



УДК 577.156.4.02

МЕХАНИЗМ АКТИВАЦИИ КАТАЛИЗИРУЕМОГО ПЕПСИНОМ  
ГИДРОЛИЗА ДИПЕПТИДОВЗинченко А. А., Руми Л. Д., Гинодман Л. М.,  
Антонов В. Б.*Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина  
Академии наук СССР, Москва*

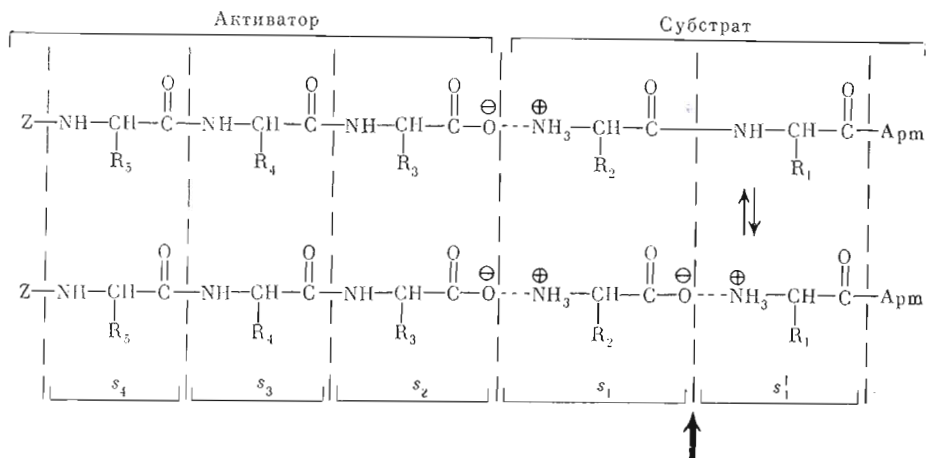
Показано, что ускорение катализируемого пепсином гидролиза дипептидов в присутствии пептидных активаторов является результатом синтеза из субстрата и активатора нового пептида и последующего его гидролиза по наиболее чувствительной к расщеплению связи.

Ранее [1] мы показали, что катализируемый пепсином гидролиз ряда ди- и трипептидов ускоряется в присутствии активаторов — пептидов, не гидролизующихся этим ферментом. Характерная особенность субстратов и активаторов — наличие у каждого из них по крайней мере одной (N- или C-) незащищенной концевой аминокислоты; при этом свободные функциональные группы у субстрата и активатора должны быть различными. Возможны два механизма активации. В случае первого из них (сорбционный механизм) гидролизующий субстрат (со свободной аминогруппой) занимает  $s_1$ - и  $s_1'$ -участки связывания в активном центре фермента [2] (схема 1), а активатор, например трипептид со свободной карбоксильной группой, занимает вторичные участки связывания  $s_4$ — $s_2$ . Ускорение гидролиза субстрата обусловлено в этом случае тем, что активатор как бы дополняет субстрат и, возможно, индуцирует конформационные изменения фермента, способствующие катализу [3]. В результате гидролиза в реакционной смеси накапливается N-концевая аминокислота субстрата.

В случае второго механизма (механизма синтеза-гидролиза) субстрат занимает участки  $s_1'$ ,  $s_2'$  (т. е. зону продукта), а активатор —  $s_3$ — $s_1$  (схема 2). Субстрат и активатор образуют ковалентную, амидную связь, и образовавшийся далее пентапептид связывается на ферменте так, что аминокислотные остатки дипептидного фрагмента исходного субстрата занимают участки  $s$ - и  $s_1$ . В результате гидролиза пентапептида в реакционной смеси может накапливаться тетрапептид, в котором C-концевой аминокислотой оказывается N-концевой остаток исходного субстрата. Если в N-концевую аминокислоту субстрата ввести хромофорную метку, то с помощью спектрофотометрического метода можно получить данные, позволяющие сделать выбор между альтернативными механизмами.

Сокращения: Phe(NO<sub>2</sub>) — остаток *n*-нитрофенилаланина; Арт —  $\gamma$ -морфолилопропиламин.

Схема 1



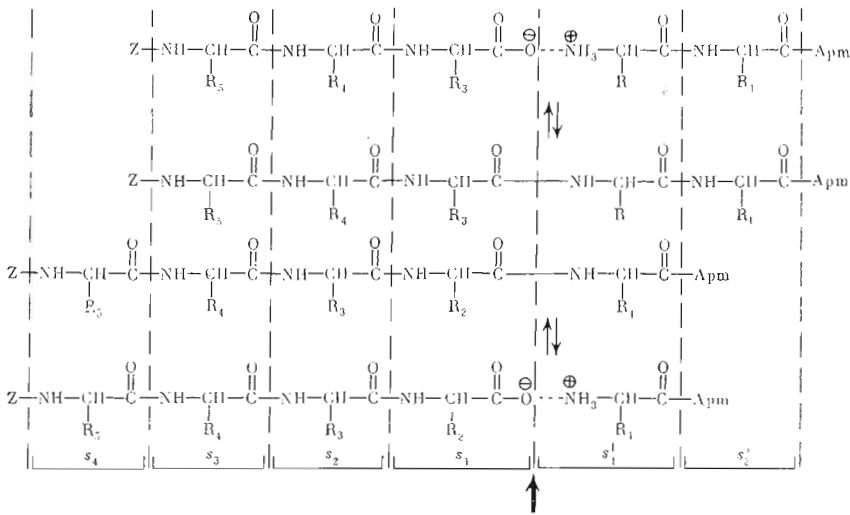
Активация гидролиза дипептидов по сорбционному механизму

В качестве субстрата нами был выбран *L-n*-нитрофенилаланил-*L*-фенилаланил- $\gamma$ -морфолинопропиламид, а в качестве активаторов — трипептиды *N*-бензилоксикарбонил-*L*-фенилаланил-*L*-аланил-*L*-аланин и *N*-бензилоксикарбонил-*L*-лейцил-*L*-серил-*L*-аланин. Молярный коэффициент поглощения исходного субстрата при  $\lambda 320$  нм равен  $1300 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ , *n*-нитрофенилаланина —  $1850 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ . Если активация осуществляется по первому механизму, т. е. в реакционной смеси накапливается *n*-нитрофенилаланин, ожидаемое изменение молярного коэффициента поглощения при полном гидролизе субстрата как в присутствии, так и в отсутствие активаторов должно быть одинаковым и составлять  $\Delta \epsilon 550 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ . Если же в ходе реакции из активатора и субстрата синтезируется пентапептид, который далее гидролизуеться по связи  $\text{Phe}(\text{NO}_2)\text{-Phe}$ , то будет образовываться тетрапептид  $\text{Z-Phe-Ala-Ala-Phe}(\text{NO}_2)\text{-OH}$  или  $(\text{Z-Leu-Ser-Ala-Phe}(\text{NO}_2)\text{-OH})$ . Для соединений такого типа  $\epsilon_{320} 2800 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ , т. е. изменение молярного коэффициента поглощения в результате полного превращения субстрата по такой схеме должно составлять  $\sim 1500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ .

При полном гидролизе  $\text{H-Phe}(\text{NO}_2)\text{-Phe-Arpm}$  в присутствии  $\text{Z-Phe-Ala-Ala-GH}$  изменение молярного коэффициента поглощения составляет  $1250 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  (рис. 1, 3). Результат свидетельствует в пользу второго механизма.

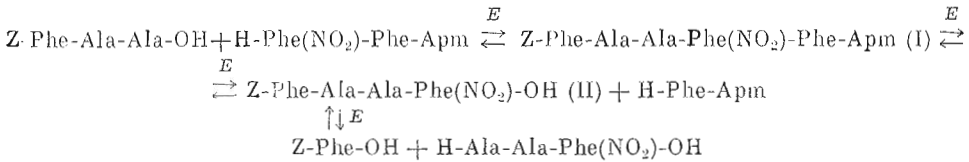
Для получения дополнительной информации мы провели гидролиз дипептида  $\text{H-Phe}(\text{NO}_2)\text{-Phe-Arpm}$  в присутствии активатора  $\text{Z-Phe-Ala-Ala-OH}$  с последующим анализом продуктов реакции с целью обнаружения тетрапептида  $\text{Z-Phe-Ala-Ala-Phe}(\text{NO}_2)\text{-OH}$  или продуктов его деградации. Реакционную смесь подвергли ультрафильтрации при pH 7 для удаления пепсиа и фильтрат после концентрирования экстрагировали этилацетатом при pH 9,5. В этих условиях в этилацетат переходит незаряженный продукт  $\text{H-Phe-Arpm}$  и неореагировавший субстрат. Водный раствор довели до pH 2 и снова экстрагировали этилацетатом. Кислый экстракт и водный раствор исследовали с помощью тонкослойной хроматографии на пластинках с силикагелем. Оказалось, что в этилацетатном экстракте из кислого раствора наряду с активатором содержится также *N*-бензилоксикарбонилфенилаланин (рис. 2). Водный раствор дает при хроматографии четыре пятна, одно из которых было отождествлено с *n*-нитрофенилаланином, а другое, по-видимому, является аланил-аланином. Для выяснения природы вещества с максимальным значением  $R_f 0,75$  мы провели препаративную хроматографию водного раствора, соответствующую полосу элюировали 0,4 н. уксусной кислотой; продукт подвергли полному кис-

Схема 2



Активация гидролиза дипептидов по механизму синтеза-гидролиза

лотному гидролизу. Аминокислотный анализ показал, что продукт содержит аланин и *n*-нитрофенилаланин в соотношении 2,3 : 1, т. е. является H-Ala-Ala-Phe(NO<sub>2</sub>)-OH. Единственным путем его образования может быть следующий:



Таким образом, данные спектрофотометрического исследования активируемого Z-Phe-Ala-Ala-OH гидролиза H-Phe(NO<sub>2</sub>)-Phe-Apm и прямой анализ продуктов реакции показывают, что в ходе активации образуется пептидная связь между С-концевой карбоксильной группой активатора и свободной аминогруппой субстрата, т. е. трипептидный активатор и субстрат-дипептид образуют сначала пентапептид (I), который быстро гидролизуется по связи Phe(NO<sub>2</sub>)-Phe, что и обуславливает наблюдаемое повышение скорости реакции [4]. Появление в реакционной смеси H-Ala-Ala-OH может быть результатом частичного гидролиза исходного активатора и продукта H-Ala-Phe(NO<sub>2</sub>)-OH.

Чрезвычайно важно то обстоятельство, что гидролиз промежуточного тетрапептида (II) по связи Phe-Ala, приводящий к появлению в продуктах реакции соединения с С-концевым остатком *n*-нитрофенилаланина, происходит относительно быстро. Если бы он происходил медленно, доминирующим стал бы гидролиз тетрапептида по связи Ala-Phe(NO<sub>2</sub>), что привело бы к накоплению исходного активатора и свободного *n*-нитрофенилаланина. Вероятно, именно такая ситуация имеет место в случае использования в качестве активатора гидролиза трипептида Z-Leu-Ser-Ala-OH (рис. 1, 2), когда наблюдаемое изменение молярного коэффициента поглощения значительно меньше, чем ожидаемое по механизму синтеза-гидролиза. Видимо, в образующемся тетрапептиде Z-Leu-Ser-Ala-Phe(NO<sub>2</sub>)-OH оказывается наиболее специфичной к пепсину синтезируемая связь Ala-Phe(NO<sub>2</sub>). Наличие максимума на этой кривой отражает

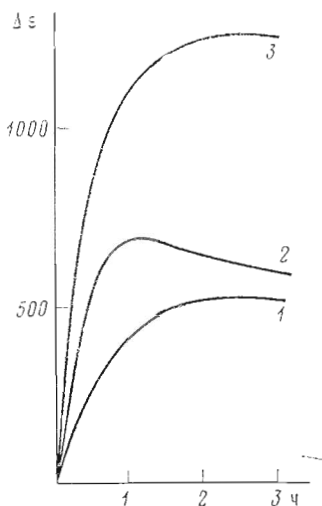


Рис. 1

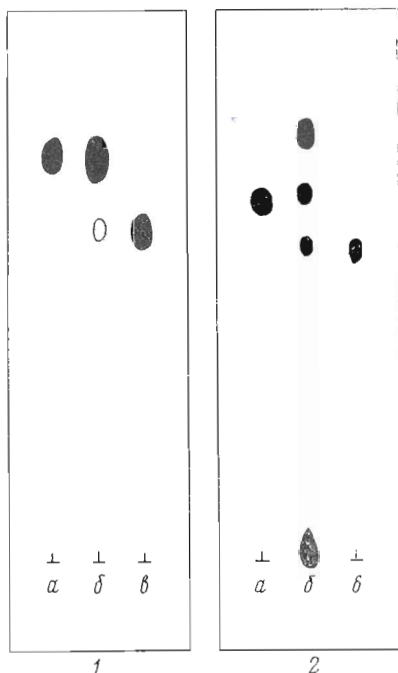
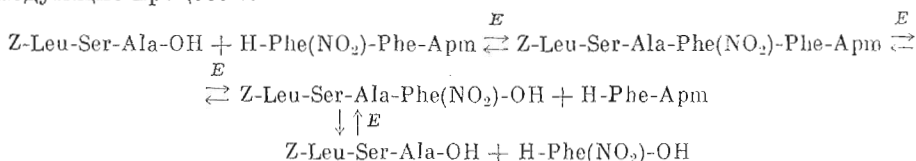


Рис. 2

Рис. 1. Кривые полного гидролиза  $\text{H-Phe(NO}_2\text{)-Phe-Apm}$  в присутствии активаторов  $\text{Z-Leu-Ser-Ala-OH}$  (2),  $\text{Z-Phe-Ala-Ala-OH}$  (3) и без активаторов (1)

Рис. 2. ТСХ продуктов превращения  $\text{H-Phe(NO}_2\text{)-Phe-Apm}$  в присутствии активатора  $\text{Z-Phe-Ala-Ala-OH}$ . 1 — этилацетатный экстракт кислого раствора реакционной смеси: а)  $\text{Z-Phe-OH}$  — свидетель, б) реакционная смесь, в)  $\text{Z-Phe-Ala-Ala-OH}$  — свидетель; 2 — водный раствор: а)  $\text{H-Phe(NO}_2\text{)-OH}$  — свидетель, б) реакционная смесь, в)  $\text{H-Ala-Ala-OH}$  — свидетель

следующие процессы:



Полученные данные показывают, что по крайней мере в исследованных нами случаях механизм активации заключается в катализируемом пепсином синтезе из активатора и субстрата нового пептида и последующем его гидролизе. В работе [1] мы рассматривали гипотетическую возможность такого механизма активации. При этом отмечалось, что в таком случае скорость гидролиза дипептида в присутствии активатора может лимитироваться стадией синтеза нового пептида. К сожалению, непосредственно определить скорость синтеза пентапептида весьма сложно, поскольку его стационарная концентрация, по-видимому, очень мала. Оценка константы скорости синтеза может быть сделана на основании данных [1] по гидролизу пептида  $\text{H-Ala-Phe(NO}_2\text{)-Ala-Apm}$  в присутствии  $\text{Z-Leu-Ser-Ala-OH}$ . Константа скорости гидролиза этого соединения по связи  $\text{Ala-Phe(NO}_2\text{)}$  равна  $0,48 \text{ мин}^{-1}$ . Учитывая, что константа равновесия синтез-гидролиз для пептидов при pH 4 лежит в области единицы [4], разумно допустить, что каталитическая константа скорости синтеза пентапептида  $\sim 0,5 \text{ мин}^{-1}$ . Отсюда при оптимальных концентрациях дипептидного субстрата и активатора (соответственно  $2 \cdot 10^{-3}$  и  $4 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ ) скорость синтеза, вычисленная по уравнению Михаэлиса для двухсубстратной ре-

акции, составляет  $\sim 1,5 \cdot 10^{-5}$  М·мин<sup>-1</sup>. В этих условиях экспериментально наблюдаемая начальная скорость гидролиза дипептида в присутствии активатора (по связи Phe-Phe(NO<sub>2</sub>)) составляет  $4,7 \cdot 10^{-5}$  М·мин<sup>-1</sup>. Учитывая некоторую неопределенность в точной оценке константы скорости синтеза пептидной связи, можно видеть, что приведенные значения удовлетворительно совпадают.

### Экспериментальная часть

Коммерческий препарат пепсина свиньи (Олайнский завод химреактивов) очищали ионообменной хроматографией на DEAE-целлюлозе с последующим обессоливанием на сефадексе G-25 по методу [5]. Удельная активность — 2800 ед./мг фермента [6].

Синтез активаторов Z-Phe-Ala-Ala-OH и Z-Leu-Ser-Ala-OH осуществляли как описано в работе [1]. Субстрат 2HBr·H-Phe(NO<sub>2</sub>)-Phe-Arm получали из Z-Phe(NO<sub>2</sub>)-Phe-Arm снятием бензилоксикарбонильной группы бромистым водородом в ледяной уксусной кислоте, R<sub>f</sub> 0,45 на пластинках «Силуфол» (этилацетат — метанол — 25% водный аммиак — гексан, 30 : 10 : 0,1 : 10). Соединения H-Phe(NO<sub>2</sub>)-OH и Z-Phe(NO<sub>2</sub>)-OH синтезировали согласно [7]; H-Ala-Ala-OH синтезировали методом смешанных ангидридов [8] с изобутилхлоругольным эфиром из Z-Ala-OH и H-Ala-OMe. Эфир пептида гидролизовали 1 н. NaOH при комнатной температуре в течение 1 ч, бензилоксикарбонильную защиту снимали бромистым водородом в ледяной уксусной кислоте, R<sub>f</sub> 0,75 на пластинках «Силуфол» (этиловый спирт — вода — 25% водный аммиак, 70 : 30 : 1).

Ход гидролиза субстратов регистрировали прямым спектрофотометрированием при 320 нм на спектрофотометре фирмы «Gilford» (США).

При проведении ферментативной реакции 28,4 мг 2HBr·H-Phe(NO<sub>2</sub>)-Phe-Arm и 19,2 мг Z-Phe-Ala-Ala-OH растворяли в 36 мл 0,1 М натрий-ацетатного буфера, pH 4,0 (в рабочем растворе [S]=[A]=1 мМ). Смесь термостатировали при 37° С, добавляли 6,8 мг пепсина в 4 мл буфера ([E]  $5 \cdot 10^{-6}$  М) и выдерживали 3 ч при 37° С. Изменение молярного коэффициента поглощения за это время составило  $\Delta \epsilon_{320} 1250$  М<sup>-1</sup>см<sup>-1</sup>. Реакцию останавливали доведением pH раствора до 8. Через 30 мин pH раствора доводили до 7 и фильтровали под давлением 2 атм через мембрану M-1111 на фильтре ФМ01-200.

Для выделения продукта реакции отделенный от пепсина раствор упаривали до объема 10 мл, доводили pH до 9,5 и экстрагировали этилацетатом (3×1 мл). Доводили pH водного раствора до 2 и экстрагировали этилацетатом (3×1 мл). Этилацетатный экстракт кислого раствора промывали водой, сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и хроматографировали на силикагелевых пластинках размером 50×200 мм (без флуоресцентного индикатора) фирмы «Merck» (ФРГ) в системе этилацетат — метанол, 2 : 1. Обнаружение пятен осуществляли с помощью хлоролидиновой пробы [9]. Доводили pH водного раствора до 7 и хроматографировали смесь на силикагелевых пластинках в системе метанол — этилацетат — 25% водный аммиак — вода, 5 : 5 : 1 : 1. Полосы проявляли ингибрином [9]. Вещество с R<sub>f</sub> 0,75 элюировали с пластинки 0,1 н. уксусной кислотой, проводили его кислотный гидролиз в стандартных условиях и определяли аминокислотный состав вещества на приборе «Durrum D-500» (США). В качестве стандарта использовали кислотный гидролизат N-бензилоксикарбонил-L-п-нитрофенилаланина.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Зинченко А. А., Руми Л. Д., Антонов В. К. Активация и ингибирование пепсинового катализа. — Биооргани. химия, 1978, т. 4, № 8, с. 1122–1128.
2. Schechter J., Berger A. On the size of the active site in proteases. I. Papain. — Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1967, v. 27, № 2, p. 157–162.
3. Wang T.-T., Dorrington K. J., Hofmann T. Activation of the action of penicillopepsin on leucyl-tyrosyl-amide by a non-substrate peptide and evidence for a conformatio-

- nal change associated with a secondary binding site.— *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, 1974, v. 57, № 3, p. 865–869.
4. Козлов Л. В., Гинодман Л. М., Орехович В. Н., Валуева Т. А. Свободная энергия гидролиза пептидной связи и ферментативный синтез эфиров N-ацетилдипептидов.— *Биохимия*, 1966, т. 31, вып. 2, с. 315–321.
  5. Гинодман Л. М. Выделение высокоочищенных препаратов пепсиногена и пепсина с помощью ионообменников на целлюлозной основе. В сб.: *Актуальные вопросы современной биохимии* / Под ред. Ореховича В. Н. М.: Медгиз, 1962, т. 2, с. 54.
  6. *Worthington enzymes and related biochemicals*, 1978, p. 143. Millipore Corporation, Bedford, MA, 01730.
  7. Inouye K., Fruton J. S. Studies on the specificity of pepsin.— *Biochemistry*, 1967, v. 6, № 6, p. 1765–1777.
  8. Зинченко А. А., Румш Л. Д., Антонов В. К. Кинетический и термодинамический анализ специфичности пепсина.— *Биоорг. химия*, 1977, т. 3, № 12, с. 1663–1670.
  9. Ахрем А. А., Кузнецова А. И. Тонкослойная хроматография. М.: Наука, 1965, с. 169, 170.

Поступила в редакцию  
5.III.1981

#### A MECHANISM FOR ACTIVATION OF DIPEPTIDE HYDROLYSIS CATALYZED BY PEPSIN

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

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

Acceleration of the pepsin catalyzed hydrolysis of dipeptides in the presence of peptide activators is due to the synthesis, from the substrate and activator, of a new peptide and its subsequent cleavage at the most sensitive bond.