



УДК 577.152.344.135

## ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ АСПАРТИЛЬНЫХ ПРОТЕИНАЗ ПО РАСЩЕПЛЕНИЮ НОВЫХ ХРОМОГЕННЫХ СУБСТРАТОВ

© 1998 г. О. В. Литвинова, Г. Н. Баландина<sup>#</sup>, В. М. Степанов

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, химический факультет, 119899, ГСП, Москва, В-234

Поступила в редакцию 11.07.97 г. Принята к печати 10.11.97 г.

Хромогенные гексапептиды Dnp-Ala-Ala/Ser-Phe-Phe-Ala-Arg-NH<sub>2</sub>, которые содержат связь Phe-Phe, чувствительную к действию аспартильных протеиназ, предложены как субстраты для определения активности пепсина, химозина и аспергиллопепсина А. Анализ проводится после разделения гидролизатов на SP-сефадексе по поглощению при 360 нм лишеной катионной группы динитрофенилпептида, образующегося при расщеплении субстрата. Определены кинетические характеристики гидролиза синтезированных субстратов. Показано, что замена в P<sub>2</sub>-положении остатка Ala на Ser не приводит к значительному изменению кинетических параметров. Субстраты гидролизуются пепсином в несколько раз быстрее, чем аспергиллопепсином А и химозином. Метод чувствителен и позволяет легко определять активность аспартильных протеиназ.

*Ключевые слова:* аспартильная протеиназа; хромогенный субстрат; протеолитическая активность.

Аспартильные протеиназы (КФ 3.4.23) образуют большую группу ферментов, активных, как правило, в кислой среде. Для определения их протеолитической активности используются синтетические пептиды и природные белки, например гемоглобин. Протеолитическая активность химозина чаще всего оценивается по его молокоостраживающей способности.

В последнее время для определения активности аспартильных протеиназ были предложены флуорогенные субстраты, в частности те, в структуре которых используется принцип внутримолекулярного тушения флуоресценции [1–3]. Достаточно удобные хромогенные субстраты для ферментов этого класса до сих пор не описаны. Например, *n*-нитроанилиды пироглутамилпептидов использовались для определения активности пепсина и аспергиллопепсина А двухферментным методом [4, 5], основанным на том, что образующийся в результате гидролиза аспартильной протеиназой H-Leu-pNA или H-Phe-pNA затем подвергался исчерпывающему гидролизу лейцин-аминонептидазой с выделением *n*-нитроанилина, который определялся спектрофотометрически по поглощению при 410 нм. Предлагались методы, основанные на различиях в УФ-спектрах поглощения субстрата и одного из продуктов ги-

дролита. Для этого в качестве субстрата использовался Ac-Phe-Tyr-OCH<sub>3</sub> [6] или субстраты, содержащие в P<sub>1</sub>-положении *n*-нитрофенилаланин [7, 8]. Однако эти методы мало чувствительны, так как разница в величинах молярных коэффициентов поглощения субстрата и продукта невелика. Предложенный Кульманом нингидриновый метод [9] весьма трудоемок.

Мы предлагаем метод определения протеолитической активности аспартильных протеиназ по расщеплению хромогенных субстратов общей формулы Dnp-Ala-Xaa-Phe-Phe-Ala-Arg-NH<sub>2</sub>, где Xaa = Ala (субстрат I) или Ser (субстрат II), имеющих в качестве N<sup>α</sup>-заместителя хромогенную 2,4-динитрофенильную группу ( $\lambda_{\max}$  360 нм,  $\epsilon$  15000 M<sup>-1</sup> см<sup>-1</sup>). Строение исследуемых субстратов, т.е. наличие постоянного хромофора – Dnp-группы, поглощающей в УФ-области, на N-конце пептида и остатка Arg в P<sub>3</sub>'-положении, позволяет применить методику, аналогичную используемой для определения активности металлопротеиназ [10].

Суть данного метода (схема) заключается в том, что при ферментативном гидролизе субстрата образуются два пептидных продукта: первый (P1) содержит хромофор, второй (P2) – положительно заряженные  $\alpha$ -аминогруппу и гуанидиногруппу остатка аргинина. Таким образом, при ионообменной хроматографии на сульфокатионите задерживается нерасщепившийся субстрат S и его пептидный фрагмент P2, содержащие положительно заряженные группы. Пептид P1 с хромо-

Сокращения: Dnp – 2,4-динитрофенил, -pNA – *n*-нитроанилид. Все аминокислоты – L-ряда.

<sup>#</sup> Автор для переписки (тел.: (095) 939-55-41, факс: (095) 939-31-81).

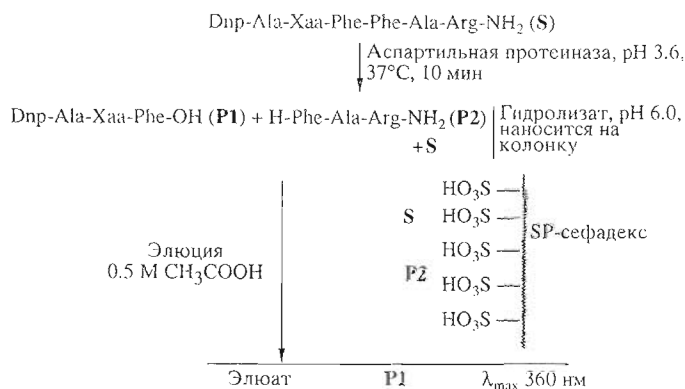


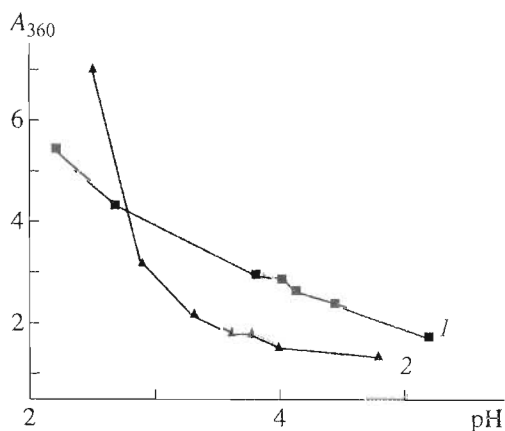
Схема определения протеолитической активности аспартильных протеиназ.

форной Dnp-группой катионообменником не сорбируется. Спектрофотометрическое определение его концентрации в элюате позволяет количественно определить степень гидролиза субстрата.

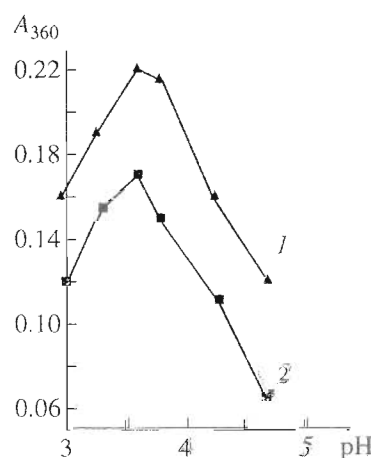
Исследуемые гексапептиды достаточно гидрофобны, поэтому раствор субстрата готовили в буфере с добавлением 20% DMF. Определение зависимости активности ферментов от pH среды проводили по расщеплению субстрата (I). При этом было обнаружено, что по мере увеличения pH и содержания солей в смеси растворимость субстрата заметно уменьшается (рис. 1). Такое явление можно объяснить эффектом высаливания. Это предположение было подтверждено сравнением растворимости субстрата (I) в смеси 20% DMF-H<sub>2</sub>O (430 мкМ) и в 1 М NaCl, содержащем 20% DMF (120 мкМ). Примечательно, что при приготовлении растворов субстрата (II) в смеси 20% DMF – буфер Б (pH 2.5–4.8) высаливания не наблюдалось, что, вероятно, объясняется

заменой остатка Ala в P<sub>2</sub>-положении на более гидрофильный остаток – Ser.

Чтобы избежать эффекта высаливания при выявлении зависимости активности ферментов от pH, растворы субстрата готовили в буфере, содержащем 20% DMF и 4 М мочевины. Как показано ранее [11], присутствие 4 М мочевины не оказывает влияния ни на активность пепсина и химозина, ни на величину их pH-оптимума. Оказалось, что оптимальное значение pH гидролиза пептида (I) пепсином и химозином совпадает и соответствует интервалу pH 3.5–3.7 (рис. 2). Это значение согласуется с литературными данными [1, 2, 12]. Интерес представляет совпадение величин pH-оптимума гидролиза субстрата пепсином и химозином, так как в литературе встречаются примеры смещения значения оптимального значения pH для гидролиза ряда субстратов химозином в более кислую область [9].



**Рис. 1.** Эффект высаливания Dnp-Ala-Ala-Phe-Phe-Ala-Arg-NH<sub>2</sub> в смесях 20% DMF – 0.1 М ацетатный буфер (1) и 20% DMF – 0.1 М лимонная кислота – 0.2 М Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (2).



**Рис. 2.** Зависимость активности пепсина (1) и химозина (2) от pH при расщеплении Dnp-Ala-Ala-Phe-Phe-Ala-Arg-NH<sub>2</sub>. [S] 0.2 мМ, [E]<sub>1</sub> 8.4 нМ, [E]<sub>2</sub> 44.2 нМ. Остальные условия см. в "Экспер. части".

Кинетические характеристики субстратов были определены при pH 3.6. На основании изучения зависимости степени гидролиза субстратов от времени (рис. 3) был выбран временной промежуток для проведения кинетических исследований.

Линейная зависимость начальной скорости гидролиза субстратов соблюдается в интервале концентраций пепсина 5–40 нМ, а аспергиллопепсина А и химозина 20–200 нМ.

Кинетические характеристики (таблица) позволяют заключить, что замена в  $P_2$ -положении остатка Ala на Ser не оказывает заметного влияния на значения констант  $K_m$  и  $k_{кат}$  ферментативного гидролиза субстратов. Фермент-субстратные комплексы прочнее в случае пепсина и аспергиллопепсина А, чем в случае химозина (что следует из сопоставления соответствующих констант Михаэлиса). Значения  $k_{кат}$  гидролиза обоих субстратов пепсином в 10 раз выше соответствующих констант для аспергиллопепсина А. При гидролизе субстратов (I) и (II) химозином величины  $k_{кат}$  соответственно в 5 и 7 раз ниже, чем при гидролизе пепсином. Полученные константы являются кажущимися, поскольку при приготовлении растворов субстрата использовался 20% DMF, который ингибирует фермент [13]. Определенные нами характеристики несколько хуже кинетических констант, полученных для синтетических субстратов, моделирующих аминокислотную последовательность, расщепляемую химозином в природном субстрате – к-казеине [14].

Таким образом, Dnp-Ala-Ala/Ser-Phe-Phe-Ala-Arg-NH<sub>2</sub> являются удобными субстратами для определения активности аспартильных протеиназ.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали SP-сефадекс G-50 (Pharmacia, Швеция), гемоглобин бычий очищенный марки А ("Биолар", Латвия); препарат пепсина свиньи (КФ 3.4.23.1) очищен по методике [15]. Исходным материалом для выделения аспергиллопепсина А (КФ 3.4.23.18) служил препарат экстракта поверхностной культуры *Aspergillus awamori*, штамм 22 [16]. Химозин (КФ 3.4.23.4) был выделен из препарата сычужного фермента [15]. Субстраты синтезированы ранее [17]. Использовались DMF и уксусная кислота ос. ч. (Leshbiorham, Россия), остальные реактивы марки х. ч. ("Реакхим", Россия).

**Буферные растворы:** 0.1 М уксусная кислота – 0.1 М CH<sub>3</sub>COONa, pH 1.8–4.8 (А); 0.1 М лимонная кислота – 0.2 М Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 2.4–4.4 (Б); 25 мМ цитратный буфер, pH 4.8 (В).

**Приготовление растворов субстрата.** Гексапептид растворяли в DMF и добавляли буфер А (до содержания DMF 20%). Нерастворившийся остаток отфильтровывали. Точную концентра-

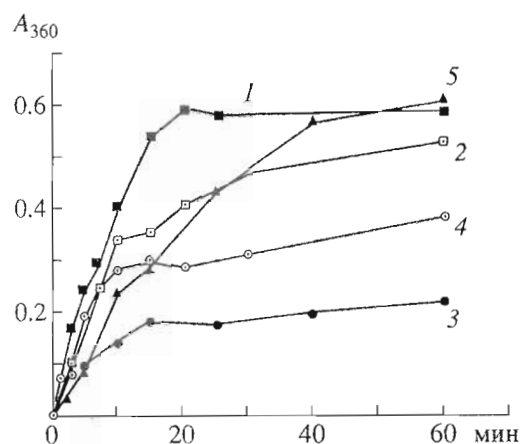


Рис. 3. Зависимость степени гидролиза субстратов (I) (1, 3, 5) и (II) (2, 4) от времени. Условия определения: [пепсин] 7.2 нМ (1) и (2), [химозин] 142 нМ (3) и (4), [аспергиллопепсин А] 53.6 (5); [S] 260 мкМ. Остальные условия см. в "Экспер. части".

цию субстрата определяли, измеряя поглощение раствора относительно соответствующего буферного раствора. Растворы субстрата готовили последовательно разбавлением исходного раствора смесью 20% DMF – буфер А. Для определения активности удобно использовать раствор субстрата с концентрацией выше 250 мкМ.

**Определение активности по расщеплению Dnp-Ala-Xaa-Phe-Phe-Ala-Arg-NH<sub>2</sub>.** К 400 мкл раствора субстрата, термостатированного при 37°C в течение 5 мин, прибавляли 100 мкл раствора фермента (препараты ферментов растворяли в буфере В). Гидролиз останавливали через 10 мин добавлением 2 М NaOH до pH 6.0. Гидролизат наносили на колонку, содержащую 1 мл SP-сефадекса G-50, уравновешенного 0.5 М уксусной кислотой. Несорбирующийся Dnp-Ala-Xaa-Phe-OH элюировали 2 мл 0.5 М уксусной кислоты. Измеряли оптическое поглощение элюата при 360 нм. Контрольная проба содержала 400 мкл раствора субстрата и 100 мкл буфера В. Удельную активность рассчитывали по формуле

$$\alpha_{уд} = \frac{A_{оп} - A_k}{A_{280} V t} \times 170 \frac{\text{нмоль}}{\text{ОЕ}_{280} \text{ мин}},$$

где  $A_{оп}$  – поглощение элюата опытной пробы при 360 нм;  $A_k$  – поглощение элюата контрольной пробы при 360 нм;  $V$  – объем добавленного раствора фермента (0.1 мл);  $t$  – время реакции, мин; 170 – расчетный коэффициент, учитывающий разбавление и  $\epsilon_{360}$ ;  $A_{280}$  – поглощение раствора фермента.

**pH-оптимум протеолитической активности** пепсина и химозина определяли по описанной выше методике, используя серию растворов Dnp-Ala-Ala-Phe-Phe-Ala-Arg-NH<sub>2</sub> в смеси 20% DMF–

Кинетические характеристики гидролиза субстратов (I) и (II). Условия см. в "Экспер. части"

Субстрат	Фермент	$K_m$ , мМ	$k_{кат}$ , с <sup>-1</sup>	$(k_{кат}/K_m) \times 10^{-3}$ , М <sup>-1</sup> с <sup>-1</sup>
(I)	Пепсин	0.407	2.76	6.79
	Аспергиллопепсин А	0.194	0.27	1.39
	Химозин	0.109	0.52	0.48
(II)	Пепсин	0.561	3.21	5.72
	Аспергиллопепсин А	0.22	0.36	1.65
	Химозин	1.13	0.45	0.39

буферы А и Б, содержащие 4 М мочевины, при рН 2.8–4.8. Определение активности проводили по описанной выше методике. Концентрация субстрата в пробе 200 мкМ, ферментов – 8.4 и 44.2 нМ для пепсина и химозина соответственно.

**Кинетические параметры** субстратов определяли спектрофотометрически при оптимальном значении рН по описанной выше методике. Количество 2 М NaOH, необходимое для установления рН 6.0 (остановка гидролиза), определяли титрованием 5 мл раствора, аналогичного по составу раствору гидролизата.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Filippova I.Yu., Lysogorskaya E.N., Anisimova V.V., Suvorov L.I., Oksenoit E.S., Stepanov V.M.* // *Anal. Biochem.* 1996. V. 234. P. 113–118.
2. *Филиппова И.Ю., Лысогорская Е.Н., Оксенойт Е.С., Комаров Ю.Е., Степанов В.М.* // *Биоорган. химия.* 1986. Т. 12. С. 1172–1180.
3. *Yonezawa H., Uchikoba T., Kaneda M., Izumiya N.* // *Int. J. Pept. Protein Res.* 1996. V. 47. P. 56–61.
4. *Лысогорская Е.Н., Филиппова И.Ю., Бойцова С.Е., Оксенойт Е.С., Люблинская Л.А., Степанов В.М.* // *Биоорган. химия.* 1983. Т. 9. С. 470–477.
5. *Филиппова И.Ю., Лысогорская Е.Н., Оксенойт Е.С., Люблинская Л.А., Степанов В.М.* // *Биоорган. химия.* 1984. Т. 10. С. 390–393.
6. *Silver M.S.* // *J. Am. Chem. Soc.* 1965. V. 87. P. 886–894.
7. *Raymond M.N., Bricas E., Salesse R., Garnier J., Carnot P., Ribadeau Dumas B.* // *J. Dairy Sci.* 1973. V. 56. P. 419–422.
8. *Raymond M.N., Bricas E.* // *J. Dairy Sci.* 1979. V. 62. P. 1719–1725.
9. *Kullmann W.* // *J. Biol. Chem.* 1980. V. 255. P. 8234–8238.
10. *Остерман А.Л., Степанов В.М., Руденская Г.Н.* // *Биохимия.* 1984. Т. 49. С. 292–301.
11. *Anisimova V.V., Filippova I.Yu., Lysogorskaya E.N., Oksenoit E.S., Kolobanova S.V., Stepanov V.M.* // *Int. J. Pept. Protein Res.* 1996. V. 47. P. 28–35.
12. *Suzuki J., Sasaki F., Sasao Y., Hamu A., Kawasaki H., Nishiyama M., Horinouchi S., Beppu T.* // *Biochim. Biophys. Acta.* 1984. V. 791. P. 28–36.
13. *Irvin G.B., Blumson N.L., Elmore D.T.* // *Biochem. J.* 1983. V. 211. P. 237–242.
14. *Visser S., Van Rooijen P.J., Schattenkerk C., Kerling K.E.* // *Biochim. Biophys. Acta.* 1977. V. 481. P. 171–176.
15. *Соловьева Т.А., Беляев С.В., Степанов В.М.* // *Химия природ. соединений.* 1977. № 3. С. 398–403.
16. *Степанов В.М., Лобарева Л.С., Руденская Г.Н., Боровикова В.П., Ковалева Г.Г., Лавренова Г.И.* // *Биоорган. химия.* 1977. Т. 3. С. 831–835.
17. *Литвинова О.В., Баландина Г.Н., Степанов В.М.* // *Биоорган. химия.* 1998. Т. 24. С. 10–15.

## Determination of Activity of Aspartic Proteinases by the Cleavage of New Chromogenic Substrates

O. V. Litvinova, G. N. Balandina, and V. M. Stepanov

Department of Chemistry, Moscow State University, Moscow V-234, 119899 Russia

Chromogenic hexapeptides Dnp-Ala-Ala/Ser-Phe-Phe-Ala-Arg-NH<sub>2</sub> containing a Phe-Phe bond, which is sensitive to aspartic proteinases, were used as substrates for assaying the activity of pepsin, chymosin, and aspergillopepsin A. The assay was performed after the separation of hydrolyzates on SP-Sephadex by measuring at 360 nm the absorbance of the dinitrophenylpeptide lacking the cationic group, which was formed upon the cleavage of the substrate. The kinetic parameters of the hydrolysis of the substrates were evaluated. It is shown that replacing the Ala residue with Ser in the P<sub>2</sub> position does not substantially change the kinetic parameters. The substrates were hydrolyzed by pepsin several times faster than by aspergillopepsin A or chymosin. The method is sensitive and enables the activity of aspartic proteinases to be determined easily.

*Key words:* aspartic proteinase, chromogenic substrate, proteolytic activity