



УДК 577.152.341*710'135

© 1994 В. Ф. Позднев, О. Л. Варламов,
О. О. Григорьянц, О. А. Гомазков

НОВЫЙ ФЛУОРОГЕННЫЙ СУБСТРАТ КАРБОКСИПЕПТИДАЗЫ Н — о-КУМАРОИЛФЕНИЛАЛАНИЛ-АЛАНИЛ-АРГИНИН

Институт биомедицинской химии РАМН, Москва

Ключевые слова: карбоксипептидаза Н, очистка фермента, флуорогенные субстраты, определение ферментативной активности; пептиды, синтез.

Предложен новый флуорогенный субстрат для определения ферментативной активности карбоксипептидазы Н *о*-кумароил-*L*-фенилаланил-*L*-аланил-*L*-аргинин (Cum-Phe-Ala-Arg-ОН). В результате ферментативного гидролиза субстрата образуется Cum-Phe-Ala-ОН, который после экстракции хлороформом и добавления триэтиламина определяют флуорометрически. Проведено сравнение параметров гидролиза нового субстрата и Dns-Phe-Ala-Arg-ОН. Показано, что при гидролизе кумароильного субстрата $K_m = 30$ мкМ, что вдвое меньше, а $k_{cat} = 5,8$ с⁻¹, что в 4 раза больше, чем при гидролизе дансильного субстрата. В результате активации фермента ионами кобальта эффективная константа гидролиза кумароильного субстрата возрастает в 2,6 раза, а K_m при этом не изменяется. Новый субстрат пригоден для определения активности карбоксипептидазы Н в гомогенатах тканей животных.

Карбоксипептидаза Н (КФ 3.4.17.10) отщепляет основные аминокислоты (лизин и аргинин) с карбоксильного конца пептидных предшественников. Фермент известен также как карбоксипептидаза Е и как энкефалинконвертаза [1—3]. По субстратной специфичности он подобен карбоксипептидазе В. Карбоксипептидаза Н обнаружена в различных тканях, но наибольший интерес вызывает ее функциональная роль в структурах головного мозга, где она участвует в процессинге ряда пептидных нейромедиаторов и гормонов (энкефалины, эндорфины, окситоцин, вазопрессин и др.) [3].

Для определения активности карбоксипептидазы Н предложен ряд пептидных субстратов, общим признаком которых является наличие С-концевого аргинина и детекторной группировки, блокирующей α -аминогруппу. Простейшим из них является гиппуриларгинин (Bz-Gly-Arg-ОН), при гидролизе которого освобождается гиппуровая кислота и происходит увеличение оптического потлощения реакционной среды при 254 нм [4]. Поскольку пептиды с С-концевым аргинином плохо растворимы в органических растворителях, таких, как хлороформ или

Принятые сокращения: Cum — *о*-кумароил, Cum-S — Cum-Phe-Ala-Arg-ОН, Pfp — пентафторфенил, Dns — 5-диметиламинонафтилсульфонил-1, GEMSA — 2-гуанидиноэтилмеркаптоянтарная кислота, DMF — диметилформамид, Nro — *о*-нитрофенил.

этилацетат, а продукты, образующиеся после отщепления аргинина (гиппуровая кислота или N-ацилированные аминокислоты и пептиды), растворяются в них хорошо, выделение продукта экстракцией стало общим приемом при определении активности карбоксипептидаз такого типа [5]. Применение улучшенных по сравнению с гиппуровой кислотой хромофоров (фурилакрилоильного [6]) или флуоресцирующих заместителей (например, Dns [1, 5]) позволяет повысить чувствительность метода. Радиоактивно меченные субстраты значительно повышают чувствительность определения ферментативной активности [5], однако такие субстраты менее доступны и работа с ними требует специальных условий.

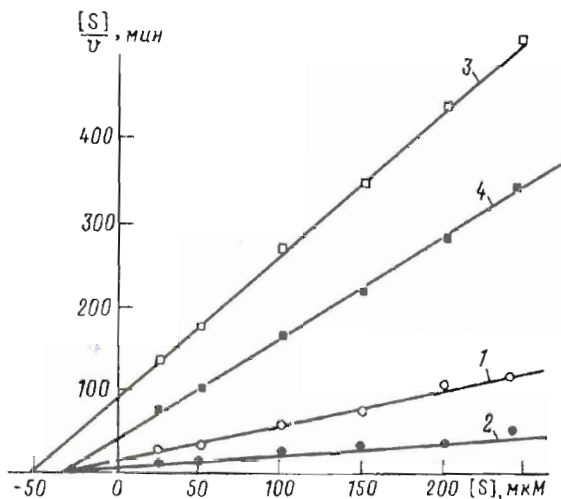
Последовательность аминокислотных остатков в субстратах карбоксипептидазы H была предметом специального исследования. Поскольку одним из природных субстратов этого фермента является [Leu]энкефалин-Arg, первоначально для ее определения использовали Dns-Phe-Leu-Arg-OH [1, 2]. Затем было найдено, что замена лейцина аланином улучшает субстратные свойства пептида, поэтому наибольшее применение получил флуорогенный трипептид Dns-Phe-Ala-Arg-OH (Dns-S) [5]. Недостатком этого в общем удобного субстрата является невысокая устойчивость при хранении, отмеченная ранее также и для других дансильных производных аминов [7]. Нам представлялось целесообразным заменить дансильную группу другим, более устойчивым флуорофором.

В настоящей работе был синтезирован трипептид, имеющий в качестве флуорофора остаток *транс*-3-(2-гидроксифенил)пентен-2-овой (*о*-кумаровой) кислоты — Cum-Phe-Ala-Arg-OH (Cum-S), — и изучена возможность применения его в качестве субстрата карбоксипептидазы H. К достоинствам *о*-кумаровой кислоты как флуоресцентного метчика можно отнести ее коммерческую и синтетическую доступность, высокую устойчивость ее эфиров и амидов при хранении и приемлемые для использования в энзимологии спектральные характеристики. Ранее *о*-кумароильный флуорофор был успешно использован в субстрате холестерол-эстеразы [8], и было показано, что интенсивность флуоресценции *о*-кумаровой кислоты зависит от pH и достигает максимума при pH > 11 с испусканием при 494 нм (возбуждение при 363 нм) [8, 9].

Синтез Cum-S осуществляли классическим методом — наращиванием пептидной цепи от свободного аргинина *о*-нитрофениловыми эфирами Z-аланина и Z-фенилаланина. Защитную группу удаляли гидрированием над палладием и трипептид ацилировали пентафторфениловым эфиром *о*-кумаровой кислоты. При синтезе Cum-Phe-Ala-OH, продукта ферментативной реакции (Cum-P), исходили из метилового эфира ВОС-дипептида, который деблокировали раствором хлористого водорода в уксусной кислоте, ацилировали пентафторфениловым эфиром *о*-кумаровой кислоты и затем омыляли щелочью.

В предварительных экспериментах было установлено, что флуоресценция Cum-Phe-Ala-OH, как и флуоресценция самой *о*-кумаровой кислоты [9], зависит от свойств среды. В ацетатном буфере при pH 5,6 флуоресценция с максимумом испускания при 515 нм (возбуждение 330 нм) невелика и значительно уменьшается при снижении pH. При увеличении pH интенсивность флуоресценции возрастает, достигая максимума при pH 11. В условиях практического определения активности карбоксипептидазы H (ацетатный буфер, pH 5,6) субстрат и продукт имеют одинаковые спектральные характеристики. Экстракция кумароилдипептида хлороформом из подкисленного водного раствора проходит практически количественно, однако экстракт флуоресцирует слабо, хотя форма спектра не изменяется. После добавления к экстракту триэтиламина флуоресценция возрастает, достигая максимума при концентрации триэтиламина 20 мкл/мл, причем ее интенсивность увеличивается при этом в 30 раз. График зависимости интенсивности флуоресценции от концентрации продукта в экстракте линейен в пределах 0—20 нмоль/мл. Характеристики используемого нами флуориметра («Алюмин 2М») позволяют определять 200 пмоль Cum-Phe-Ala-OH и 100 пмоль Dns-Phe-Ala-OH.

Известно, что карбоксипептидаза H активируется хлоридом кобальта [1], а специфическим ингибитором этого фермента является 2-гуанидиноэтилмеркап-



Зависимость $[S/v]$ от концентрации субстрата для карбоксипептидазы Н с использованием *Cum-S* (1, 2) и *Dns-S* (3, 4) в отсутствие (1, 3) и в присутствии (2, 4) 1 мМ CoCl_2 . $[S]$ — концентрация субстрата, v — начальная скорость ферментативной реакции

тоянтарная кислота (GEMSA). Поэтому стандартным методическим приемом при определении активности карбоксипептидазы Н служит проведение ряда параллельных экспериментов с добавлением этих веществ в инкубационную смесь [5]. В соответствии с этим нами было изучено влияние этих эффекторов на ферментативный гидролиз кумароильного и дансильного субстратов.

Гидролиз кумароильного и дансильного субстратов карбоксипептидазой Н, очищенной с помощью аффинной хроматографии, подчиняется нормальной кинетике Михаэлиса — Ментен (рисунок). Однако их кинетические характеристики гидролиза существенно различаются (табл. 1). Первое отличие проявляется в том, что при гидролизе *Cum-S* K_m почти вдвое меньше, а k_{cat} — в 4 раза больше, чем при гидролизе *Dns-S*. Второе отличие обнаруживается при добавлении в инкубационную смесь ионов кобальта в концентрации, соответствующей максимальному активирующему эффекту (1 мМ). Гидролиз *Dns-S* в присутствии кобальта ускоряется в 5 раз, причем K_m уменьшается с 53 до 30 мкМ. При гидролизе *Cum-S* в присутствии ионов кобальта эффективная константа увеличивается в 2,6 раза, но только за счет увеличения k_{cat} , поскольку K_m при этом не изменяется. Суммарно различие между субстратами выражается в том, что эффективная константа гидролиза *Cum-S* при активации ионами кобальта в 4, а без активации — в 7 раз больше, чем при гидролизе *Dns-S*. Очевидно, что эта разница в скоростях гидролиза является отражением различия в строении флуоресцентной метки, которое приводит к изменению фермент-субстратного взаимодействия.

Влияние GEMSA на гидролиз карбоксипептидазой Н обоих субстратов идентично, и активность очищенного препарата фермента полностью подавляется 1 мкМ GEMSA. Это свидетельствует о том, что гидролиз обоих субстратов осуществляется одним и тем же ферментом и в использованном препарате не присутствуют примеси других ферментов с аналогичной активностью.

При использовании гомогената гипофиза крысы в качестве ферментного препарата карбоксипептидазы Н общая картина влияния ионов кобальта и GEMSA на гидролиз *Cum-S* и *Dns-S* сохраняется. Однако в этом случае в препарате регистрируется остаточная ферментативная активность, не подавляемая 1 мкМ GEMSA, что свидетельствует о наличии в гипофизе ферментов, подобных карбоксипептидазе В, также гидролизующих оба субстрата. При добавлении ионов кобальта активность карбоксипептидазы Н в гомогенате возрастает в 5 раз при

Таблица 1

Кинетические константы гидролиза Dns-Phe-Ala-Arg-OH и Cum-Phe-Ala-Arg-OH карбоксипептидазой Н в отсутствие (1) и в присутствии (2) 1 мМ CoCl₂

Субстрат	K _m , мкМ		V _{max} , мкМ/с ⁻¹		k _{cat} , с ⁻¹		k _{cat} /K _m , с ⁻¹ /мкМ	
	1	2	1	2	1	2	1	2
Dns-S	53	30	1,67	4,56	1,39	3,80	26,2	127
Cum-S	30	30	6,98	18,8	5,81	15,6	194	522

Таблица 2

Удельная активность карбоксипептидазы Н (нмоль/мин·мг белка) в тканях крысы *

Ткань	Исходная активность	Добавленный эффектор	
		1 мМ CoCl ₂	1 мкМ GEMSA
Гипофиз	24,1	53,9	2,5
Гипоталамус	6,4	17,6	1,1
Стриатум	1,9	5,6	0,7
Надпочечник	1,1	3,0	1,1

* Субстрат — Cum-S. Активность вычислялась как среднее из 7 значений.

гидролизе Dns-S и только в 2 раза при гидролизе Cum-S. Различие в активации фермента в гомогенате гипофиза коррелирует с разницей эффективных констант гидролиза этих субстратов очищенным препаратом карбоксипептидазы Н в присутствии ионов кобальта. Представленные в табл. 2 данные свидетельствуют о возможности использования Cum-S для определения активности карбоксипептидазы Н в гомогенатах тканей различных органов.

Полученные результаты позволяют сделать заключение, что новый *o*-кумарильный субстрат карбоксипептидазы Н не уступает дансильному, а по некоторым параметрам и превосходит его. В отличие от дансильного субстрата Cum-S легко переносит длительное хранение. В результате замены флуорогенной группировки, блокирующей N-концевую часть субстрата, изменились параметры ферментативной реакции.

Экспериментальная часть

В работе использован Dns-Phe-Ala-Arg-OH (Dns-S), любезно предоставленный В. Н. Незавибацько (Институт молекулярной генетики РАН). GEMSA (Calbiochem, США), производные *L*-аминокислот (Reanal, Венгрия), *o*-кумаровая кислота (Loba, Австрия). *o*-Нитрофениловые эфиры N-защищенных аминокислот синтезировали с использованием ди-*трет*-бутилпирокарбоната в качестве конденсирующего реагента [10]. Температуры плавления определяли в открытых капиллярах и не исправляли. ТСХ проводили на пластинках Kieselgel 60 F-254 (Merck, ФРГ) в системах гептан — этилацетат, 3 : 1 (А), бензол — ацетон — уксусная кислота, 100 : 50 : 1 (Б), хлороформ — метанол — уксусная кислота — вода, 20 : 20 : 1 : 1 (В). Детекцию проводили в УФ-свете и обработкой *o*-толуидиновым реактивом после хлорирования. Пептиды, содержащие аргинин, окрашивали по Сакагучи, а производные *o*-кумаровой кислоты окрашивали реактивом Паули. ИК-спектры снимали в таблетках с KCl на спектрометре Pye-Unicum SP 1000 (Англия).

Синтез субстрата. *Cum-Pfp* (I). К раствору 1,64 г (10 ммоль) *o*-кумаровой кислоты и 2 мл пиридина в 20 мл этилацетата добавляли 2 мл (1,2 ммоль) пентафторфенилового эфира трифторуксусной кислоты. Через 3 ч реакционную смесь разбавляли этилацетатом до 40 мл, промывали 0,5 М серной кислотой, водой, 0,5 М Na_2CO_3 , водой, насыщенным раствором NaCl , высушивали сульфатом натрия и упаривали в вакууме. Кристаллический остаток перекристаллизовывали из хлороформа с гексаном. Получали 3,0 г (90%) соединения (I) с т. пл. 130—131° С, R_f 0,35 (A), ИК-спектр: 1785 cm^{-1} ; УФ-спектр, этанол, $\lambda_{\text{max}}(\epsilon)$: 280 нм (12 000), 325 нм (6000).

***Z-Ala-Arg-OH* (II).** К суспензии 0,8 г (5 ммоль) аргинина в 3 мл воды добавляли раствор 1,7 г *Z-Ala-ONp* в 5 мл DMF, перемешивали 16 ч при 20° С, упаривали, остаток растворяли в смеси хлороформа с метанолом (3:1; 10 мл) и хроматографировали на колонке с силикагелем (2,5×15 см), элюировали ступенчатым градиентом метанола в хлороформе (0—50% за 60 мин). Фракции, содержащие пептид (контроль ТСХ), объединяли, упаривали, остаток кристаллизовали растиранием в эфире. Получали 1,7 г (89%) соединения (II), R_f 0,45 (B); $[\alpha]_D -12,0^\circ$ (с 0,5, метанол).

***Z-Phe-Ala-Arg-OH* (III).** К раствору 1,3 г (3,4 ммоль) соединения (II) в 15 мл метанола добавляли 0,5 г 5% Pd/C, перемешивали в токе водорода 5 ч. Катализатор отфильтровывали, фильтрат упаривали, к остатку добавляли раствор 1,5 г (3,5 ммоль) *Z-Phe-ONp* в 5 мл DMF и перемешивали 16 ч. Растворитель отгоняли в вакууме, остаток растворяли в 5 мл хлороформа, хроматографировали на силикагеле аналогично соединению (II) и получали 1,3 г (72%) соединения (III) с т. пл. 135—140° С, R_f 0,47 (B); $[\alpha]_D -12,4^\circ$ (с 0,5, метанол).

***Cum-Phe-Ala-Arg-OH·HCl* (IV; *Cum-S*).** К раствору 0,53 г (1 ммоль) соединения (III) в 5 мл метанола и 0,3 мл конц. HCl добавляли 0,1 г 5% Pd/C, смесь перемешивали в токе водорода 5 ч, фильтровали и фильтрат упаривали в вакууме. К остатку добавляли раствор 0,4 г (1,2 ммоль) соединения (I) в 3 мл DMF и 0,28 мл триэтиламина, перемешивали 16 ч, разбавляли эфиром (20 мл), маслообразный осадок растворяли в хлороформе (5 мл) и хроматографировали на силикагеле аналогично соединению (II). Получали 0,4 г (70%) соединения (IV) с т. пл. 165—170° С, R_f 0,40 (B). На ТСХ вещество флуоресцирует при облучении УФ-светом (254 нм), окрашивается по Паули и по Сакагучи. $[\alpha]_D -7,7^\circ$ (с 0,5, DMF); УФ-спектр, водный спирт, λ_{max} , нм (ϵ): 280 (2200), 320 (6500).

***Cum-Phe-Ala-OH* (V; *Cum-P*).** Раствор 0,4 г (1,1 моль) Woc-Phe-Ala-OCH_3 в 3 мл трифторуксусной кислоты выдерживали 20 мин, упаривали, остаток растирали в эфире, кристаллический осадок отфильтровывали, промывали эфиром и растворяли в DMF. К раствору добавляли 0,15 мл триэтиламина, 0,3 г (0,9 ммоль) соединения (I) и перемешивали 2 ч, добавляли еще 0,1 мл триэтиламина и перемешивали 16 ч. Смесь разбавляли водой (20 мл), экстрагировали этилацетатом (2×20 мл), экстракт промывали 1 М Na_2CO_3 , водой, 0,5 М H_2SO_4 , водой, насыщенным NaCl , высушивали сульфатом натрия, упаривали, остаток кристаллизовали из эфира и получали 0,3 г (70,7%) Cum-Phe-Ala-OCH_3 , т. пл. 85—87° С, $[\alpha]_D -24,6^\circ$ (с 1, DMF). К раствору 0,3 г (0,75 ммоль) полученного эфира дипептида в 3 мл метанола добавляли 1,5 мл 1 М KOH и перемешивали 5 ч, разбавляли водой до 15 мл, экстрагировали этилацетатом (5 мл), подкисляли 2 мл 1 М H_2SO_4 и повторно экстрагировали этилацетатом (2×15 мл). Экстракт промывали насыщенным NaCl , высушивали сульфатом натрия и упаривали. Остаток кристаллизовали из этилацетата с эфиром и получали 0,2 г (70%) соединения (V) с т. пл. 165—166° С, R_f 0,20 (B). $[\alpha]_D -51,4^\circ$ (с 1, метанол). УФ-спектр, водный спирт, λ_{max} , нм (ϵ): 280 (20 000), 325 (11 000).

Исходный 10 мМ раствор *Cum-S* готовили в этаноле и хранили при -20° С. Рабочий раствор субстрата получали разведением исходного раствора 50 мМ

натрий-ацетатным буфером, pH 5,6 (рабочий буфер) до нужной концентрации. Исходный раствор Dns-S готовили в диметилсульфоксиде ежедневно и разводили рабочим буфером до тех же концентраций, что и Cum-S, и использовали только в день приготовления.

Для получения гомогенатов тканей использовали самцов нелинейных крыс весом 150—200 г. Крыс декапитировали и выделенные ткани хранили при -20°C . Перед определением ферментативной активности размороженные ткани гомогенизировали на гомогенизаторе «VirTius» в 10 mM трис-HCl-буфере, pH 7,7 (гипофиз, в 1000, а стриатум, гипоталамус и надпочечники — в 100 объемах (масса/объем)). Гомогенаты центрифугировали при 10 000 g в течение 5 мин, супернатанты использовали в качестве ферментного препарата. Содержание белка в этих экспериментах определяли по методу Лоури [11].

Очищенный препарат карбоксипептидазы H получали из гипофиза крысы. Ткань от 10 животных гомогенизировали в 20 объемах 100 mM натрий-ацетатного буфера, pH 5,6. Гомогенат центрифугировали при 60 000 g в течение 30 мин, осадок ресуспендировали в том же буфере и центрифугировали повторно. Супернатанты объединяли (общий объем около 2 мл) и наносили на колонку с *n*-аминобензоил-*L*-аргинил-сефарозой-4В [5] (объем сорбента 1,5 мл), уравновешенной 50 mM натрий-ацетатным буфером, pH 5,6. Элюент рециклизовали 10 раз, после чего колонку промывали 20 объемами 50 mM натрий-ацетатного буфера, содержащего 1 M NaCl, pH 5,6. Карбоксипептидазу H элюировали 8 мл 0,5 M гидрохлорида *L*-аргинина в том же буфере. Элюат диализовали в течение 18 ч против 6 л 100 mM натрий-ацетатного буфера, pH 5,6. Получали ферментный препарат с содержанием белка 0,01 мг/мл (белок определяли по методу Бредфорда [12]) и с удельной активностью 1,8 мкмоль/мин·мг белка (субстрат — Cum-S).

Активность карбоксипептидазы H в гомогенатах тканей и в очищенном ферментном препарате вычислялась как разность между активностью в присутствии 1 mM CoCl_2 и активностью на фоне 1 мкМ GEMSA (для активированного фермента) и как разность между общей карбоксипептидаза-В-подобной активностью (активность без активатора или ингибитора) и активностью в присутствии GEMSA.

При определении общей карбоксипептидазной активности 100 мкл ферментного препарата преинкубировали в течение 10 мин в 200 мкл рабочего буфера при 37°C . Реакцию инициировали добавлением в пробу 200 мкл 125 мкМ Cum-S. После 10-минутной инкубации реакцию останавливали добавлением 50 мкл 2,5 M HCl. В каждую пробу вносили по 2 мл хлороформа, содержащего 5% *n*-пропиловый спирт, и после интенсивного встряхивания на «Vibrofix» (30 с, 1500 цикл/мин) образцы переносили в кварцевые кюветы. Перед измерением под слой буфера вводили 50 мкл триэтиламина. Флуоресценцию регистрировали в органическом слое при $\lambda_{\text{возб}}$ 330 нм и $\lambda_{\text{исп}}$ 515 нм при 22°C . В качестве стандарта использовали Cum-Phe-Ala-OH, растворы которого готовили ежедневно. Параллельно производили определение ферментативной активности с помощью дансильного субстрата по аналогичной методике [5].

При активации карбоксипептидазы H ионами кобальта раствор CoCl_2 в рабочем буфере вносили в преинкубационные пробы до концентрации 1 mM. При определении зависимости активности фермента от концентрации ионов кобальта конечную концентрацию CoCl_2 варьировали от 0,1 до 10 mM.

При определении активности в присутствии GEMSA ингибитор растворяли в рабочем буфере и добавляли в преинкубационные пробы до конечной концентрации 1 мкМ. Пробы преинкубировали в течение 10 мин при 37°C . Последующие операции проводили так же, как при определении активности карбоксипептидазы без ингибитора. Кинетические характеристики определяли по методу Хейнса [13].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Fricker L. D., Snyder S. H.//Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1982. V. 79. P. 3886—3890.
2. Supattapone S., Fricker L. D., Snyder S. H.//J. Neurochem. 1984. V. 42. № 4. P. 1017—1023.
3. Fricker L. D.//Ann. Rev. Physiol. 1988. V. 50. № 2. 309—321.
4. Folk T. E., Piez K. A., Carroll W. R., Gladner T. A.//J. Biol. Chem. 1960. V. 235. № 5. P. 2272—2277.
5. Fricker L. D., Devi L.//Anal. Biochem. 1990. V. 184. № 1. P. 21—27.
6. Grinwood B. C., Tarentino A. I., Plummer T. H.//Anal. Biochem. 1988. V. 170. № 7. P. 264—268.
7. Pouchan M. J., Passeron E. J.//Anal. Biochem. 1975. V. 63. № 2. P. 585—591.
8. Позднев В. Ф., Планутис К. С., Точилкин А. И.//Биоорган. химия. 1991. Т. 17. № 10. С. 1347—1351.
9. Wolfbeis O. S., Begum M., Hochmuuth P.//Photochem. and Photobiol. 1986. V. 44. № 4. P. 551—554.
10. Позднев В. Ф., Подгорнова Н. Н., Якайте И. К., Калей У. О.//Биоорган. химия. 1986. Т. 12. № 7. С. 898—901.
11. Lowry O. H., Rosenbrough N. T., Farr A. L., Randall R. T.//J. Biol. Chem. 1951. V. 193. № 1. P. 265—275.
12. Bradford M. M.//Anal. Biochem. 1976. V. 72. № 1—2. P. 265—275.
13. Hanes C. S.//Biochem. J. 1932. V. 26. № 9. P. 1406—1421.

Поступила в редакцию
17.V.1993

После доработки
31.VIII.1993

V. F. Pozdnev, O. L. Varlamov, O. O. Grigoriants,
O. A. Gomaskov

NOVEL FLUOROGENIC SUBSTRATE OF CARBOXYPEPTIDASE H
o-COUMAROYL-PHENYLALANYL-ALANYL-ARGININE

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

New fluorogenic substrate of carboxypeptidase H, Cum-Phe-Ala-Arg-OH, is hydrolyzed by this enzyme to give Cum-Phe-Ala-OH, which is completely extracted by chloroform from the reaction mixture and whose fluorescence increases remarkably by the presence of triethylamine. When the hydrolysis of the novel substrate is compared with Dns-Phe-Ala-Arg-OH, the former has K_m twice as low (30 μM) and k_{cat} four times as high (5.8 s^{-1}). Activation of the enzyme by Co^{2+} in reactions with the two substrates was also studied. The novel substrate is useful for the enzyme's assay in homogenates of various animal tissues.