



УДК 577.112.6:577.152.342*31

ПЕПТИДНЫЕ СУБСТРАТЫ С ВНУТРИМОЛЕКУЛЯРНЫМ ТУШЕНИЕМ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ АСПАРТИЛЬНЫХ ПРОТЕИНАЗ

© 2000 г. И. Ю. Филиппова[#], Е. Н. Лысогорская, Г. И. Лавренова,
Е. С. Оксенойт, Л. И. Суворов, В. В. Старовойтова

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

Поступила в редакцию 01.04.99 г. Принята к печати 01.06.99 г.

Предложена серия флуорогенных тетра-, пента- и гексапептидных субстратов с внутримолекулярным тушением флуоресценции общей формулы $Abz-X-Phe-Phe-Y-Ded$ или $(-pNA)$, где $X = Ala, Ala-Ala, Val-Ala$; $Y = -, Ala, Ala-Ala$. Определены кинетические параметры гидролиза субстратов пепсином, катепсином D, гастриксином человека, пепсином свиньи, химозином теленка, аспергиллопепсином A. Показано, что синтезированные соединения – эффективные субстраты аспартильных протеиназ различного происхождения.

Ключевые слова: флуорогенные пептидные субстраты; аспартильные протеиназы.

ВВЕДЕНИЕ

Аспартильные протеиназы (КФ 3.4.23.) представляют собой большой класс пептидгидролаз, содержащихся в различных организмах – от ретровирусов до человека и выполняющих многообразные физиологические функции. Только у млекопитающих в настоящее время известно шесть иммунологически различных протеиназ этого класса: пепсин, гастриксин, химозин (основные протеолитические ферменты желудочного сока), катепсин D – лизосомный фермент тканей, ренин – фермент, секретлируемый почками в кровяное русло и регулирующий кровяное давление, катепсин E – внутриклеточная протеиназа, функции которой изучены слабо.

Несмотря на высокую степень гомологии первичных структур, сходство пространственной организации и общность механизма действия аспартильных протеиназ, каждый фермент имеет специфические особенности структуры, в частности в области активного центра, определяющие их физиологические функции.

Зона активного центра всех аспартильных протеиназ имеет протяженность около 30 Å и формируется аминокислотными остатками, инвариантными практически для всех протеиназ этого класса; в ней располагаются 5–7 а. о. субстрата от P_4 до P'_3 . Все эти ферменты расщепляют связь между гидрофобными остатками в положениях P_1 и P'_1 [1–5]. Кинетический анализ гидролиза

серий синтетических субстратов в сочетании с данными рентгеноструктурного анализа и компьютерным моделированием позволяет выявить тонкие различия в структурной организации аспартильных протеиназ и расширить представления о функционировании этого класса ферментов [1, 6–8].

Для исследования специфичности аспартильных протеиназ синтезировано большое количество пептидных субстратов разнообразной длины и состава, причем, как правило, такие соединения повторяли или имитировали структуру природных субстратов. Так, например, для химозина до настоящего времени описаны только пептиды, являющиеся укороченными фрагментами к-казеина – природного субстрата этого фермента [9].

Данном был предложен пептид Pro-Thr-Glu-Phe-Phe(NO₂)-Arg-Leu, построенный на основании анализа частоты встречаемости той или иной аминокислоты в положениях P_4 – P'_3 гидролизуемых протеиназами белков. Сконструированный по такому принципу “универсальный” субстрат (S^u) расщеплялся различными аспартильными протеиназами: пепсином, катепсином D, химозином, гастриксином, рядом грибных протеиназ [10, 11]. Это позволило провести систематический кинетический анализ аспартильных протеиназ, хотя значения кинетических констант гидролиза “универсального” субстрата для всех исследованных ферментов оказались хуже, чем для субстратов, специфических для каждого фермента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В нашей лаборатории ранее получен и исследован гексапептидный флуорогенный субстрат с внутримолекулярным тушением флуоресценции

Сокращения: Abz – 2-аминобензойная кислота; pNA – л-нитроанилин; Ded – 2,4-динитрофенилэтилендиамин; Dnp – 2,4-динитрофенил. Все аминокислоты L-ряда.

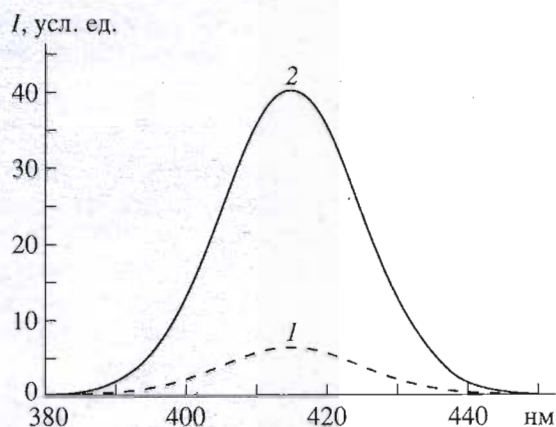
[#] Автор для переписки (e-mail: irfilipp@genebee.msu.su; факс: (095) 932-88-46).

Abz-Ala-Ala-Phe-Phe-Ala-Ala-Ded (I) [12]. Наличие в молекуле субстрата флуорофора и тушителя позволяло проводить прямое измерение скоростей гидролиза по изменению флуоресценции. Субстрат (I) оказался эффективным для определения активности аспартильных протеиназ человека (пепсина, гастриксина, катепсина D), пепсина свиньи, а также протеиназы ВИЧ. Высокая чувствительность, простота синтеза, соответствие структуры основному требованию специфичности ферментов этого класса создали предпосылки для получения серии флуорогенных субстратов подобного строения с разной длиной для сравнительного изучения аспартильных протеиназ различного происхождения, что и явилось задачей настоящей работы. Структура исследованных соединений представлена ниже:

P_4	P_3	P_2	P_1^*	P_1'	P_2'	P_3'	P_4'	
								Abz-Ala-Ala-Phe-Phe-Ala-Ala-Ded (I)
								Abz-Ala-Ala-Phe-Phe-Ala-Ala-pNA (II)
								Abz-Val-Ala-Phe-Phe-Ala-Ala-Ded (III)
								Abz-Ala-Ala-Phe-Phe-Ala-Ala-Ded (IV)
								Abz-Ala-Phe-Phe-Ala-Ala-Ded (V)
								Abz-Ala-Ala-Phe-Phe-Ded (VI)
								Abz-Ala-Ala-Phe-Phe-pNA (VII)

Субстраты (I)–(VII) содержат в положениях P_1 и P_1' остатки фенилаланина, что соответствует специфичности всех аспартильных протеиназ, в положениях P_2 , P_2' и P_3' – остатки аланина, в положении P_3 – остатки аланина или валина. Следует отметить, что по результатам статистического анализа специфичности пепсина остатки этих аминокислот в данных положениях пептидов и белков не препятствуют эффективному связыванию субстрата в активном центре фермента [13]. Донором флуоресценции в указанных соединениях является остаток 2-аминобензойной (или антралиновой) кислоты (Abz), акцептором – остаток 2,4-динитрофенилэтилендиамина (Ded) или *n*-нитроанилина (pNA). После разрыва пептидной связи в субстрате происходит отщепление фрагмента молекулы, содержащего группу-тушитель, и наблюдается резкое разгорание флуоресценции, что обеспечивает быстроту и высокую чувствительность измерений.

Синтез пептидов (I)–(VII) проводили сочетанием химических и ферментативных методов [12, 14]. Использование ферментов на заключительных стадиях синтеза гарантировало оптическую чистоту, облегчало выделение и очистку гидрофобных пептидов. Все соединения гидролизовались пепсином, гастриксином и катепсином D человека, пепсином свиньи, химозином телянка и грибной протеиназой аспергиллопепсином А по связи Phe-Phe (определено с помощью ТСХ). Гидролиз



Спектр флуоресценции Abz-Ala-Phe-Phe-Ala-Ala-Ded (V) до (1) и после (2) гидролиза пепсином человека. Гидролиз проводили в 0.1 М цитратном буфере, pH 3.6, содержащем 1% диметилформамида. [E] 2.9 нМ, [S] 5 мкМ.

субстратов сопровождался разгоранием флуоресценции при $\lambda_{\text{возб}}$ 340 нм и $\lambda_{\text{исп}}$ 415 нм (см. для примера рисунок). Степень разгорания флуоресценции составляла: для соединения (I) – 4, (II) – 1.5, (III) – 6, (IV) – 4.5, (V) – 6.5, (VI) – 8, (VII) – 4.5.

pH-Оптимальм гидролиза субстратов перечисленными ферментами находился в области 3.5–3.7. Начальная скорость гидролиза субстратов – линейная функция концентрации ферментов в диапазоне 100–1000 нг/мл и подчиняется уравнению Михаэлиса–Ментен. Поскольку флуорогенный метод накладывает определенные ограничения на содержание субстратов (при высокой концентрации субстратов проявляется эффект внутреннего фильтра), мы проводили эксперименты при [S] = 0.5–10 мкМ, когда сохраняется линейная зависимость между концентрацией субстрата и разгоранием флуоресценции. Кинетические константы рассчитывали, исходя из зависимости начальной скорости от концентрации субстрата в прямых и двойных обратных координатах по программе Enzfitter.

Кинетические характеристики гидролиза флуорогенных субстратов (I)–(VII) различными аспартильными протеиназами представлены в табл. 1.

Все исследованные пептиды хорошо гидролизовались пепсином свиньи, но лучшими субстратами этого фермента (по величине k_{cat}/K_m) являлись пентапептид (IV) и гексапептиды (I) и (III). Замена более протяженного остатка 2,4-динитрофенилэтилендиамина (Ded) в субстрате (I) на остаток *n*-нитроанилина (pNA) в субстрате (II) сопровождалась ухудшением связывания (приблизительно в 4 раза), но приводила к увеличению скорости гидролиза. Введение остатка валина в положение P_3 (субстрат (III)) ухудшало субстратные свойства. Пентапептид (V) лучше всех исследованных

Таблица 1. Кинетические характеристики гидролиза субстратов (I)–(VII) аспартильными протеиназами (37°C, 0.1 М цитратный буфер, pH 3.6, содержащий 1% диметилформамида)*

Протеиназа	(I)	(II)	(III)	(IV)	(V)	(VI)	(VII)	Su ^{3*}
K_m , мМ								
Пепсин свиньи	0.0030 ^{2*}	0.0111 ^{2*}	0.0074	0.0047	0.0016	0.0056	0.0036	0.13
Пепсин человека	0.0129 ^{2*}	0.0058 ^{2*}	0.0051	0.0050	0.0027	0.0044	0.0048	н. о.
Катепсин D человека	0.0019 ^{2*}	0.0026 ^{2*}	0.0049	0.0040	0.0053	0.0063	0.0099	0.84
Гастриксин человека	0.0085 ^{2*}	0.0078 ^{2*}	0.0033	0	0.0131	0	0	0.098
Химозин теленка	0.0070	0.0039	н. о.	0.0022	0.0018	0.0031	0.0018	0.46
Аспергиллопепсин А	0.0046	0.0020	н. о.	0.0020	0.0060	0.0090	0.0076	3 ^{4*}
k_{cat} , с ⁻¹								
Пепсин свиньи	32.0 ^{2*}	122.0 ^{2*}	27.0	50.0	10.9	7.0	21.2	94
Пепсин человека	44.6 ^{2*}	22.8 ^{2*}	1.3	3.6	1.3	2.2	5.2	н. о.
Катепсин D человека	5.2 ^{2*}	0.66 ^{2*}	4.0	5.0	1.7	1.0	3.4	60
Гастриксин человека	0.37 ^{2*}	0.14 ^{2*}	0.13	0	0.30	0	0	55
Химозин теленка	1.6	1.4	н. о.	0.8	0.14	0.27	0.48	51
Аспергиллопепсин А	6.3	4.2	н. о.	2.9	4.4	0.90	2.5	12 ^{4*}
k_{cat}/K_m , мМ ⁻¹ с ⁻¹								
Пепсин свиньи	10670 ^{2*}	11100 ^{2*}	3649	10638	6800	1250	5889	815
Пепсин человека	3568 ^{2*}	3897 ^{2*}	257	712	478	491	1075	н. о.
Катепсин D человека	2737 ^{2*}	254 ^{2*}	816	1258	311	151	340	70
Гастриксин человека	44 ^{2*}	18 ^{2*}	39	0	23	0	0	561
Химозин теленка	229	359	н. о.	364	77	87	267	111
Аспергиллопепсин А	1359	1976	н. о.	1547	723	100	329	4.0 ^{4*}

* н. о. – кинетические параметры не определяли.

^{2*} Данные из работы [12].

^{3*} Литературные данные [6] для “универсального” субстрата Pro-Thr-Glu-Phe(NO₂)-Phe-Arg-Leu.

^{4*} Литературные данные [6] для аспартильной протеиназы из *Endothia parasitica*.

дованных пептидов связывался с пепсином свиньи, однако значение k_{cat} у него оказалось ниже, чем у гексапептидов (I) и (II) и пентапептида (IV), содержащего в отличие от (V) один остаток аланина справа от расщепляемой связи.

Для пепсина человека наиболее эффективными субстратами оказались гексапептиды (I) и (II), хотя сравнение величин k_{cat}/K_m показывает, что им они гидролизировались несколько хуже, чем пепсином свиньи. Следует отметить, что гексапептид (III), содержащий остаток валина, по кинетическим параметрам оказался наихудшим субстратом. Пентапептид (IV) расщеплялся пепсином человека в отличие от пепсина свиньи довольно медленно, кинетические константы гидролиза пента- и гексапептидов (субстраты (IV), (V) и (III)) мало отличались.

Для катепсина D лучшим субстратом являлся гексапептид (I). Замена остатка Ded на pNA оказалась критичной: скорость гидролиза катепсином D для гексапептида (II) в 8 раз ниже, чем для соединения (I). Введение остатка валина в положение P₃ пептида (III) ухудшало связывание и несколько снижало k_{cat} по сравнению с субстратом (I). Пентапептид (IV), в котором группа-гущитель отстоит от расщепляемой связи на один остаток аланина, являлся неплохим субстратом

катепсина D, в то время как “укорачивание” гексапептида (I) на один остаток аланина в N-концевой части между флуорофором и расщепляемой связью (пептид (V)) ухудшало связывание и уменьшало в 3 раза каталитическую константу.

Гастриксин по сравнению с пепсинами и катепсином D проявлял низкую активность по отношению к исследованным субстратам. Тетрапептиды (VI) и (VII) вообще не гидролизировались этим ферментом. Из пентапептидов гастриксин гидролизовал только пептид (V), в котором остаток Ded отделен от расщепляемой связи двумя остатками аланина, и не гидролизировал пептид (IV), у которого в C-концевой части находится один остаток аланина. Замена в гексапептиде (I) остатка Ded на pNA (субстрат (II)) практически не сказывалась на связывании, но приводила к уменьшению в 2.5 раза каталитической константы. Введение остатка валина в положение P₃ (гексапептид (III)) существенно улучшало связывание субстрата, но в то же время приблизительно в 3 раза понижало каталитическую константу (по сравнению с (I)). Каталитические константы расщепления флуорогенных пептидов (I)–(III), (V) (по соотношению величин k_{cat}/K_m) у гастриксина примерно на два порядка ниже, чем у пепсинов.

Таблица 2. Гипотетическое расположение аминокислотных остатков субстратов и пепстатина в зоне связывания (S_4-S_5') аспартильных протеиназ*

Номер субстрата	P_4	P_3	P_2	P_1	P_1'	P_2'	P_3'	P_4'	P_5'
Пепстатин [5]	Iva	Val	Val	Sta		Ala	Sta		
S^u [6]	Pro	Thr	Glu	Phe	Phe(NO ₂)	Arg	Leu		
(I)	Abz	Ala	Ala	Phe	Phe	Ala	Ala	NH-CH ₂ -CH ₂ -NH-Dnp	
(II)	Abz	Ala	Ala	Phe	Phe	Ala	Ala	pNA	
(III)	Abz	Val	Ala	Phe	Phe	Ala	Ala	NH-CH ₂ -CH ₂ -NH-Dnp	
(IV)	Abz	Ala	Ala	Phe	Phe	Ala	NH-CH ₂ -CH ₂ -NH-Dnp		
(V)		Abz	Ala	Phe	Phe	Ala	Ala	NH-CH ₂ -CH ₂ -NH-Dnp	
(VI)	Abz	Ala	Ala	Phe	Phe	NH-CH ₂ -CH ₂ -NH-Dnp			
(VII)	Abz	Ala	Ala	Phe	Phe	pNA			

* S^u – “универсальный” субстрат; Iva – изовалерил(3-метилмасляная кислота); Sta – статин ((4S, 3S)-4-амино-3-гидрокси-6-метилгептановая кислота).

Субстратами химозина обычно являются пептиды – фрагменты к-казеина, однако по данным Виссера [9], фермент неактивен по отношению к три- и тетрапептидам к-казеина, а пентапептиды расщепляет крайне медленно. Мы показали (табл. 1), что тетрапептиды (VI) и (VII) гидролизировались химозином, хотя и с небольшими скоростями, при этом замена С-концевого остатка pNA в субстрате (VII) на Ded в субстрате (VI) немного ухудшала связывание и снижала скорость расщепления. Пентапептиды (V) и (IV) одинаково хорошо связывались с ферментом, но пептид (IV) оказался лучшим субстратом химозина и расщеплялся им примерно в 6 раз быстрее, чем пентапептид (V).

Грибная протеиназа аспергиллопепсин А гидролизовала все субстраты. Кинетические характеристики аспергиллопепсина А по гидролизу пентапептида (IV) и гексапептидов (I) и (II) близки (как это наблюдалось и для пепсина свиньи).

Сравнивая действие различных аспартильных протеиназ на исследованные флуорогенные субстраты, можно отметить, что наибольшие скорости расщепления субстратов характерны для пепсинов свиньи и человека. Менее активны катепсин D и аспергиллопепсин А. Со значительно меньшей скоростью эти субстраты расщеплялись химозином. По-видимому, химозин предъявляет большие требования к структуре субстрата, чем пепсин и катепсин. Очень слабую активность по отношению к этим субстратам проявлял гастриксин. Каталитические константы гидролиза “универсального” субстрата исследованными ферментами, как правило, выше, чем для изученных флуорогенных субстратов (табл. 1), но сопоставимы с параметрами гидролиза субстратов (I) и (II) для пепсина свиньи и аспергиллопепсина.

Для всех исследованных ферментов по отношению к субстратам (I)–(VII) наблюдались низкие константы Михаэлиса, что свидетельствовало об их хорошем связывании. Нужно отметить, что “универсальный” субстрат связывался с теми

же ферментами на несколько порядков хуже. Возможно, что определенное влияние на эффективность связывания флуорогенных субстратов оказывают остатки pNA или Ded, -NH-группа которых может образовывать дополнительные водородные связи в субстратсвязывающей области ферментов в положениях S_3-S_5' (табл. 2). В литературе практически отсутствуют данные о специфичности этих участков связывания. Обычно анализ взаимодействий субстрат-фермент проводится на основании данных рентгеноструктурного анализа комплексов ферментов с субстратоподобными ингибиторами (пепстатинами), позволяющими оценить взаимодействие только с участками S_2-S_3' . Появление свободной аминогруппы в положении P_4 из-за наличия в молекуле субстрата остатка антралиловой кислоты может благоприятствовать эффективному взаимодействию, поскольку в зоне связывания S_4-S_5 многих аспартильных протеиназ содержатся остатки дикарбоновых кислот [5, 14]. Так, было показано, что удлинение “универсального” субстрата на один остаток лизина с N-конца привело к улучшению кинетических констант на порядок [16].

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали очищенные препараты пепсина свиньи (КФ 3.4.23.1), аспергиллопепсина А (КФ 3.4.23.6) [17], химозина теленка (КФ 3.4.23.4), выделенного из сычужного фермента по методу [18] и очищенного на бацитрацин-сефарозе, пепсина человека (КФ 3.4.23.1), катепсина D человека (КФ 3.4.23.5) и гастриксина человека (КФ 3.4.23.3), любезно предоставленные С.В. Гульником и Н.И. Тарасовой (Национальный институт рака, Фредерик, США).

Синтез соединений (I)–(VII) проводили сочетанием химических и ферментативных методов по методикам [12, 14].

Поглощение исследуемых растворов измеряли на спектрофотометре Specord UV VIS (Германия). Флуоресцентные измерения проводили на спектрофлуориметре Hitachi MPF-4 (Япония).

Определение начальных скоростей гидролиза субстратов. Раствор субстрата (3 мл, 0.5–10 мкМ) в 0.1 М ацетатном буфере, содержащем 1% диметилформамида, помещали в термостатированную при 37°C кювету и измеряли начальную флуоресценцию при $\lambda_{\text{возб}}$ 340 нм и $\lambda_{\text{исп}}$ 415 нм. Затем добавляли 50 мкл раствора фермента требуемой концентрации в 0.1 М ацетатном буфере, быстро перемешивали и регистрировали флуоресценцию через определенные промежутки времени. Для измерения флуоресценции продуктов гидролиза 3 мл раствора субстрата инкубировали 3 ч с раствором фермента. Начальную скорость гидролиза вычисляли по формуле:

$$v = I_t[S_0]/(I - I_0)t,$$

где v – начальная скорость гидролиза (мкМ/мин); $[S]_0$ – концентрация субстрата (мкМ); I – флуоресценция при полном гидролизе субстрата ферментом; I_0 – начальная флуоресценция субстрата; I_t – флуоресценция раствора субстрата через время t после добавления фермента; t – время гидролиза (мин).

Авторы выражают признательность профессору Н.С. Андреевой (ИМБ РАН) за ценные дискуссии в ходе обсуждения работы.

Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (грант № 97-03-33039а).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kay J., Dunn B.M. // Scand. J. Clin. Lab. Invest. 1992. V. 52. P. 23–30.
2. Sielecki A.R., Fedorov A.A., Boodhoo A., Andreeva N.S., James M.N.G. // J. Mol. Biol. 1990. V. 214. P. 143–170.
3. Blundell T.L., Jenkins J.A., Sewell B.T., Pearl L.H., Cooper J., Tickle I.J., Veerapandian B., Wood S.P. // J. Mol. Biol. 1990. V. 211. P. 919–941.
4. Baldwin E.T., Bhat T.N., Gulnik S., Hosur M.V., Sowder H R.C., Cachau R.E., Collins J., Silva A.M., Erickson J.W. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1993. V. 90. P. 6796–6800.
5. Fujinaga M., Chernaya M.M., Tarasova N.I., Mosimann S.C., James N.G. // Prot. Sci. 1995. V. 4. P. 960–972.
6. Dunn B.N., Jimenez M., Parten B.F., Valler M.J., Rolph C.E., Kay J. // Biochem. J. 1986. V. 237. P. 899–906.
7. Gulnik S.V., Suvorov L.I., Majer P., Collins J., Kane B.P., Johnson D.G., Erickson J.W. // FEBS Lett. 1997. V. 413. P. 379–384.
8. Matayoshi E.D., Wang G.T., Krafft G.A., Erickson J.W. // Science. 1990. V. 247. P. 954–958.
9. Visser S., Slangen C.J., van Rooijen P.J. // Biochem. J. 1987. V. 244. P. 553–558.
10. Dunn B.M., Kay J. // Biochem. Soc. Trans. 1985. V. 13. P. 1041–1043.
11. Pohl J., Dunn B.M. // Biochemistry. 1988. V. 27. P. 4827–4834.
12. 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.
13. Зинченко А.А., Руми Л.Д., Антонов В.К. // Биоорган. химия. 1976. Т. 2. С. 803–810.
14. Филиппова И.Ю., Лысогорская Е.Н., Оксенойт Е.С., Комаров Ю.Е., Степанов В.М. // Биоорган. химия. 1986. Т. 12. С. 1172–1180.
15. Cooper J.B., Foundling S.I., Blundell T.L., Boger J., Jupp R.A., Kay J. // Biochemistry. 1989. V. 28. P. 8596–8603.
16. Fusek M., Lin X., Tang J. // J. Biol. Chem. 1990. V. 265. P. 1496–1501.
17. Ковалева Г.Г., Юсупова М.П., Баландина Г.Н., Лысогорская Е.Н., Степанов В.М. // Биохимия. 1977. Т. 42. С. 534–539.
18. Соловьева Т.А., Беляев С.В., Степанов В.М. // Химия природн. соед. 1977. № 3. С. 398–403.

A Study of Aspartyl Proteases Using Intramolecularly Quenched Fluorogenic Peptide Substrates

I. Yu. Filippova[#], E. N. Lysogorskaya, G. I. Lavrenova,
E. S. Oksenoit, L. I. Suvorov, and V. V. Starovoitova

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

A series of fluorogenic tetra-, penta-, and hexapeptide substrates of the general structure Abz-X-Phe-Phe-Y-Ded (or -pNa in place of -Ded), where X = Ala, Ala-Ala, or Val-Ala and Y = -, Ala, or Ala-Ala, were proposed. Kinetic parameters of hydrolysis of these substrates by pepsin, cathepsin D, human gastricsin, pig pepsin, calf chymosin, and aspergillopepsin A were determined. The compounds synthesized proved to be effective substrates for aspartyl proteases of diverse origins.

Key words: aspartyl proteases, fluorogenic peptide substrates

[#] To whom correspondence should be addressed; fax: +7 (095) 932-8846; e-mail: irfilipp@genebee.msu.su.

For the full text of English translation of this article, see *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2000, vol. 26, no. 3. It is also available (free) in PDF format through the Web Site <http://www.maik.rssi.ru/>.