



УДК 577.112.6:577.152.34'135

## ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОЕ ПРИСОЕДИНЕНИЕ ОСТАТКОВ АРГИНИНА К ПЕПТИДАМ, КАТАЛИЗИРУЕМОЕ СУБТИЛИЗИНОМ.

### 1. ВЛИЯНИЕ СОСТАВА ОРГАНИЧЕСКОГО РАСТВОРИТЕЛЯ

© 1996 г. М. П. Юсупова, С. А. Новгородова\*, В. М. Степанов<sup>#</sup>

ГосНИИгенетика, 113545, Москва, 1-й Дорожный пр., 1;

\* Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, химический факультет

Поступила в редакцию 24.11.95 г.

Сорбированный на макропористом стекле субтилизин 72 в смеси диметилсульфоксида с ацетонитрилом (содержание  $H_2O < 0.07\%$  (v/v)) катализирует реакцию конденсации пептидов Dnp(Z)-Ala<sub>2</sub>-Leu-OCH<sub>3</sub> с амидом аргинина, которая приводит к последовательному образованию продуктов, содержащих от одного до четырех остатков аргинина на С-конце. Глубина реакции зависит от концентрации диметилсульфоксида в смеси, которая определяет локальный избыток амида аргинина на поверхности сорбента, значительно превышающий его мольный избыток в растворе. Это создает предпосылки получения пептидов с различным содержанием остатков аргинина.

*Ключевые слова:* ферментативный синтез, субтилизин, органический растворитель, аргинин-содержащие пептиды.

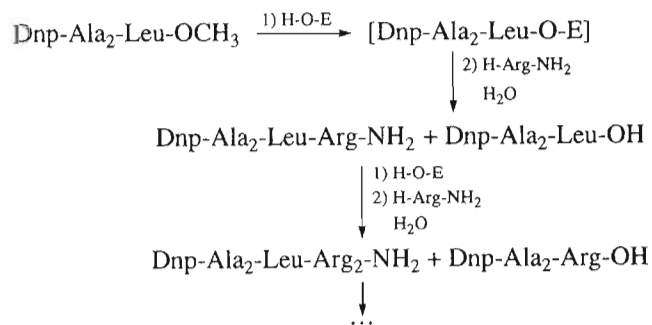
Известны протеиназы, которые гидролизуют пептидные связи, следующие за парами основных аминокислотных остатков [1–3]. Поэтому представляет интерес разработка метода синтеза пептидных субстратов, содержащих последовательность -Arg<sub>2</sub>-. Образование такой последовательности, а также -Arg<sub>3</sub>- наблюдали в катализируемой папаином реакции Z-Ala-OCH<sub>2</sub>CONH<sub>2</sub> с большим мольным избытком метилового эфира аргинина [4]. Пептиды, удлиненные с С-конца на несколько расположенных подряд остатков аргинина и лизина, получали также при использовании в качестве катализатора трипсина, если в реакцию вводили эфиры аргинина [5] или лизина [6]. Однако синтез сопровождался существенным гидролизом исходных эфиров и образующихся продуктов.

Ранее нами было обнаружено [7], что реакция Dnp-Ala<sub>2</sub>-Val-OCH<sub>3</sub> с амидом аргинина, катализируемая субтилизином 72 в смеси DMSO и ацетонитрила, наряду с основным продуктом Dnp-Ala<sub>2</sub>-Val-Arg-NH<sub>2</sub> дает пептид с двумя остатками аргинина на С-конце – Dnp-Ala<sub>2</sub>-Val-Arg<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>.

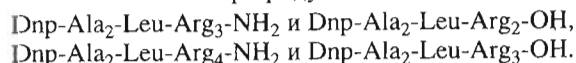
Мы решили изучить эту реакцию, учитывая ее препаративную ценность. Кроме того, выяснение причин, которые приводят к аномальному на первый взгляд результату, позволит глубже понять процессы, происходящие при ферментативном синтезе пептидов. В данной статье подробно рассмотрены аналогичные представленной выше

модельные реакции Dnp(Z)-Ala<sub>2</sub>-Leu-OCH<sub>3</sub> с амидом аргинина, катализируемые сорбированным субтилизином в органических растворителях, причем особое внимание уделено влиянию соотношения растворителей на ход процесса.

Исходные пептиды вводили в реакцию с трехкратным мольным избытком амида аргинина в присутствии субтилизина 72, сорбированного на макропористом стекле CPG-10 [8] (мольное отношение E : S = 1 : 160), в смеси DMSO и ацетонитрила, содержащей менее 0.07%\* воды. Среди продуктов реакции были идентифицированы пептиды с разным содержанием остатков аргинина (таблица), что предполагает следующую схему синтеза:



Далее происходит образование следующих пар продуктов:



Сокращения: Dnp – 2,4-динитрофенил, H-O-E – субтилизин. Все аминокислоты – L-ряда.

<sup>#</sup> Автор для переписки.

\* Здесь и далее концентрации растворителей приведены в объемных процентах.

Времена удерживания пептидов Dnp-Ala<sub>2</sub>-Leu-Arg<sub>(1-4)</sub>-NH<sub>2</sub> и Z-Ala<sub>2</sub>-Leu-Arg<sub>(1-3)</sub>-NH<sub>2</sub> на колонке (4.6 × 250 мм) Zorbax C8. (Условия разделения – см. “Экспер. часть”)

Пептид	n	Время удерживания, мин
Dnp-Ala <sub>2</sub> -Leu-Arg <sub>n</sub> -NH <sub>2</sub>	1	15.3
	2	10.6
	3	7.9
	4	6.2
Z-Ala <sub>2</sub> -Leu-Arg <sub>n</sub> -NH <sub>2</sub>	1	20.7
	2	15.7
	3	12.3

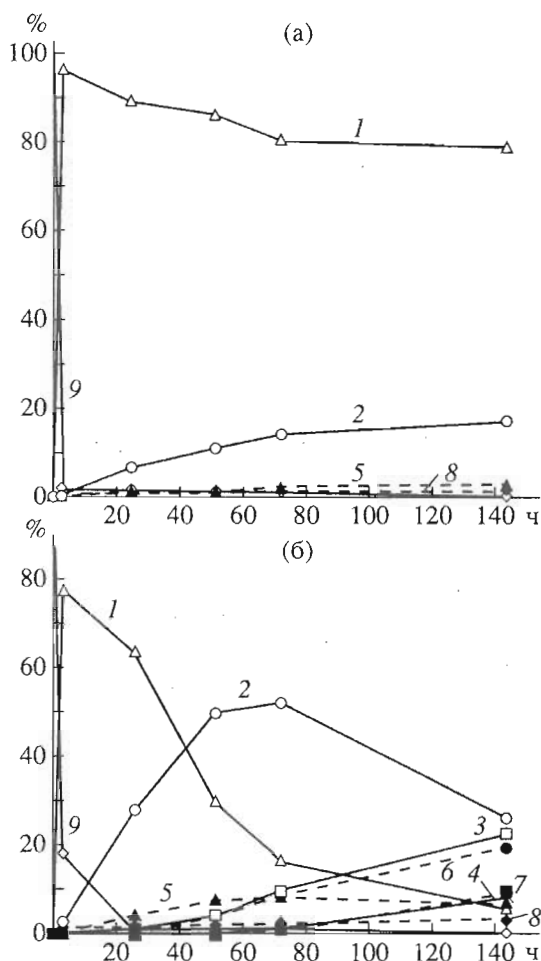
Высокая скорость образования ацилфермента [Dnp-Ala<sub>2</sub>-Leu-O-E] и направленность всего процесса в сторону образования пептидной связи обеспечивались применением в качестве ацилирующих компонентов метиловых эфиров пептидов. Структура ацилфермента хорошо соответствует специфичности субтилизина, подцентр S<sub>1</sub> которого проявляет сродство к гидрофобным аминокислотным остаткам [9]. При взаимодействии этого ацилфермента с амидом аргинина, который способен связываться в подцентре S<sub>1</sub><sup>1</sup>, образуется первый продукт реакции – Dnp-Ala<sub>2</sub>-Leu-Arg-NH<sub>2</sub>. Параллельно может происходить и гидролиз ацилфермента, приводящий к Dnp-Ala<sub>2</sub>-Leu-OH, однако эта реакция подавлена, поскольку концентрация воды в системе очень мала. Судьба главного продукта рассматриваемой реакции – Dnp-Ala<sub>2</sub>-Leu-Arg-NH<sub>2</sub> может быть двоякой. Он может снова взаимодействовать с ферментом так, что лейцин займет участок S<sub>1</sub>, а аргинин – S<sub>1</sub><sup>1</sup>, что приведет к расщеплению пептидной связи и образованию уже рассмотренного ацилфермента. Однако положение S<sub>1</sub> может занять остаток аргинина, S<sub>2</sub> – остаток лейцина и т.д., что не противоречит имеющимся данным о специфичности субтилизина. Получающийся в таком случае ацилфермент [Dnp-Ala<sub>2</sub>-Leu-Arg-O-E] может быть атакован второй молекулой амида аргинина с образованием Dnp-Ala<sub>2</sub>-Leu-Arg<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>, но может и гидролизоваться, хотя, как уже говорилось, вероятность последнего невелика. Амид пептида, содержащий два остатка аргинина, в свою очередь может связаться с ферментом так, что С-концевой аргинин займет зону S<sub>1</sub>, за чем последует образование соответствующего ацилфермента и присоединение третьего, а потом и четвертого остатка аргинина.

По-видимому, эта аномальная реакция последовательного присоединения нескольких остатков аргинина обусловлена процессами, происходящими в органических растворителях в присутствии

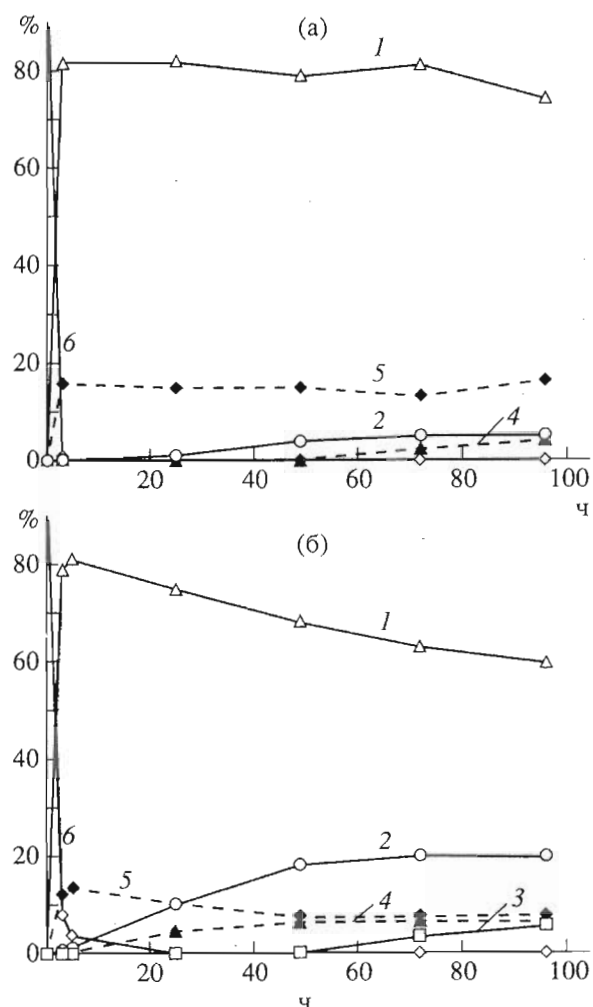
сорбированных ферментов. Можно предположить, что вода, присутствующая в реакционной смеси, связываясь полярной поверхностью носителя и самим ферментом, образует своего рода микрофазу. Вода стабилизирует активную конформацию и увеличивает подвижность фермента (что необходимо для ферментативного катализа), а также препятствует его инаktivации при прямом контакте с органическим растворителем [10]. Для γ-химотрипсина [11] и субтилизина [12] показано, что структура сорбированного фермента в органическом растворителе очень близка его структуре в воде.

Состав органической фазы может двояко влиять на ход реакции, катализируемой сорбированным ферментом. Во-первых, от ее состава зависит распределение реагентов и продуктов реакции между водной микрофазой и объемом органического растворителя [8, 10, 13, 14]. Это распределение может существенно изменить концентрации реагентов именно в микрофазе, окружающей фермент, что скажется на направлении и скорости реакции. Во-вторых, молекулы органических растворителей способны, проникая в фермент, непосредственно воздействовать на зону связывания субстрата [10, 12, 15] (например, после выдерживания кристаллов γ-химотрипсина в гексане две молекулы гексана, замещая воду, связываются в области активного центра фермента, что может изменить его сродство к гидрофобным элементам субстрата [11]).

При выборе концентрации DMSO мы принимали во внимание его способность ингибировать субтилизин. Известно, что 50% DMSO практически полностью подавляет активность фермента [16], в то же время ацетонитрил мало изменяет каталитическую активность субтилизина [13, 17]. Была проверена возможность проведения модельной реакции в растворах DMSO в ацетонитриле различной концентраций. Реакция в 40% растворе DMSO в ацетонитриле быстро останавливалась, приводя лишь к незначительному выходу продуктов присоединения одного и двух остатков аргинина. Очевидно, эта концентрация DMSO еще достаточно высока, и синтез останавливался из-за ингибирования фермента. Снижение концентрации DMSO до 35% повышало выход продуктов. Так, в результате реакции Dnp-Ala<sub>2</sub>-Leu-OCH<sub>3</sub> и амида аргинина получали первый продукт – Dnp-Ala<sub>2</sub>-Leu-Arg-NH<sub>2</sub> с выходом 96% за 3 ч (рис. 1а), а выход аналогичного продукта с Z-защитной группой за 3 ч составил 82% (рис. 2а). Образование пептидов с двумя остатками аргинина происходило намного медленнее, и к 72 ч выход Dnp-Ala<sub>2</sub>-Leu-Arg<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub> был 14%, а аналогичного Z-пептида – 5%. Увеличение времени реакции до 144 ч практически не приводило к изменению состава реакционной смеси. В рассмотренных



**Рис. 1.** Присоединение остатков аргинина в модельной реакции  $\text{Dnp-Ala}_2\text{-Leu-OCH}_3$  с амидом аргинина в 35 (а) и 25% (б) растворе DMSO в ацетонитриле. Приведены кривые накопления амидов пептидов  $\text{Dnp-Ala}_2\text{-Leu-Arg}_n\text{-NH}_2$  (где  $n = 1$  (1), 2 (2), 3 (3), 4 (4)), пептидов со свободной карбоксильной группой  $\text{Dnp-Ala}_2\text{-Leu-Arg}_n\text{-OH}$  (где  $n = 1$  (5), 2 (6), 3 (7)),  $\text{Dnp-Ala}_2\text{-Leu-OH}$  (8) и расхода исходного эфира (9). Условия синтеза см. в "Экспер. части".



**Рис. 2.** Присоединение остатков аргинина в модельной реакции  $\text{Z-Ala}_2\text{-Leu-OCH}_3$  с амидом аргинина в 35 (а) и 25% (б) растворе DMSO в ацетонитриле. Приведены кривые накопления амидов пептидов  $\text{Z-Ala}_2\text{-Leu-Arg}_n\text{-NH}_2$  (где  $n = 1$  (1), 2 (2), 3 (3)),  $\text{Z-Ala}_2\text{-Leu-Arg-OH}$  (4),  $\text{Z-Ala}_2\text{-Leu-OH}$  (5) и расхода исходного эфира (6). Условия синтеза см. в "Экспер. части".

условиях наблюдали образование продуктов лишь с одним и двумя остатками аргинина.

Дальнейшее снижение концентрации DMSO в реакционной смеси до 25% создало возможность последовательного присоединения остатков аргинина, и были обнаружены амиды Dnp- и Z-пептидов, содержавшие последовательность  $-\text{Arg}_3-$ , а также  $\text{Dnp-Ala}_2\text{-Leu-Arg}_4\text{-NH}_2$  (рис. 1б, 2б). Максимальные выходы амидов Dnp(Z)-пептидов, содержащих один, два и три остатка аргинина, составили 79 (79), 52 (20) и 22% (5%) соответственно, а выход  $\text{Dnp-Ala}_2\text{-Leu-Arg}_4\text{-NH}_2$  составил 8% за 144 ч. Среди продуктов реакции  $\text{Z-Ala}_2\text{-Leu-OCH}_3$  с амидом аргинина пептид, содержащий последовательность  $-\text{Arg}_4-$ , не обнаружен.

Можно предположить, что число присоединяющихся остатков аргинина зависит от распределения реагентов в системе. Мы оценили распределение исходных компонентов между органической фазой и макропористым стеклом. Полярный ацетонитрил хорошо растворяет N-ацилированные производные аминокислот, в частности исходные метиловые эфиры трипептидов, но плохо – амид аргинина. Растворимость последнего увеличивается при прибавлении DMSO к ацетонитрилу. В 25% DMSO в ацетонитриле растворимость амида аргинина составила 80 мкмоль/мл. Таким образом, в стандартных условиях проведения реакции (см. "Экспер. часть") (120 мкмоль амида аргинина и 40 мкмоль эфира N-защищенного пептида в 1 мл раствора) нерастворившийся амид аргинина

образует на поверхности носителя аморфный осадок или масло. Постепенно растворяясь, амид аргинина вступает в реакцию, катализируемую ферментом, причем поддерживается его весьма высокая локальная концентрация. Одновременно, видимо, происходит и хемосорбция катионного амида аргинина на носителе, гидрофильная поверхность которого содержит гидроксильные группы. Установлено, что в 25% DMSO в ацетонитриле на макропористом стекле в отсутствие субтилизина накапливается около 0.4 мкмоль амида аргинина и около 0.07 мкмоль Dnp-Ala<sub>2</sub>-Leu-OCH<sub>3</sub> в расчете на 1 мг носителя. Таким образом на поверхности макропористого стекла может создаваться 5–6-кратный молярный избыток амида аргинина по отношению к ацилирующему компоненту. Такое перераспределение реагентов направляет процесс в сторону образования продуктов, содержащих несколько остатков аргинина.

Этот эффект существенно зависит от состава органической фазы. Увеличение содержания DMSO в ацетонитриле до 35% приводит к полному растворению 120 мкмоль амида аргинина в 1 мл смеси. В этом случае увеличение его локальной концентрации на носителе может быть обусловлено только хемосорбцией. Следовательно, концентрация нуклеофила и его молярный избыток будут гораздо ниже, чем при проведении реакции в 25% DMSO, что существенно влияет на накопление аргининсодержащих пептидов.

Снижение содержания полярного DMSO в реакционной смеси приводило к понижению растворимости пептидных продуктов, содержащих более двух остатков аргинина. Частичное выпадение их в осадок наблюдали уже в 35% DMSO в ацетонитриле; в 25% DMSO осаждение увеличивалось, что также могло способствовать сдвигу равновесия последовательных реакций в сторону синтеза пептидов с несколькими остатками аргинина.

В результате проведенного исследования можно сделать заключение о том, что последовательное присоединение остатков аргинина, приводящее к образованию продуктов олигомеризации, обусловлено значительным увеличением молярного избытка амида аргинина на поверхности носителя, в несколько раз превышающего его избыток в органической фазе, и низкой растворимостью аргининсодержащих пептидов в смеси органических растворителей. Действие этих факторов усиливается при снижении концентрации гидрофильного DMSO в реакционной смеси.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали макропористое стекло марки CPG-10, термолизин (Serva, Германия), диметилсульфоксид, содержащий не более 0.1% воды, и ацетонитрил, содержащий не более 0.05% воды (Merck, Германия). Субтилизин 72 выделен в нашей лаборатории [18]. Гомогенность полу-

ченных соединений подтверждали высокоэффективной жидкостной хроматографией на приборе Gilson 704, используя колонку (4.6 × 250 мм) Zorbax C8 (Du Pont Instruments, США). Растворы для хроматографии (приготовленные на обработанной ультрафиолетом бидистиллированной воде) содержали трифторуксусную кислоту и триэтиламин (по 0.05%), метанол (5% для раствора А и 90% для раствора Б). Dnp-пептиды разделяли в градиенте концентрации раствора Б в растворе А: 30 → 40% (0 → 10 мин); 40 → 75% (10 → 25 мин); Z-пептиды разделяли в градиенте: 25 → 35% (0 → 15 мин) и 35 → 70% (15 → 30 мин). Dnp-пептиды детектировали при 360, Z-пептиды – при 220 нм. Молярный коэффициент поглощения практически не зависит от структуры пептида. ТСХ на пластинках Silufol (Чехия) осуществляли в системе *n*-бутанол–вода–пиридин–уксусная кислота (15 : 12 : 10 : 3), вещества обнаруживали раствором нингидрина или Cl<sub>2</sub>/KI. После кислотного гидролиза в стандартных условиях (5.7 М HCl, 105°C, 24–72 ч) гидролизаты анализировали на автоматическом аминокислотном анализаторе Biotronik LC 5001 (Германия).

Субтилизин 72 сорбировали на CPG-10 по методу [8].

Arg-NH<sub>2</sub> получали из Arg-OCH<sub>3</sub> по методу [19], Dnp-Ala<sub>2</sub>-Leu-OCH<sub>3</sub> – по методу [7].

**Z-Ala<sub>2</sub>-Leu-OCH<sub>3</sub>.** К раствору 1.3 г (5 ммоль) Z-Ala<sub>2</sub>-OH в 3.3 мл (5 ммоль) 1.5 М NaOH прибавляли 1.0 г (5.5 ммоль) Leu-OCH<sub>3</sub> · HCl и после растворения доводили pH до 6.5, добавляя 0.1 мл (0.15 ммоль) 1.5 М NaOH; затем вносили 7 мг термолизина и перемешивали при 20° С. Через 15 мин появился осадок, который постепенно заполнял весь объем смеси. Через 1 сут осадок переносили на стеклянный фильтр, промывали 0.5 М HCl (2.5 мл × 3), водой (2.5 мл × 7), 0.5 М NaHCO<sub>3</sub> (2.5 мл × 2), водой (2.5 мл × 7) и сушили над КОН. Выход 90%; время удерживания 28.5 мин, R<sub>f</sub> 0.82.

**Кинетика накопления продуктов в реакции конденсации Dnp(Z)-Ala<sub>2</sub>-Leu-OCH<sub>3</sub> с амидом аргинина, катализируемой субтилизином 72.** 29.4 мг (0.12 ммоль) Arg-NH<sub>2</sub> · 2HCl растворяли в 0.35 мл DMSO и 0.06 мл триэтиламина, прибавляли 18.1 мг (0.04 ммоль) Dnp-Ala<sub>2</sub>-Leu-OCH<sub>3</sub> или эквивалентное количество Z-Ala<sub>2</sub>-Leu-OCH<sub>3</sub> и 0.65 мл ацетонитрила. После полного растворения пептида вносили 50 мг CPG-10, содержащего 7.2 мг субтилизина 72, и встряхивали смесь в течение 168 ч на качалке при 20°С. Через определенные промежутки времени отбирали по 0.03 мл реакционной смеси, добавляли 0.30 мл метанола, содержащего 20% 0.1 М HCl, центрифугировали и анализировали методом ВЭЖХ. Продукты реакции идентифицировали с помощью аминокислотного анализа фракций, соответствующих индивидуальным пептидам.

Аналогично проводили реакцию в 25% DMSO в ацетонитриле.

**Растворимость амида аргинина в 25% DMSO в ацетонитриле.** 29.4 мг (0.12 ммоль) Arg-NH<sub>2</sub> · 2HCl растворяли в 0.25 мл DMSO и 0.06 мл триэтиламина. Затем прибавляли 0.75 мл ацетонитрила, перемешивали и оставляли при 16°C. Через 1 сут смесь центрифугировали, отбирали 0.1 мл раствора, упаривали в вакууме и определяли содержание аргинина аминокислотным анализом.

Аналогично определяли растворимость амида аргинина в 35% DMSO в ацетонитриле.

**Сорбция Dnp-Ala<sub>2</sub>-Leu-OCH<sub>3</sub> и амида аргинина на CPG-10.** К раствору 58.8 мг (0.24 ммоль) Arg-NH<sub>2</sub> · 2HCl в 0.5 мл DMSO и 0.11 мл триэтиламина прибавляли 36.2 мг (0.08 ммоль) Dnp-Ala<sub>2</sub>-Leu-OCH<sub>3</sub> и 1.5 мл ацетонитрила. После полного растворения пептида вносили 200 мг CPG-10 (без субтилизина 72) и встряхивали смесь на качалке при 20°C. Через 1 сут CPG-10 переносили на колонку (V = 0.7 мл), десорбцию проводили 6.3 мл 25% раствора DMSO в ацетонитриле и определяли аминокислотный состав элюата.

Состав всех синтезированных соединений был подтвержден аминокислотным анализом.

Авторы выражают благодарность Е.А. Тимохиной (ГосНИИГенетика) за определение аминокислотного состава синтезированных пептидов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Smeekens S.P. // Bio/Technology. 1993. V. 11. P. 182–186.
2. Антонов В.К., Воротынцева Т.И., Замолодчикова Т.С. // Докл. РАН. 1992. Т. 324. С. 1318–1328.
3. Velasco G., Ferrando A.A., Puente X.S., Sanchez L.M., Lopezotin C. // J. Biol. Chem. 1994. V. 269. P. 27136–27142.
4. Schellenberger V., Schellenberger U., Mitin Y.V., Jakubke H.-D. // Monatsch. Chem. 1989. V. 120. P. 437–443.
5. Aso K., Kodaka H., Fukushi H., Lee H.-H. // Biotechnol. Lett. 1992. V. 14. P. 451–454.
6. Aso K., Kodaka H. // Biosci. Biotech. Biochem. 1992. V. 56. P. 755–758.
7. Юсупова М.П., Котлова Е.К., Тимохина Е.А., Степанов В.М. // Биоорганическая химия. 1995. Т. 21. С. 33–38.
8. Reslow M., Adlercreutz P., Mattiasson B. // Eur. J. Biochem. 1988. V. 177. P. 313–318.
9. Gron H., Meldal M., Breddam K. // Biochemistry. 1992. V. 31. P. 6011–6018.
10. Dordick J.S. // Enzyme Microb. Technol. 1989. V. 11. P. 194–211.
11. Yennawar N.H., Yennawar H.P., Farber G.K. // Biochemistry. 1994. V. 33. P. 7326–7336.
12. Wescott C.R., Klibanov A.M. // Biochim. Biophys. Acta. 1994. V. 1206. P. 1–9.
13. Yang Z., Zachert D., Russell A.J. // J. Amer. Chem. Soc. 1993. V. 115. P. 12251–12257.
14. Cassells J.M., Halling P.J. // Biotechnol. Bioeng. 1989. V. 33. P. 1489–1494.
15. Wangicar P.P., Graycar T.P., Estell D.A., Clark D.S., Dordick J.S. // J. Amer. Chem. Soc. 1993. V. 115. P. 12231–12237.
16. Данилевич В.Н., Борматова М.Е., Честухина Г.Г. Способ хранения препарата протеиназ: патент RU 2008354 С1.
17. Kise H., Hayakawa A., Noritomi H. // J. Biotechnol. 1990. V. 14. P. 239–254.
18. Гололобов М.Ю., Морозова И.П., Степанов В.М. // Биохимия. 1991. Т. 56. С. 33–40.
19. Гринштейн Дж., Виниц М. Химия аминокислот и пептидов: Пер. с англ. М.: Мир, 1965. С. 624.

## Sequential Attachment of Arginine Residues to Peptides Catalyzed by Subtilisin.

### 1. The Effect of Organic Solvent Composition

M. P. Yusupova\*, S. A. Novgorodova\*\*, and V. M. Stepanov\*

\* State Research Institute of Genetics, Pervyi Dorozhnyi pr. 1, Moscow, 113545 Russia

\*\* Moscow State University, Chemical Faculty, Moscow, 119899 Russia

**Abstract**—Subtilisin 72 sorbed on a macroporous glass catalyzed the condensation of Dnp(or Z)-Ala<sub>2</sub>-Leu-OCH<sub>3</sub> with arginine amide in a mixture of DMSO and acetonitrile at a water content less than 0.07% (v/v). This reaction resulted in the sequential formation of peptides containing from one to four C-terminal arginine residues. The number of attached Arg residues depended on the DMSO concentration in the solvent mixture, which determined the local arginine excess on the sorbent surface, which significantly exceeded the molar arginine excess in the solution. This enzymic reaction opened up new opportunities for preparation of peptides with different content of arginine residues.

*Key words:* enzymic synthesis, subtilisin, organic solvent, arginine-containing peptides.