boyer. N. Y.: Acad. Press, 1970. P. 91—146.
5. Powers J. C.//Meth. Enzymol. 1977. V. 46. P. 197—204.
6. Rasnick D., Powers J. C.//Biochemistry. 1978. V. 14. № 21. P. 4363—4369.
7. Drenth J., Kalk K. H., Swen H. M.//Biochemistry. 1976. V. 15. № 17. P. 3731—3738.
8. Соловьёва Н. И., Балаевская Т. О., Макеева О. С., Орехович В. Н.//Вопр. мед. химии. 1980. Т. 26. № 5. С. 674—677.
9. Bond M. D., Van Wart H. E.//Biochemistry. 1984. V. 23. № 13. P. 3077—3085.
10. Bond M. D., Van Wart H. E.//Biochemistry. 1984. V. 23. № 13. P. 3085—3091.
11. Соловьёва Н. И., Орехович В. Н., Шибнев В. А., Лазарева А. В.//Биохимия. 1970. Т. 35. № 3. С. 579—584.
12. Van Wart H. E., Steinbrink D. R.//Biochemistry. 1985. V. 24. № 23. P. 6520—6526.
13. Nordwig A.//Adv. Enzymol. 1971. V. 34. P. 155—205.
14. Шибнев В. А., Гречшико В. С., Финогенова М. П., Кобяков В. В., Лобачев В. М.//Изв. АН СССР. Сер. хим. 1975. № 7. С. 1608—1612.
15. Балаевская Т. О., Соловьёва Н. И., Орехович В. Н.//Биоорган. химия. 1981. Т. 7. № 10. С. 1553—1559.
16. Vencill C. F., Rasnick D., Cramley K. V.//Biochemistry. 1985. V. 24. № 13. P. 3149—3157.
17. Yagisawa S., Morita F., Nagai Y.//J. Biochem. 1965. V. 58. № 4. P. 407—412.
18. Crestfield A. M., Stein W. H., Moore S.//J. Biol. Chem. 1963. V. 238. № 7. P. 2413—2420.
19. Балаевская Т. О., Соловьёва Н. И., Орехович В. Н.//Биохимия. 1986. Т. 51. № 9. С. 1523—1529.
20. Bond M. D., Van Wart H. E.//Biochemistry. 1981. V. 102. № 1. P. 243—249.
21. Yemm B. W., Cocking E. C.//Analyst. 1955. V. 80. № 2. P. 209—214.
22. Kitz R., Wilson I. B.//J. Biol. Chem. 1962. V. 237. P. 3245—3249.

Поступила в редакцию
23.VII.1993

*N. I. Solovyeva, T. O. Balaevskaya, M. P. Finogenova *,
B. A. Shibnev **

STUDY OF INTERACTIONS OF COLLAGENASES WITH PEPTIDE SUBSTRATES AND INHIBITORS

Institute of Biomedical Chemistry, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow;

** Institute of Virusology, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow*

Interactions of collagenases I and II (clostridiopeptidases) from *Clostridium histolyticum* with hexapeptide substrates in which some *L*-proline residues are replaced by their *D*-analogues, as well as with the tripeptide chloromethyl ketone Z-Gly-Pro-Gly-CH₂Cl were studied. A role of stereochemistry of the amino acid residues in the substrate was established and differences between the collagenases, with regard to their specific requirements to substrates, were revealed. The tripeptide chloromethyl ketone is shown to be a specific collagenase inhibitor modifying at the substrate-binding site in the active centre of these enzymes, most likely lysine residues.