



[УДК 577.156.41]

КИНЕТИЧЕСКИЙ И ТЕРМОДИНАМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ
СПЕЦИФИЧНОСТИ ПЕПСИНА

Зинченко А. А., Рули Л. Д., Антонов В. Ю.

*Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина
Академии наук СССР, Москва*

Осуществлен синтез и исследована кинетика гидролиза 14 новых субстратов свиного пепсина, содержащих нитрогруппу в ароматическом кольце фенилаланина и γ -аминопропилморфолиновую С-защитную группировку. Установлена зависимость между каталитическими константами скорости ($k_{\text{кат}}$ и $k_{\text{кат}}/K_m$) и суммарными «индексами специфичности», полученными методом статистического анализа катализируемого пепсином гидролиза белков. Исследована температурная зависимость констант связывания и скорости гидролиза ди-, три- и тетрапептидных субстратов. Показано, что различия в скоростях гидролиза этих субстратов обусловлены изменением энтальпии активации.

Специфичность свиного пепсина (КФ 3.4.23.1) в отношении гидролиза пептидных связей в белках может быть охарактеризована индексом специфичности S_{ij} [1], величина которого указывает на предпочтительность, индифферентность или нежелательность данного аминокислотного остатка (i) в данном положении (j) гидролизуемого пептидного фрагмента. Интересно было выяснить, насколько этот индекс характеризует кинетические параметры гидролиза синтетических субстратов. С этой целью мы изучили кинетику катализируемого пепсином гидролиза серии синтетических пептидов, построенных по предложенному нами ранее [2] принципу, т. е. содержащих остаток γ -аминопропилморфолина и нитрогруппу в пара-положении фенильного кольца фенилаланина. Эти пептиды были получены обычными методами пептидной химии (см. «Экспериментальную часть»), а скорость их гидролиза измерялась спектрофотометрически при pH 4 и температуре 37°. В табл. 1 приведены значения $\Delta\varepsilon_{320}$ (разность экстинкций субстрата и продуктов гидролиза), $k_{\text{кат}}$, K_m и их отношения ($k_{\text{кат}}/K_m$) для вновь синтезированных соединений, а также ряда веществ, описанных нами ранее [2, 3]. Диапазон изменений кинетической специфичности ($k_{\text{кат}}/K_m$) составляет 10^5 , причем значения K_m изменяются не более чем на порядок. Это еще раз демонстрирует отмечавшуюся рядом авторов [4, 5] роль вторичных взаимодействий в пепсиновом катализе. Действительно, удлинение пептидной цепи субстрата резко увеличивает значение $k_{\text{кат}}$, мало сказываясь на величине сродства фермента к субстрату. В ряду дипептидов варьирования в структуре аминокислотных остатков изменяют также главным образом каталитическую константу. Снижение гидрофобности остатка в положении P_1' качественно коррелирует со снижением кинетиче-

Сокращения: Phe_N — *n*-нитро-*L*-фенилаланин. АРМ — γ -морфолинопропиламид. ОР4Р — 1-окси-3(4-пиридино)-пропан.

Таблица 1

Кинетические параметры катализируемого пептином гидролиза пептидов
5% (об.) диметилформамида, 37°

| № соедине- ний | Субстрат | | | | | | | | | | $\Delta\epsilon_{233}$ | $[S] \cdot 10^3, M$ | $[E] \cdot 10^5, M$ | $K_{10} \cdot 10^3, M$ | $K_{кат} \cdot$ мин ⁻¹ | $K_{кат}/K_{cat}$ мин ⁻¹ · ММ ⁻¹ |
|-------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|------|-------|------------------------|---------------------|---------------------|------------------------|--------------------------------------|---|
| | P ₄ | P ₃ | P ₂ | P ₁ | P _{1'} | P _{2'} | P _{3'} | P _{4'} | | | | | | | | |
| 1 | Z | Ala | Ala | Phen | Phen | Ala | Phen | Phen | Phen | Ala | APM* | Ala | OMe | 2630±80 | 1740±12 | |
| 2 | Z | Leu | Val | Phen | Phen | Val | Phen | Ala | Ala | Ala | APM | Phen | OMe | 258±31 | 439±20 | |
| 3 | | | Ac | Phen | Phen | Ac | Phen | Phen | Phen | Ala | APM | Phen | OMe | 313±26 | 366±8 | |
| 4 | | Z | Val | Phen | Phen | Val | Phen | Ala | Ala | APM | APM | Ala | OMe | 19,07±0,4 | 111±4,0 | |
| 5 | | Z | Val | Phen | Phen | Val | Phen | Ala | Ala | APM | APM | Phen | OMe | 33,7±1,8 | 34,9±0,65 | |
| 6 | | Z | Asn | Phen | Phen | Gly | Phen | Phen | Phen | APM* | APM | Phen | OMe | 27,0±1,5 | 32,3±0,7 | |
| 7 | | Z | Gly | Phen | Phen | Gly | Phen | Phen | Phen | APM | APM | Phen | OMe | 57,0±20,0 | 14,7±7,7 | |
| 8 | | | Z | Phen | Phen | Z | Phen | Phen | Phen | APM | APM | Phen | OMe | 3,41±0,17 | 4,2±0,4 | |
| 9 | | | Ac | Phen | Phen | Ac | Phen | Phen | Phen | APM* | APM | Phen | OMe | 6,42±0,22 | 2,58±0,24 | |
| 10 | | | Z | Phen | Phen | Z | Phen | Phen | Phen | APM | APM | Phen | OMe | 2,04±0,05 | 2,33±0,02 | |
| 11 | | | Z | Phen | Phen | Z | Phen | Phen | Phen | Arg | Arg | Phen | OMe | 2,03±0,04 | 2,21±0,02 | |
| 12 | | | Z | Leu | Z | Z | Leu | Phen | Phen | APM | APM | Phen | OMe | 0,65±0,01 | 0,88±0,01 | |
| 13 | | | Z | Phen | Z | Z | Phen | Val | Val | APM | APM | Val | OMe | 0,60±0,04 | 0,77±0,02 | |
| 14 | | | Z | Phen | Z | Z | Phen | Glu | Glu | APM | APM | Glu | OMe | 0,38±0,01 | 0,36±0,01 | |
| 15 | | | Z | Phen | Z | Z | Phen | Ala | Ala | APM | APM | Ala | OMe | 0,41±0,02 | 0,32±0,01 | |
| 16 | | | Z | Ala | Z | Z | Ala | Phen | Phen | APM** | APM** | Ala | OMe | 0,12±0,01 | 0,085±0,001 | |
| 17 | | | Z | Phen | Z | Z | Phen | Gly | Gly | APM | APM | Gly | OMe | | | |
| 18 | | | Z | Val | Z | Z | Val | Phen | Phen | APM | APM | Phen | OMe | | | |

В этих условиях не гидролизуются

* Литературные Данные (см. [2, 3]).
** Без добавлений диметилформамида.

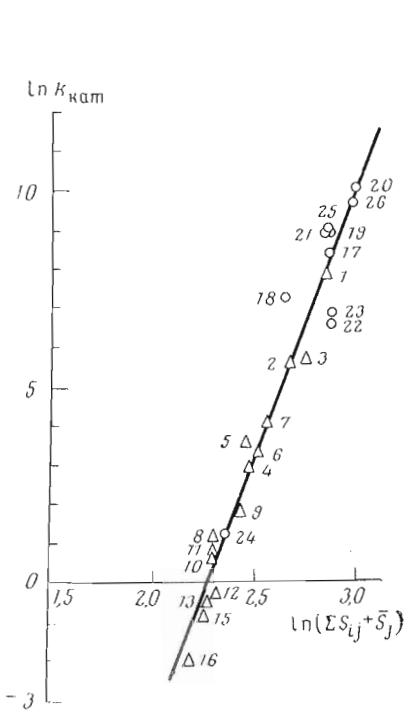


Рис. 1

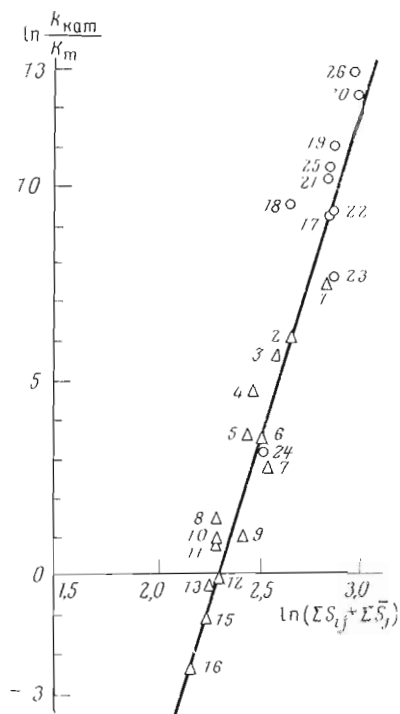


Рис. 2

Рис. 1. Зависимость константы скорости от суммарного «индекса специфичности». Соед. (1) — (16) соответствуют нумерации табл. 1, ред. (17) — (26) — см. табл. II в работе [6]. Величины S_{ij} приведены в работе [1]. Индекс ацетильной группы принимали равным нулю, $S_{Me,+4} = 1$. Для соединения (24) считали, что остаток ZGly ферментом не связывается

Рис. 2. Зависимость $k_{кат}/K_m$ от суммарного «индекса специфичности». Обозначение то же, что и на рис. 1

ской специфичности. В положении P_1 такой корреляции, по-видимому, нет. Характер аминокислотного остатка в положении P_1' имеет меньшее значение для скорости расщепления, чем структура остатка в P_1 . Так, замена остатка фенилаланина на остаток аланина в P_1 даже увеличивает $k_{кат}$, хотя и ухудшает связывание (табл. 1, соединения (4) и (5)). В ряду дипептидов такие замены сильнее сказываются на каталитических константах, чем замены в трипептидах.

Сравнение соединений (8) и (11) показывает, что остаток γ -аминопропиломорфолина вносит примерно такой же вклад в специфичность, как и остаток метилового эфира аргинина. По-видимому, положительный заряд этих остатков взаимодействует с отрицательно заряженной группой связывающего участка активного центра фермента (ср. [2]).

Чтобы выявить соответствие кинетических параметров исследованных субстратов и индекса специфичности, мы вычислили для соединений, приведенных в табл. 1, суммарный индекс специфичности ($\Sigma S_{ij} + \Sigma \bar{S}_j$) [1], где \bar{S}_j — значение среднего для всех остатков индекса данного положения; при этом остатку γ -аминопропиломорфолина приписывали индекс остатка аргинина, а бензилоксикарбонильной группе — индекс остатка фенилаланина. Индексы специфичности для всех остатков в положениях от P_5 до P_5' приведены в работе [1].

Как видно из рис. 1 и 2, наблюдается хорошая корреляция ($r \sim 0.974$) суммарных индексов специфичности и каталитических констант ($k_{кат}$)

в логарифмических координатах. Эта зависимость описывается уравнением

$$\ln k_{\text{кат}} = 13,75 \ln (\Sigma S_{ij} + \Sigma \bar{S}_j) - 31,34.$$

Несколько худшая корреляция ($r \sim 0,952$) наблюдается между величинами $\ln (\Sigma S_{ij} + \Sigma \bar{S}_j)$ и $\ln (k_{\text{кат}}/K_m)$. Здесь корреляционное уравнение

$$\ln (k_{\text{кат}}/K_m) = 16,13 \ln (\Sigma S_{ij} + \Sigma \bar{S}_j) - 36,77.$$

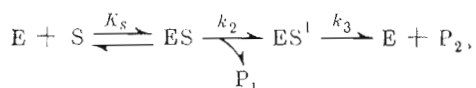
Таким образом, индекс специфичности позволяет априори оценить значения кинетических параметров пепсинового гидролиза пептидов.

На рис. 1 и 2 кроме наших результатов занесены данные, взятые из статьи [6]. Соединениям (17) — (26) на рисунках соответствуют вещества № 1, 3, 5, 12—15, 18, 19, 22, приведенные в табл. II названной работы, из которой взяты кинетические параметры их гидролиза. Остатку ОР4Р приписан индекс специфичности $S_{\text{ОР4Р}, +2} = 3,53$. Данные хорошо укладываются на прямую, не изменяя ее наклона. Это является хорошим свидетельством в пользу общего характера данной зависимости.

Чтобы выяснить причины значительного вклада вторичной специфичности в катализ пепсином, мы исследовали температурную зависимость констант $k_{\text{кат}}$, K_m и $k_{\text{кат}}/K_m$ для гидролиза трех субстратов: дипептида (8), трипептида (5) и тетрапептида (2). Каталитическая константа этих соединений увеличивается при 37° при переходе от ди- к тетрапептиду на два порядка.

Оказалось, что график Аррениуса для тетрапептида в отличие от графиков для ди- и трипептидов проявляет заметную нелинейность в области низких температур. Это наблюдается для зависимостей $\ln k_{\text{кат}}$ и $\ln (k_{\text{кат}}/K_m)$ от $1/T$, но не для зависимости $\ln K_m$, которая линейна и мало меняется с температурой.

Если процесс пепсинового гидролиза тетрапептида протекает по трехстадийной схеме:



где ES' — промежуточный комплекс («амино-фермент» или «ацил-фермент»), то наблюдаемую нелинейность можно было бы объяснить изменением при низких температурах определяющей скорость стадии процесса (ср. [7]). Однако в этом случае следовало бы ожидать, что нелинейность будет проявляться для зависимости $\ln K_m$ от $1/T$, так как в случае $k_3 \ll k_2 K_m = K_s k_3/k_2$, а при $k_3 \gg k_2 K_m = K_s$. График зависимости $\ln k_{\text{кат}}/K_m$ от $1/T$ ($= \ln k_2/K_s$) не должен при этом отклоняться от линейного. В нашем же случае наблюдается противоположная картина (см. рис. 3, 4).

Другой причиной нелинейности графика Аррениуса может быть индуцированное субстратом конформационное изменение фермента. В этом случае больших отклонений следует ожидать для более специфических субстратов [8], так как последние связываются с белком, реализуя большее число контактов. Следует отметить, что конформационные изменения пепсина при связывании специфических субстратов [9] и активаторов [5] были зарегистрированы физико-химическими методами.

При сравнении термодинамических параметров активации гидролиза исследованных соединений, т. е. изменения стандартных свободных энергий, энтальпии и энтропии комплексообразования фермента с субстратами (табл. 2), обращает на себя внимание то обстоятельство, что основной вклад в свободную энергию активации вносит отрицательное изменение энтропии активации. Неблагоприятное изменение энтропии, возможно, обусловлено конформационными изменениями фермента в переходном состоянии реакции.

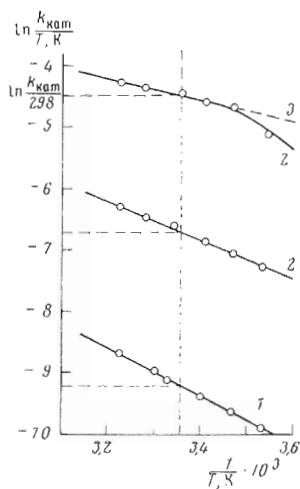


Рис. 3

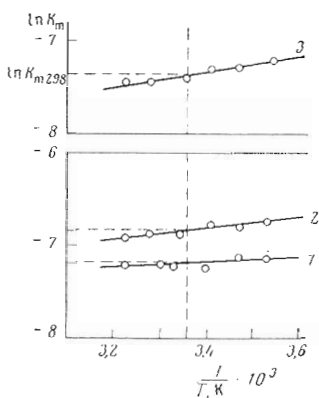


Рис. 4

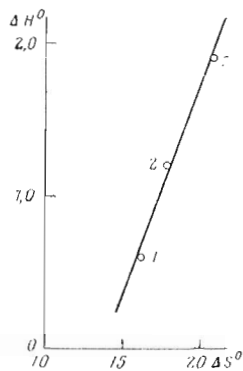


Рис. 5

Рис. 3. Зависимость изменения константы скорости от температуры. Номера на графиках соответствуют номерам соединений, приведенным в табл. 2

Рис. 4. Зависимость изменений константы Михаэлиса от температуры. Нумерация графиков та же, что и на рис. 3

Рис. 5. Изэргоническая зависимость ассоциации пептидов с пепсином. Номера соединений соответствуют приведенным в табл. 2

В ряду ди-, три- и тетрапептид практически все изменение свободной энергии активации обусловлено понижением энтальпии активации. Очевидно, это отражает способность более длинного пептида образовывать дополнительные связи с ферментом в основном состоянии за счет удаленных от реакционного центра аминокислотных остатков.

Анализ изменений стандартных термодинамических параметров ассоциации показывает, что движущей силой комплексообразования является положительное изменение энтропии системы. Энтальпия комплексообразования имеет положительное значение, увеличивающееся при переходе от ди- к три- и тетрапептиду. Это согласуется с представлением об индуцированном субстратом конформационном изменении фермента. Следует отметить компенсационный характер изменений ΔH° и ΔS° в ряду этих трех соединений с изэргонической [10] температурой $\sim 278^\circ$ (рис. 5).

Экспериментальная часть

Пептиды получены обычными методами пептидной химии: карбодимидным с 1-оксибензотриазолом (ДССД), методом смешанных ангидридов (ММА), методом активированных эфиров (АЕ) и азидным методом (см. табл. 3). Ниже приведены типичные методики.

ZPhe_NPheAPM (ДССД). К раствору 3,45 г (10 мМ) бензилоксикарбонил-*n*-нитро-*L*-фенилаланина (получен по методике [11]) в 10 мл абс. тетрагидрофурана прибавляют при перемешивании 4,53 г (10 мМ) дибромгидрата γ -морфолинопропиламида *L*-фенилаланина (получен из ZPheAPM действием смеси НВг с ледяной уксусной кислотой) в 10 мл абс. диметилформамида, содержащего 2,78 мл (20 мМ) триэтиламина, 1,35 г (10 мМ) 1-оксибензотриазола в 5 мл абс. тетрагидрофурана. Смесь охлаждают до 0° и прибавляют по каплям 2,27 г (11 мМ) дигидрогексилкарбодимид в 5 мл диметилформамида. Смесь перемешивают в течение ночи при комнатной температуре. За ходом реакции следят по нингидриновой реакции на аминокгруппу. Выпавший осадок отфильтровывают, растворитель упаривают в вакууме при 40° . Полученное масло растворяют в смеси этилацетат — метанол (9 : 1) и оставляют в холодильнике до полного выпадения

Термодинамические параметры ассоциации и гидролиза

| № соединения | Соединение | ΔG° | ΔH° | ΔS° , э.е. | ΔG_{ac}° | ΔH_{ac}° | ΔS_{ac}° , э.е. |
|--------------|--------------------------------|------------------|------------------|----------------------------|-----------------------|-----------------------|---------------------------------|
| | | ккал/М | | | ккал/М | | |
| 1 | ZPhe _N PheAPM | 19,5 | 7,8 | -39,3 | -4,25 | 0,6 | 16,3 |
| 2 | ZValPhe _N AlaAPM | 18,0 | 6,1 | -40,0 | -4,15 | 1,2 | 18,0 |
| 3 | ZLeuValPhe _N AlaAPM | 16,7 | 3,4 | -44,6 | -4,35 | 1,9 | 21,0 |

Таблица 3

Константы синтезированных соединений

| № соединения | Соединение | $t_{пл}$ | R_f | $[\alpha]_D^{20}$ | $c, \%$ (в диметилформамиде) | Выход, % | Метод |
|--------------|--|----------|--------|-------------------|------------------------------|-------------|---------|
| 1 | ZPheAPM | 110-111 | 0,79 | -11,43 | 0,95 | 63 | ДССД |
| 2 | ZAlaAPM | 105-107 | 0,68 | +4,18 | 0,84 | 72 | ДССД |
| 3 | ZValAPM | 149-150 | 0,67 | +8,04 | 1,94 | 81 | ДССД |
| 4 | ZGlyAPM | 99-100 | 0,47 | - | - | 81 | ДССД |
| 5 | ZPhe _N APM | 166-167 | 0,75 | -23,55 | 0,90 | 83 | ДССД |
| 6 | ZPhe _N PheAPM | 192-193 | 0,77 | -16,76 | 0,53 | 67 | ДССД |
| 7 | ZPhe _N PheArgOMe·CF ₃ COOH | 173-175 | 0,78 * | -25,30 | 0,97 | 56 | ММА |
| 8 | ZPhe _N AlaAPM | 185-187 | 0,54 | -7,62 | 0,92 ** | 81 | ДССД |
| 9 | ZPhe _N ValAPM | 174-176 | 0,74 | +8,84 | 1,55 | 40 | ММА |
| 10 | ZPhe _N GluO _В AlAPM | 138-140 | 0,73 | -11,35 | 0,93 | 54 | ДССД |
| 11 | ZPhe _N GlyAPM | 123-124 | 0,48 | -26,19 | 1,05 | 52 | ММА |
| 12 | ZPhePhe _N APM | 216-217 | 0,74 | -40,14 | 1,16 | 85 | ДССД |
| 13 | ZLeuPhe _N APM | 212-213 | 0,73 | -45,37 | 0,84 | 72 | ДССД |
| 14 | ZAlaPhe _N APM | 213-214 | 0,58 | -42,91 | 0,75 | 70 | ММА |
| 15 | ZValPhe _N APM | 212-214 | 0,79 | -25,97 | 0,56 | 43 | ДССД |
| 16 | ZAsnPhe _N PheAPM | 215-217 | 0,69 * | -33,86 | 0,84 | 62 | АЕ |
| 17 | ZValPhe _N PheAPM | 224-226 | 0,68 | -41,68 | 0,08 | 46 | ДССД |
| 18 | ZValPhe _N AlaAPM | 256-258 | 0,64 | -16,67 | 1,02 | 56 | ДССД |
| 19 | ZLeuValPhe _N AlaAPM | 245-247 | 0,53 | -15,91 | 0,16 *** | 53 | ММА |
| 20 | AcPhe _N PheAlaAlaOMe | 216-217 | 0,68 | -16,80 | 0,54 *** | 42 | Лзидный |

* На пластинках «Силуфол» в системе *n*-бутанол — вода — уксусная кислота (5:2:3); для остальных соединений Al₂O₃ (Папк) в системе этилацетат—петролейный эфир—метанол (8:1:1).

** В смеси диметилформамид — вода (6:1).

*** В смеси диметилформамид — метанол (6:1).

дициклогексилмочевины. Фильтрат концентрируют в вакууме и очищают на колонке с Al₂O₃ в той же системе. После упаривания полученного раствора образуется кристаллическое вещество. Перекристаллизация из смеси этилацетат — петролейный эфир, 3 : 1. Выход после перекристаллизации и характеристики веществ, полученных этим методом, показан в табл. 3.

ZAlaPhe_NAPM (ММА). К раствору 0,23 г (1 мМ) бензилоксикарбонил-*L*-аланина в 5 мл абс. тетрагидрофурана прибавляют 0,139 мл (1 мМ) триэтиламина, смесь охлаждают до -5° и при интенсивном перемешивании добавляют раствор 0,11 мл (1 мМ) этилхлоругольного эфира в 2 мл абс. тетрагидрофурана. Через 15—20 мин к смеси добавляют по каплям раствор 0,47 г (1 мМ) дибромгидрата γ -морфолинопропиламида *L*-фенилаланина в 5 мл диметилформамида с 0,278 мл (2 мМ) триэтиламина. Реакционную смесь перемешивают, постепенно нагревая до комнатной температуры. Через 5—6 ч после исчезновения реакции на аминогруппу осадок бромгидрата триэтиламина отфильтровывают. Раствор упаривают в вакууме, полученное масло растворяют в этилацетате и пропускают через колонку с Al₂O₃. Перекристаллизация из смеси этилацетат — гексан, 2 : 1.

ZAsnPhe_NPheAlaPhe (АК). К раствору 1 г (12,5 мМ) *n*-нитрофенилового эфира карбообензокспаспарагина в 5 мл абс. диметилформамида прибавляют раствор 1,3 г (2 мМ) дибромгидрата γ -морфолинопропиламида *n*-нитро-*L*-фенилаланил-*L*-фенилаланина в 5 мл диметилформамида, содержащего 0,556 мл (4 мМ) триэтиламина. Смесь перемешивают в течение 3 сут при 30—40°. Осадок отфильтровывают, фильтрат упаривают в вакууме, полученное масло растворяют в хлороформе и многократно промывают насыщенным раствором бикарбоната натрия, а затем водой до исчезновения в промывных водах *n*-нитрофенола. Раствор высушивают над Na₂SO₄ и упаривают в вакууме. Перекристаллизация из смеси метанол — хлороформ, 3 : 1.

AcPhe_NPheAlaAlaOMe. 0,8 г (3 мМ) гидразида *N*-ацетил-*n*-нитро-*L*-фенилаланина (получен из *AcPhe_NOMe* гидразинолизом) растворяют в 3,6 мл ледяной уксусной кислоты и 1,5 мл 5н. HCl, раствор охлаждают до —5° и прибавляют в один прием холодный насыщенный раствор 0,222 г (3 мМ) азотистокислого натрия. Выпавшее масло экстрагируют холодным этилацетатом, промывают ледяной водой, 3% раствором бикарбоната натрия, опять водой, быстро сушат над MgSO₄ и прибавляют к раствору 1,37 г бромгидрата метилового эфира *L*-фенилаланил-*L*-аланил-*L*-аланина (получен методом смешанных ангидридов из *ZPhe-OH* и *H-AlaAlaOMe* с последующей обработкой *NBr* в лед. CH₃COOH) и 0,417 мл триэтиламина в 10 мл диметилформамида. Реакцию ведут в течение 2 сут сначала на холоде, потом при комнатной температуре. По окончании реакции смесь фильтруют, упаривают в вакууме, растворяют в хлороформе, промывают раствором бикарбоната, 10% раствором лимонной кислоты, водой. Сушат над MgSO₄. Перекристаллизация из смеси этилацетат — метанол — петр. эфир, 3 : 1 : 1.

Для синтезированных соединений данные элементного анализа совпадают с вычисленными величинами.

Однородность веществ определяли тонкослойной хроматографией (см. табл. 3). Температуру плавления определяли на блоке Кофлера Reichert (ФРГ). Удельное вращение измеряли на поляриметре Perkin — Elmer 141M (Швеция).

Коммерческий препарат свиного пепсина Олайнского завода химреактивов очищали ионообменной хроматографией на DEAE-целлюлозе с последующим обессоливанием на сефадексе G-25 по методу [12].

Кинетические измерения проводили на спектрофотометре фирмы Gilford 2400-2 (США) при рН 4,0 в 0,1 М ацетатном буфере. Величины $k_{кат}$ K_m рассчитывали по методу двойных обратных величин, используя метод наименьших квадратов.

Температурную зависимость исследовали в интервале температур от 9 до 37°. Корреляционные кривые (см. рис. 1 и 2) и кривые температурной зависимости (см. рис. 3 и 4) обсчитывали методом наименьших квадратов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Зияченко А. А., Румш Л. Д., Антонов В. К. (1976) Биоорган. химия, 2, 803—810.
2. Тиходева А. Г., Зияченко А. А., Румш Л. Д., Антонов В. К. (1974) Докл. АН СССР, 214, 355—357.
3. Тиходева А. Г. (1974) Канд. дис. «Исследование стадийности пепсинового катализа», М.
4. Medzihradszky K., Voynick I. M., Medzihradszky-Schweiger H., Fruton J. S. (1970) Biochemistry, 9, 1154—1162.
5. Wang T. T., Dorrington K. J., Hoffmann T. (1974) Biochem. and Biophys. Res. Commun., 57, 865—869.
6. Sachdev G. P., Fruton J. S. (1970) Biochemistry, 9, 4465—4470.
7. Wilson I., Cabib E. (1956) J. Amer. Chem. Soc., 78, 202—207.
8. Adams P. A., Swart E. R. (1977) Biochem. J., 161, 83—92.
9. Fruton J. S. (1974) Isr. J. Chem., 12, 505—513.
10. Schowen R. L. (1967) J. Pharm. Sci., 56, 931—943.

11. Inouye K., Fruton J. S. (1967) *Biochemistry*, **6**, 1765—1777.
12. Гинодман Л. М. (1962) в сб. Актуальные вопросы современной биохимии, т. 2, с. 54, Медгиз, М.

Поступила в редакцию
2.VI.1977

KINETIC AND THERMODYNAMIC ANALYSIS OF PEPSIN SPECIFICITY

ZINCHENKO A. A., RUMSH L. D., ANTONOV V. K.

*M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, Academy
of Sciences of the USSR, Moscow*

Synthesis has been performed of 14 new substrates of porcine pepsin, which contain a nitro group in the phenylalanine aromatic ring and γ -aminopropylmorpholine residue as C-protecting group. A linear dependence has been found between the catalytic rate constants (k_{cat} and k_{cat}/K_m) and the sum of «specificity indexes» calculated on the basis of statistical analysis of the pepsin catalyzed hydrolysis of proteins. The temperature dependence of binding and hydrolysis rate constants for di-, tri- and tetrapeptides was investigated and the differences in the hydrolysis rates were shown to arise from the changes in the enthalpy of activation.
