



УДК 577.152.344.135

НОВЫЕ ХРОМОФОРНЫЕ СУБСТРАТЫ АСПАРТИЛЬНЫХ ПРОТЕИНАЗ

© 1999 г. О. В. Литвинова, Г. Н. Баландина[#]*Химический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, 119899, ГСП В-234, Москва, Воробьевы горы*

Поступила в редакцию 21.12.99 г. Принята к печати 14.04.99 г.

Сочетанием химических и ферментативного методов синтезированы хромофорные субстраты аспартильных протеиназ Dnp-Ala-Glu-Phe-Phe-Ala-Arg-NH₂ и Dnp-Ala-Ala-Phe-Nle-Ala-Arg-NH₂; определены кинетические характеристики при гидролизе их пепсином, аспергиллопепсином и химозином. Введение Nle в P₁'-положение приводит к образованию прочных фермент-субстратных комплексов с пепсином и химозином; остаток Glu в P₂-положении способствует значительному увеличению k_{cat} при гидролизе химозином.

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

Использование синтетических субстратов, содержащих хромофорную группу, значительно облегчает процесс определения активности протеиназ. Однако для ферментов класса аспартильных протеиназ число предложенных хромофорных субстратов невелико, и методы, основанные на их использовании, недостаточно чувствительны.

Ранее мы сообщали о синтезе хромофорных гексапептидов Dnp-Ala-Ala/Ser-Phe-Phe-Ala-Arg-NH₂, содержащих связь Phe-Phe, чувствительную к действию аспартильных протеиназ [1]. Был предложен метод определения протеолитической активности аспартильных протеиназ с использованием синтезированных субстратов [2]: оценка активности проводилась после разделения гидролизатов на SP-сефадексе по поглощению (360 нм) элюата, содержащего динитрофенил-пептид, который образуется при расщеплении субстрата. Описанный метод отличается простотой контроля за продуктами гидролиза и не требует сложного аппаратного оформления. Метод чувствителен к низким концентрациям ферментов, позволяет определять активность аспартильных протеиназ (рН-оптимум 3.6) в присутствии протеиназ других классов, что дает возможность работать как с чистыми ферментами, так и с грубыми экстрактами. Цель данной работы – синтез и изучение субстратных свойств аналогичных гексапептидов, содержащих в P₂- или P₁'-положениях, соответственно, остатки Glu и Nle, что удовлетворяет

субстратной специфичности аспартильных протеиназ [3]: Dnp-Ala-Glu-Phe-Phe-Ala-Arg-NH₂ (I), Dnp-Ala-Ala-Phe-Nle-Ala-Arg-NH₂ (II). Проведение таких замен аминокислотных остатков предполагало улучшение качества субстратов: мы ожидали повышение растворимости при замене остатка Phe на остаток Glu, а наличие в P₁-положении остатка Nle, в соответствии с литературными данными по расщеплению химозином гексапептидных субстратов, должно было приводить к повышению k_{cat} [4].

Для конденсации трипептидов, полученных химическим путем, был использован описанный нами ранее метод с применением пепсина, сорбированного на целите [1]. Этот метод оказался особенно эффективным при синтезе Glu-содержащего гексапептида, так как позволил избежать дополнительной защиты γ -карбоксильной группы остатка глутаминовой кислоты.

Пепсин, химозин и аспергиллопепсин А расщепляют синтезированные субстраты при рН 2–5 с образованием Dnp-Ala-Ala/Glu-Phe-OH и H-Nle/Phe-Ala-Arg-NH₂. Кинетические характеристики (таблица) были определены при рН 3.6, оптимальном значении для гидролиза Dnp-Ala-Ala/Ser-Phe-Phe-Ala-Arg-NH₂ указанными ферментами [2] (для сравнения приведены кинетические характеристики и этих двух субстратов – (III) и (IV)). Начальные скорости гидролиза являются линейной функцией концентрации ферментов и подчиняются уравнению Михаэлиса–Ментен. Линейная зависимость соблюдается в интервале концентраций пепсина 5–40 нМ, а аспергиллопепсина А и химозина – 20–200 нМ, как и при гидролизе описанных нами ранее субстратов. На осно-

Сокращения: Dnp – 2,4-динитрофенил; TFA – трифторуксусная кислота. Все аминокислоты – L-ряда.

[#] Автор для переписки (тел.: (095) 939-55-41; факс: (095) 939-31-81).

Кинетические характеристики субстратов Dnp-Ala-Xaa-Phe-Yaa-Ala-Arg-NH₂*

Субстрат	Xaa	Yaa	Кинетические характеристики	Фермент		
				пепсин	аспергиллопепсин А	химозин
(I)	Glu	Phe	k_{cat} , с ⁻¹	2.48	0.61	0.83
			K_m , мМ	0.421	0.561	0.812
			k_{cat}/K_m , мМ ⁻¹ с ⁻¹	5.83	1.08	1.02
(II)	Ala	Nle	k_{cat} , с ⁻¹	1.46	0.34	0.13
			K_m , мМ	0.197	0.224	0.167
			k_{cat}/K_m , мМ ⁻¹ с ⁻¹	7.4	1.53	0.78
(III)	Ala	Phe	k_{cat} , с ⁻¹	2.76	0.27	0.52
			K_m , мМ	0.407	0.194	1.09
			k_{cat}/K_m , мМ ⁻¹ с ⁻¹	6.79	1.39	0.48
(IV)	Ser	Phe	k_{cat} , с ⁻¹	3.21	0.36	0.45
			K_m , мМ	0.561	0.220	1.13
			k_{cat}/K_m , мМ ⁻¹ с ⁻¹	5.72	1.65	0.39

* Данные по пептидам (III) и (IV) из работы [2].

вании полученных данных можно сделать вывод, что замена Ala в P₂-положении субстрата (III) на Glu (субстрат (I)), в отличие от замены на Ser (субстрат (IV)), приводит не только к улучшению растворимости субстрата (отсутствует эффект высаливания [2]), но и к значительному увеличению k_{cat} по сравнению с другими субстратами при гидролизе химозином. По величине параметра k_{cat}/K_m субстрат (I) является лучшим среди предложенных субстратов для химозина. Лучшим для пепсина оказался другой синтезированный в данной работе субстрат – (II), а для аспергиллопепсина А – субстрат (IV). Следует подчеркнуть, что введение Nle в P₁'-положение не дало ожидаемого эффекта повышения k_{cat} , но такая замена, очевидно, приводит к образованию более прочных, чем в случае других субстратов фермент-субстратных комплексов с пепсином и химозином, о чем свидетельствуют соответствующие значения K_m (таблица). При этом комплекс субстрата (II) с химозином прочнее, чем с пепсином и аспергиллопепсином А.

Таким образом, новые хромофорные гексапептиды являются эффективными субстратами для аспартильных протеиназ.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использованы кристаллический термолizin (КФ 3.4.24.4), α-химотрипсин (КФ 3.4.21.1), макропористое стекло марки СРG-10, целит 535 (Serva, Германия), DMSO, ацетонитрил (Merk, Германия), DMF и уксусная кислота "ос. ч." (Lecbiopharm, Россия), остальные реактивы марки "х. ч." (Реахим, Россия). Субтилизин-72 (КФ 3.4.21.14)

выделен нами по методике [5]. В работе использовали SP-сефадекс G-50 (Pharmacia, Швеция), препарат пепсина свиньи (КФ 3.4.23.1) очищен по методике [6]. Исходным материалом для выделения аспергиллопепсина А (КФ 3.4.23.6) служил препарат экстракта поверхностной культуры *Aspergillum awamori*, штамм 22 [7]. Химозин (КФ 3.4.23.4) был выделен из препарата сычужного фермента [6].

Аминокислотный анализ выполняли на автоматическом анализаторе Hitachi-835 (Япония) после кислотного гидролиза 5.7 М HCl при 105°C в течение 24 ч.

Dnp-Ala-Ala-Phe-OH, H-Phe-Ala-Arg-NH₂ и аналогичный H-Nle-Ala-Arg-NH₂ синтезированы как описано в работе [1]. Boc-Glu(OMe)-Phe-OMe и Dnp-Ala-Glu(OMe)-Phe-OMe получены карбодимидным методом (аминокислотный анализ Glu 0.9, Phe 1.1); для удаления Boc-защиты использовали 3 М HCl в диоксане, омыление диэфира Dnp-Ala-Glu(OMe)-Phe-OMe проводили по описанной методике [8].

Dnp-Ala-Ala/Glu-Phe-Nle/Phe-Ala-Arg-NH₂ (субстраты (I) и (II)). Синтез проводили по описанной методике [1]. В реакцию вводили 0.38 ммоль Dnp-Ala-Ala/Glu-Phe-OH, 0.19 ммоль 2NBr · H-Nle/Phe-Ala-Arg-NH₂ и 4 г катализатора (пепсин, сорбированный на целите, в 0.5 М цитратном буфере pH 4.5). По окончании реакции катализатор отфильтровывали, промывали на фильтре смесью 17% DMF-ацетонитрил. Фильтрат упаривали досуха, остаток растворяли в 60 мл *n*-бутанола, насыщенного водой, промывали 3% NaHCO₃ (40 мл × 6), 0.05 М NaCl (20 мл × 2) и водой (20 мл × 2). Упари-

вали *n*-бутанол, прибавляли к остатку 50 мл этилацетата и через 15 мин удаляли растворитель декантированием, осадок растворяли в 1 мл TFA, переосаждали добавлением 20 мл этилацетата. Выход Dnp-Ala-Glu-Phe-Phe-Ala-Arg-NH₂ (I) 35 мг (20.5%), Dnp-Ala-Ala-Phe-Nle-Ala-Arg-NH₂ (II) 30 мг (19.3%), аминокислотный анализ Ala 1.04, Glu 1.07, Phe 1.87, Arg 1.05 и Ala 2.17, Phe 0.94, Nle 0.95, Arg 0.93, соответственно.

Буферные растворы. *Приготовление растворов субстрата.* Гексапептид растворяли в DMF и добавляли буфер А (0.1 М уксусная кислота–0.1 М CH₃COONa, pH 3.4 до содержания DMF 20%). Нерастворившийся остаток отфильтровывали. Точную концентрацию субстрата определяли, измеряя поглощение раствора относительно соответствующего буферного раствора. Растворы субстрата готовили последовательным 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-Yaa-Ala-Arg-NH₂. 400 мкл раствора субстрата термостатировали при 37°C в течение 5 мин; прибавляли 100 мкл раствора фермента в буфере Б (25 мМ цитратный буфер, pH 4.8); через 10 мин гидролиз останавливали 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 Б. Удельную активность рассчитывали по формуле:

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

где $A_{\text{оп}}$ – поглощение элюата опытной пробы при 360 нм; $A_{\text{к}}$ – 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 молярный коэффициент поглощения; A_{280} – поглощение раствора фермента.

Кинетические параметры гидролиза субстратов определяли спектрофотометрически при pH 3.6 по описанной выше методике. Количество 2 М NaOH, необходимое для установления pH 6.0 (остановка гидролиза), определяли титрованием 5 мл раствора, аналогичного по составу раствору гидролизата.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Литвинова О.В., Баландина Г.Н., Степанов В.М. // Биоорганическая химия. 1998. Т. 24. С. 10–15.
2. Литвинова О.В., Баландина Г.Н., Степанов В.М. // Биоорганическая химия. 1998. Т. 24. С. 175–178.
3. Зинченко А.А., Руми Л.Д., Антонов В.К. // Биоорганическая химия. 1976. Т. 2. С. 803–810.
4. Visser S., van Rooijen P.I., Schattenkerk C., Rerling K.E. // Biochim. Biophys. Acta. 1977. V. 481. P. 171–176.
5. Гололобов М.Ю., Морозова И.П., Степанов В.М. // Биохимия. 1991. Т. 56. С. 33–40.
6. Соловьева Т.А., Беляев С.В., Степанов В.М. // Химия природ. соединений. 1977. № 3. С. 398–403.
7. Степанов В.М., Лобарева Л.С., Руденская Г.Н., Боровикова В.П., Ковалева Г.Г., Лавренова Г.И. // Биоорганическая химия. 1977. Т. 3. С. 831–835.
8. Гершкович А.А., Кибирев В.К. Химический синтез пептидов. Киев: Наукова думка, 1992.

New Chromophore Substrates of Aspartic Proteases

O. V. Litvinova and G. N. Balandina[#]

Moscow State University, Chemical Faculty, Vorob'evy gory, Moscow, 119899 Russia

Chromophore substrates Dnp-Ala-Glu-Phe-Phe-Ala-Arg-NH₂ and Dnp-Ala-Ala-Phe-Nle-Ala-Arg-NH₂ of aspartic proteases were synthesized by a combination of chemical and enzymic methods. The kinetic parameters of their hydrolysis with pepsin, aspergillopepsin, and chymosin were determined. The introduction of Nle in the P₁' position gives stable enzyme–substrate complexes with pepsin and chymosin. A Glu residue at the P₂ position contributes significantly to an increase in k_{cat} for the chymosin hydrolysis.

Key words: aspartic protease, chromophore substrate, protease activity

[#] To whom correspondence should be addressed; phone: +7(095)939-5541; fax: +7(095)939-3181.