



УДК 577.156.4.02

## АКТИВАЦИЯ И ИНГИБИРОВАНИЕ ПЕПСИНОВОГО КАТАЛИЗА

*Зинченко А. А., Руми Л. Д., Антонов В. К.**Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина  
Академии наук СССР, Москва*

Исследовано влияние различных пептидов на скорость катализируемого пепсином гидролиза ди- и трипептидных субстратов. Показано, что в зависимости от структуры субстрата и эффектора последний может выступать в роли активатора неконкурентного или смешанного типа или в роли ингибитора. Для активаторов неконкурентного типа установлена линейная зависимость величины  $\beta$  от суммарного индекса специфичности. Обсуждается механизм действия активаторов и кинетическая схема пепсинового катализа, включающая индуцированный субстратом (или субстратом и активатором) конформационный переход фермента в форму, максимально комплементарную переходному состоянию в реакции гидролиза.

Исследования специфичности свиного пепсина (КФ 3.4.23.1) в отношении гидролиза белков [1—3] и синтетических пептидов [4, 5] показывают, что активный центр этого фермента представляет собой «щель», специфически связывающую, как минимум, пять аминокислотных остатков субстрата. Вывод о протяженности «щели» подтверждается данными рентгеноструктурного анализа близкородственных кислых протеиназ [6, 7].

Роль аминокислотных остатков, удаленных от расщепляемой связи, в фермент-субстратном взаимодействии, вероятно, заключается в следующем: при сорбции субстрата в активном центре эти остатки изменяют конформацию активного центра, тем самым создавая комплементарность центра переходному состоянию субстрата в реакции гидролиза [8]. Если это так, то должны существовать субстратоподобные эффекторы, аналогичным образом изменяющие гидролиз «плохих» субстратов, неспособных к индуцированию адекватных конформационных изменений.

Действительно, Гофман и сотр. [9, 10] показали, что гидролиз лейцилтирозиламида и некоторых других субстратов ускоряется при добавлении в систему пептидов, не расщепляемых пепсином.

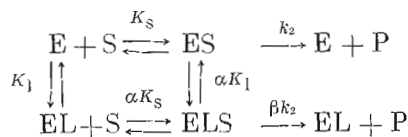
В настоящей работе приведены результаты исследования взаимоотношений ряда пептидных эффекторов с ди- и трипептидными субстратами пепсина. Использованные нами субстраты содержали остаток *n*-нитро-*L*-фенилаланина (Phe(NO<sub>2</sub>)), что облегчало кинетические измерения. Были выбраны соединения, содержащие только С-защитную группировку,  $\gamma$ -аминопропилморфолиновую (Арт) [5] (соед. (I) — (III)), защищенные как по С-, так и по N-концевой аминокислоте (соед. (IV)) и не содержащие защитных групп (соед. (V)). Кинетические константы ферментативного гидролиза этих субстратов приведены в табл. 1. В качестве эффекторов использовались не гидролизующиеся пепсином пептиды, содержащие защитные группы.

Расположение субстратов и эффекторов в активном центре и их кинетические константы

Роль в-ва	Субстраты и эффекторы	Расположение в активном центре	Концентрация, мМ	k кат, мин <sup>-1</sup>	K <sub>m</sub>		α	β	K <sub>i</sub> , мМ	v <sub>a</sub> /v <sub>s</sub>	Тип действия
					к кат, мин <sup>-1</sup>	мМ					
S	H-Phe-Phe (NO <sub>2</sub> )-Apm	(I)	0,2-1	0,22	0,62						
A	Z-Leu-Ser-Ala-OH	(VI)	0,5-5			7,9	1,0	69			
A	Z-Phe-Ala-Ala-OH	(VII)	0,5-5			4,8	1,0	62			
A	Z-Leu-Leu-Ser-OH	(VIII)	0,25-1			0,4	5,2	41			
A*	Z-D-Phe-Ala-Ala-OH	(IX)	2						3,45**		Смеш.
I	Z-Val-Tyr-Gly-NH <sub>2</sub>	(X)	2								
S	H-Asn-Phe (NO <sub>2</sub> )-Phe-Apm	(II)	0,2-2	0,36	1,05						
A	Z-Leu-Ser-Ala-OH	(VI)	2	0,54	1,05						
A	Z-Phe-Ala-Ala-OH	(VII)	1,0-5			14,3	1,0	20,3			Неконк.
I	H-Phe-Ala-Ala-OMe	(IX)	0-2						0,8		Конк.
I	Z-Leu-Leu-Ser-OH	(VIII)	0-2						1,1		»
I	Z-Ser-Tyr-Gly-OH	(XII)	4						11,5**		
S	H-Ala-Phe (NO <sub>2</sub> )-Ala-Apm	(III)									Гидролизуется очень медленно
A	Z-Leu-Ser-Ala-OH***	(VI)	2	0,48	2,85						
S	Z-Leu-Phe (NO <sub>2</sub> )-Apm	(IV)	0,2-1	0,65	0,73						
I	H-Phe-Ala-Ala-OMe	(XI)	8								1,4**
I	H-D-Phe-Ala-Ala-OMe	(XIII)	16								15,4**
S	H-Ala-Phe(NO <sub>2</sub> )-Phe-OH	(V)	0,2-2	0,48	4,2						
A	H-Phe-Ala-Ala-OMe	(XI)	2,0-10								
I	H-D-Phe-Ala-Ala-OMe	(XIII)	0-16								
								5			10,75

\* Расположение в активном центре дано произвольно. \*\* Рассчитаны из v<sub>i</sub>/v из предположения о конкурентном ингибировании. \*\*\* Гидролиз субстрата (III) в присутствии этого активатора идет по связи Ala-Phe(NO<sub>2</sub>).

Измерялись скорости гидролиза субстратов в зависимости от концентрации как субстрата, так и эффектора. Обработку результатов проводили, используя общую схему взаимодействия фермент — субстрат — эффектор (L) [11]:



Соответственно скорость гидролиза субстрата дается выражением

$$v = \frac{k_2 \frac{\alpha K_1 + \beta [L]}{\alpha K_1 + [L]} \cdot [E]_0 [S]_0}{\alpha K_s \frac{K_1 + [L]}{\alpha K_1 + [L]} + [S]_0}$$

В зависимости от значений  $\alpha$  и  $\beta$  эффектор выступает или в роли активатора ( $K_1 = K_a$ ), или в роли ингибитора ( $K_1 = K_i$ ) реакции.

Из-за низкой растворимости некоторых субстратов и эффекторов, а также слабого влияния ряда эффекторов на гидролиз субстратов не во всех случаях удалось получить все параметры активации ( $K_a$ ,  $\alpha$  и  $\beta$ ) и параметр ингибирования ( $K_i$ ). В ряде случаев пришлось ограничиться констатацией активирующего или ингибирующего действия эффектора. В табл. 1 приведены полученные нами кинетические параметры активации и ингибирования, а также наиболее вероятное взаимное расположение в активном центре фермента субстрата и активаторов или ингибиторов ферментативного гидролиза\*.

Анализируя полученные нами данные, следует, во-первых, обратить внимание на тот факт, что в качестве активаторов могут выступать лишь соединения, имеющие по крайней мере одну незащищенную концевую аминокислоту, при этом субстрат также должен содержать такого рода аминокислотный остаток. Обнаружить активаторы гидролиза полностью защищенного субстрата Z-Leu-Phe(NO<sub>2</sub>)-Arm (IV) нам не удалось. Очевидно, что для образования тройного комплекса субстрат — активатор — фермент существенное значение имеет электростатическое взаимодействие зарядов субстрата и активатора. Однако это взаимодействие — необходимое, но недостаточное условие активирования пепсинового катализа. Ряд соединений, потенциально способных к таким взаимодействиям с субстратом, все же являются ингибиторами. Следовательно, родство эффектора к тому или иному участку активного центра имеет важное значение для проявления им или активирующего, или ингибирующего действия.

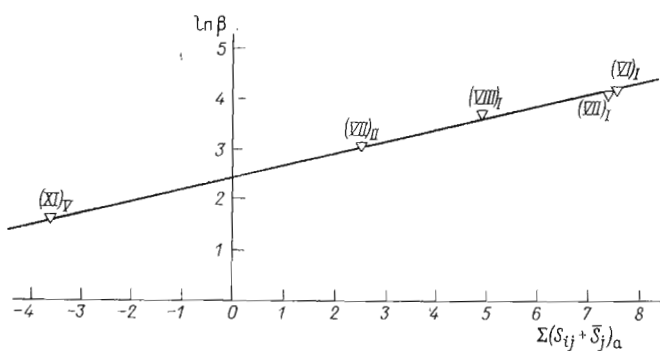
Интересно, что между родством активатора к ферменту и его способностью ускорять гидролиз субстрата существует четкая корреляция. Для неконкурентных активаторов обнаружена линейная зависимость между суммарными индексами специфичности  $\Sigma (S_{ij} + \bar{S}_j)$  [3] активаторов, вычисленными из предположения о расположении их в тройном комплексе (табл. 1), и величиной  $\beta$  (рисунок). Эта корреляция описывается уравнением

$$\ln \beta = 0,23 \Sigma (S_{ij} + \bar{S}_j)_a + 2,45$$

с коэффициентом корреляции  $r = 0,99$ ;  $\Sigma (S_{ij} + \bar{S}_j)_a$  рассчитывали из предположения, что размеры активного центра  $s_4 - s_3'$ .

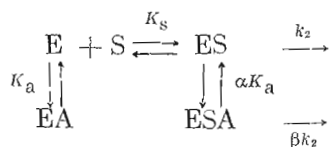
Ряд испытанных нами соединений проявляет смешанный тип активации ( $\alpha \neq 1$ ), причем один и тот же эффектор, например Z-Leu-Leu-Ser-OH

\* Связывающие участки, расположенные в активном центре фермента слева от места положения расщепляемой связи, условно обозначены  $s_1$ ,  $s_2$ ,  $s_3$ , и справа —  $s_1'$ ,  $s_2'$  и т. д.



Зависимость значений  $\beta$  от суммарных индексов специфичности активаторов. Нумерация активаторов на рисунке соответствует нумерации, приведенной в табл. 1. Нижний индекс показывает субстрат, с которым рассчитывали величину  $\beta$  для данного активатора

(VIII), может выступать активатором по отношению к одному субстрату, Н-Phe-Phe(NO<sub>2</sub>)-Аrm (I), и конкурентным ингибитором — к другому, Н-Asn-Phe(NO<sub>2</sub>)-Phe-Arm (II). По-видимому, смешанный тип активации в этих случаях может быть описан схемой, согласно которой активатор связывается со свободным ферментом в участке связывания

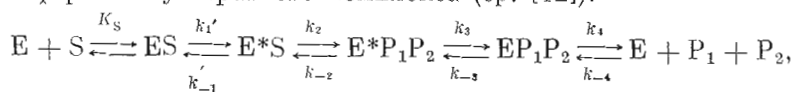


субстрата, но в присутствии субстрата активатор вытесняется в другой участок активного центра. Тот факт, что положение субстрата и эффектора может быть разным в двойных комплексах, ES и EL, и в тройном комплексе, ESL, наиболее ярко демонстрируется поведением системы E — (III) — (VI). В отсутствие эффектора субстрат Н-Ala-Phe(NO<sub>2</sub>)-Ala-Arm (III) очень медленно гидролизуеться по связи Phe(NO<sub>2</sub>)-Ala, однако добавление эффектора (VI) приводит к активации гидролиза, при этом расщепление субстрата происходит по связи Ala-Phe(NO<sub>2</sub>).

Активация пепсинового катализа может происходить путем «дстройки» субстрата активатором как с N-, так и с C-конца. В последнем случае субстрат должен содержать свободную карбоксильную группу, а активатор — иметь защищенный карбоксил и свободную аминогруппу. Существенное значение при этом имеет конфигурация аминокислотных остатков. В то время как Н-Phe-Ala-Ala-OMe (XI) активирует гидролиз Н-Ala-Phe(NO<sub>2</sub>)-Phe-OH (V), его энантиомер (XIII) выступает в отношении этого субстрата как конкурентный ингибитор. В случае защищенного субстрата Z-Leu-Phe(NO<sub>2</sub>)-Arm (IV) оба энантиомера проявляют свойства ингибиторов. Возможно, что в случае D-формы фенилаланина ориентация заряженной аминогруппы эффектора в тройном комплексе такова, что она не может взаимодействовать с карбоксильной группой субстрата.

Каков же механизм активации пепсинового катализа? Как уже отмечалось выше, имеются данные об индуцировании субстратом и активаторами конформационных изменений в пепсине. С этими данными согласуются полученные в нашей лаборатории результаты определения термодинамических параметров катализируемого пепсином гидролиза пептидов различной длины [5]. Значительное влияние вторичных фермент-субстратных взаимодействий на каталитическую константу гидролиза (но не на  $K_m$ ) показывает, что именно эти взаимодействия могут быть определяю-

щими в индуцировании субстратом конформационных изменений фермента, важных для катализа. В этом отношении активатор может играть роль фрагмента, «дополняющего» субстрат и способствующего конформационному переходу в ферменте. С этой точки зрения кинетическая схема пепсिनнового катализа должна включать по крайней мере двухстадийное образование фермент-субстратного комплекса (ср. [12]):



где  $E^*S$  — «активный» фермент-субстратный комплекс,  $E^*P_1P_2$  — такой же комплекс с продуктами гидролиза  $P_1$  и  $P_2$ . Начальная скорость гидролиза при условии  $k_4 \gg k_{-3}$  и  $k_{-1}' \gg k_2$  будет определяться выражением

$$v = \frac{\frac{k_2 k_3}{k_{-2} + k_3} [E]_0 [S]_0}{K_s \frac{k_{-1}'}{k_1'} + \left(1 + \frac{k_{-1}'}{k_1'} + \frac{k_3}{k_{-2} + k_3}\right) [S]_0}.$$

Если предположить, что  $k_3 \gg k_{-2}$ , а  $k_{-1}'/k_1' \gg 1$ , то значения наблюдаемой каталитической константы и величины  $K_{m(\text{как})}$  будут

$$k_{\text{кат}} = k_2/K' \text{ и } K_{m(\text{как})} = K_s, \text{ где } K' = k_{-1}'/k_1'.$$

Отсюда следует, что в ряду субстратов, различающихся длиной пептидной цепи, когда вторичные фермент-субстратные взаимодействия влияют на величину  $k_1'$  (константу скорости индуцированного изменения конформации фермента), значения каталитической константы должны увеличиваться, а значения  $K_{m(\text{как})}$  оставаться постоянными. Именно такая ситуация наблюдается для субстратов пепсина. Не konkurрентные активаторы влияют только на наблюдаемую величину  $k_{\text{кат}}$ . Если допустить, что константа скорости химического превращения субстрата в комплексе  $E^*S$  не зависит от присутствия в этом комплексе активатора, значение  $\beta$  будет фактически мерой изменения константы равновесия ( $K'$ ) между комплексами  $ES$  и  $E^*S$ .

Интересно сравнить, насколько эффективно активатор дополняет субстрат, т. е. насколько наблюдаемая при насыщении фермента активатором скорость гидролиза «плохого» субстрата соответствует скорости гидролиза пептидного субстрата, включающего все остатки как активатора, так и «плохого» субстрата. В системе субстрат  $H\text{-Phe-Phe}(\text{NO}_2)\text{-Arm}$  (I) и активатор  $Z\text{-Leu-Ser-Ala-OH}$  (VI)  $k_{\text{кат}(\text{sa})} = 15,4 \text{ мин}^{-1}$ , где  $k_{\text{кат}(\text{sa})} = k_{\text{кат}}\beta$  ( $k_{\text{кат}} = 0,22 \text{ мин}^{-1}$ ,  $\beta = 69$ , см. табл. 1). Для субстрата  $Z\text{-Leu-Ser-Ala-Phe-Phe}(\text{NO}_2)\text{-Arm}$  рассчитанная по индексам специфичности [3] величина  $k_{\text{кат}} = 3500 \text{ мин}^{-1}$ . Таким образом, пентапептидный субстрат должен гидролизироваться более чем в 200 раз быстрее по сравнению с дипептидным субстратом в присутствии трипептидного активатора. Это указывает на неадекватность замены ковалентной связи в пептиде электростатически взаимодействующими карбоксил-ионом и аминоксигруппой.

Нельзя исключить, однако, того, что механизм активации заключается в синтезе нового пептида из субстрата и активатора, который затем и гидролизуются. В этом случае различие экспериментальной и вычисленной констант скоростей может быть обусловлено лимитированием всего процесса стадией синтеза пептида.

### Экспериментальная часть

Химическую однородность веществ проверяли ТСХ на  $\text{Al}_2\text{O}_3$  (II степень активности по Брокману) и на пластинках силуфола UV-254.  $R_f$  определяли на  $\text{Al}_2\text{O}_3$  в системах растворителей: этилацетат — гексан,

Соединение	$R_f$ (система)	$T_{пл}$ , °C*	[ $\alpha$ ] <sub>D</sub> , град (с)	
Z-Ala-Phe(NO <sub>2</sub> )-Phe-OMe	0,45 (А)	199–200 (а)	-27,0	(0,54)
H-Ala-Phe(NO <sub>2</sub> )-Phe-OH·HBr	0,66 (Г)	267(разл.) (б)	+19,15	(0,40)
Z-Phe-Ala-Ala-OMe	0,42 (А)	200–201 (б)	-19,40	(1,1)
Z-Phe-Ala-Ala-OH	0,65 (Д)	194–195 (г)	-12,9	(1,0)
H-Phe-Ala-Ala-OMe·HBr	0,60 (Г)	188–190 (в)	-3,9	(0,65)
Z-D-Phe-Ala-Ala-OMe	0,82 (Б)	181–182 (б)	-6,3	(1,0)
Z-D-Phe-Ala-Ala-OH	0,67 (Д)	185–187 (б)	+8,45	(0,6)
Z-Leu-Ser-Ala-OH	0,64 (Е)	169–171 (а)	-14,2	(0,25)
Z-Leu-Leu-Ser-OMe	0,82 (В)	118–120 (а)	-21,3	(0,25)
Z-Leu-Leu-Ser-OH	0,60 (Д)	158–160 (а)	-25,0	(0,2)
H-Phe-Phe(NO <sub>2</sub> )-Apm·2HBr	0,49 (Г)	**	-2,3	(1,0)
H-Asn-Phe(NO <sub>2</sub> )-Phe-Apm·2HBr	0,42 (Г)	**	-9,7	(0,3)
H-D-Phe-Ala-Ala-OMe·HBr	0,61 (Г)	**	-39,3	(1,13)

\* В скобках указаны растворители, использовавшиеся для перекристаллизации (см. «Эксперим. часть»).

\*\* Соединения очищены трехкратным пересаживанием эфиром из метанола.

4 : 1 (А), этилацетат — гексан — метанол, 8 : 1 : 1 (Б), этилацетат — петролейный эфир — метанол, 3 : 1 : 1 (В), и на силуфол в системах: *n*-бутанол — вода — уксусная кислота, 5 : 5 : 3 (Г), этилацетат — петролейный эфир — метанол, 3 : 1 : 1 (Д), этилацетат — метанол, 2 : 1 (Е).

Температуры плавления определяли на блоке Кюфлера. Для перекристаллизации соединений использовали следующие смеси растворителей: а — этилацетат — петролейный эфир; б — хлороформ — метанол — петролейный эфир; в — хлороформ — метанол — бензол; г — водный метанол.

Элементный состав соединений по данным анализа соответствовал расчетному.

Удельное вращение измеряли на поляриметре Perkin-Elmer 141 М в диметилформамиде.

Синтез пептидов с аминпропилморфолиновой С-концевой защитной группировкой осуществляли как описано ранее [5]. Синтез метиловых эфиров ацилированных пептидов проводили методом смешанных ангидридов, гидролиз эфиров — спиртовым раствором щелочи, элиминирование бензилоксикарбонильной защиты в пептидах — бромистым водородом в ледяной уксусной кислоте [13]. Свойства синтезированных соединений приведены в табл. 2.

Z-Leu-Ser-Ala-OH получали из хроматографически чистого Z-Leu-Ser-Ala-Phe-Apm ферментативным гидролизом последнего пепсина свиньи по связи Ala-Phe по следующей методике: 600 мг Z-Leu-Ser-Ala-Phe-Apm (0,85 ммоль) растворяли в 18 мл 0,1 М ацетатного буфера (pH 4,0). К раствору при комнатной температуре прибавляли 20 мг свиного пепсина в 2 мл того же буфера. Смесь, слабо перемешивая, оставляли на 2 ч. За ходом реакции следили хроматографически (система Е). По окончании реакции смесь подкисляли до pH ~ 1,0, выпавшее масло экстрагировали этилацетатом, промывали водой, сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Полученный раствор пропускали через слой целита-545 (60—100 меш), промывали смесью этилацетат—MeOH. Выход 200 мг (~ 56%).

Коммерческий препарат пепсина свиньи (Олайнский завод химреактивов) очищали ионообменной хроматографией на DEAE-целлюлозе с последующим обессоливанием на сефадексе G-25 по методу [14]. Гидролиз субстратов проводили при 37° в 0,1 М ацетатном буфере (pH 4,0) в присутствии 5% (по объему) ДМФА и концентрациях фермента 5—20 мМ.

(Концентрации субстратов и эффекторов см. в табл. 1). Ход гидролиза регистрировали прямым спектрофотометрированием при 320 нм на спектрофотометре фирмы Gilford. Константы гидролиза субстратов в присутствии активаторов и ингибиторов и тип влияния эффекторов определяли в координатах Лайнуивера — Берка.

Константы конкурентного ингибирования ( $K_i$ ) находили в координатах ( $K_m$ ,  $[I]$ ). Константы неконкурентной активации ( $K_a$ ,  $\beta$ ) определяли в координатах [ $1/(k_{cat}/k_2 - 1)$ ,  $1/[A]$ ]. Константы смешанной активации ( $K_a$ ,  $\alpha$ ,  $\beta$ ) находили как описано в работе [11].

Обсчет кривых проводили по уравнению линейной регрессии на ЭКВМ.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Tang J. (1963) *Nature*, 199, 1094—1095.
2. Hill R. L. (1965) *Adv. in Protein Chem.*, 20, 37—107.
3. Зинченко А. А., Румш Л. Д., Антонов В. К. (1976) *Биоорганич. химия*, 2, 803—810.
4. Fruton J. S. (1976) *Adv. Enzymol.*, 44, 1—36.
5. Зинченко А. А., Румш Л. Д., Антонов В. К. (1977) *Биоорганич. химия*, 3, 1663—1670.
6. Hsu J.-N., Delbaere L. T. J., James M. N. G., Hofman T. (1977) *Nature*, 266, 140—145.
7. Subramanian E., Swan J. D. A., Mamie Liu, Davies D. R., Jenkins J. A., Tickle I. J., Blundell T. L. (1977) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 74, 556—559.
8. Дженкс В. (1972) в кн. *Катализ в химии и энзимологии*, тл. 5, «Мир», М.
9. Wang T. T., Dorrington K. J., Hofman T. (1974) *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, 57, 865—869.
10. Wang T. T., Hofman T. (1976) *Biochem. J.*, 153, 701—712.
11. Березин И. В., Мартинек К. (1971) *Молекулярн. биология*, 5, 347—350.
12. Sachdev G. P., Fruton J. S. (1975) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 72, 3424—3427.
13. Гривштейн Дж., Виниц М. (1965) в кн. *Химия аминокислот и пептидов*, с. 705, «Мир», М.
14. Гинодман Л. М. (1962) в сб. *Актуальные вопросы современной биохимии*, т. 2, с. 54, Медгиз. М.

Поступила в редакцию  
11.I.1978

После доработки  
25.II.1978

#### ACTIVATION AND INHIBITION OF PEPSIN CATALYSIS

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

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

The effect of various peptides on the rate of pepsin catalyzed hidrolysis of a number of di- and tripeptides has been studied. It was shown that depending on the structure of the substrate and effector, the latter can function as competitive or mixed-type activator, or as inhibitor. For competitive activators, a linear dependence was found between the sum of specificity indices and  $\beta$  values. Activation mechanism and kinetic scheme of pepsin catalysis are discussed, the latter includes substrate- or substrate and activator induced conformational transition of the enzyme into the form complementary to the transition state of hydrolytic reaction.