



Структура и функция биополимеров

УДК 547.586.2:577.154.35

С. А. Пояркова, В. П. Кухарь, М. Т. Колычева,
С. Н. Храпунов, А. И. Драган

СИНТЕЗ ДИПЕПТИДОВ, СОДЕРЖАЩИХ МЕТА- И ПАРА-ФТОРФЕНИЛАЛАНИН. РАЗДЕЛЕНИЕ НА ОПТИЧЕСКИЕ ИЗОМЕРЫ И ИЗУЧЕНИЕ ИХ РЕАКЦИОННОЙ СПОСОБНОСТИ В ОТНОШЕНИИ ТРОМБИНА *

Из рацемата тозил-м- и тозил-п-фторфенилаланина синтезирована серия оптически активных дипептидов общей формулы: Tos-X-Arg-OCH₃, где X=D-Phe(mF), L-Phe(mF), D-Phe(pF), L-Phe(pF).

Исследование спектров поглощения и разностных спектров флюоресценции выявило ряд отличий, обусловленных конформационной подвижностью DL- и LL-изомеров. Батохромный сдвиг спектров поглощения и флюоресценции дипептидов с м-фторфенилаланином отличается от такового дипептида, содержащего п-фторфенилаланин.

Изучение кинетики гидролиза синтезированных соединений тромбином показало, что субстраты содержащие D-изомеры фторфенилаланина, ферментом не расщепляются. Дипептид, содержащий L-изомер п-фторфенилаланина, обладает биорегуляторным эффектом, в то время как дипептид, содержащий L-изомер м-фторфенилаланина, этим эффектом не обладает.

Обсуждается связь между конформационной подвижностью пептидов и их субстратными характеристиками, а также роль π—π-взаимодействий при образовании фермент-субстратного комплекса.

Введение. Тромбин (КФ 3:4:21:5) как биорегуляторная сериновая протеиназа, обладающая узкоспецифическим действием по отношению к своему природному субстрату — фибриногену — по-прежнему остается предметом пристального внимания исследователей. Это обусловлено не только важностью его физиологической функции, но и участием тромбина в других многочисленных процессах, характеризующих его как биорегуляторную протеиназу [1, 2]. Поэтому изучение механизма каталитического действия тромбина, который, по всей видимости, несколько отличается от механизма действия других сериновых протеиназ, таких как химитрипсин и трипсин, является весьма актуальной задачей.

Многочисленные работы по исследованию тромбина привели к представлению о том, что он имеет более протяженный вторичный связывающий центр, чем другие родственные ему сериновые протеиназы, например, трипсин [3, 4]. Не раз отмечалась важность гидрофобных контактов пептидных лигандов с подцентрами S₂ и S₃ фермента [5]. Было показано также, что для продуктивного связывания пептидных лигандов необходимо, чтобы последние имели изогнутую

* Представлена членом редколлегии В. К. Кибиревым

конформацию. Так, наилучшими синтетическими субстратами или ингибиторами являются пептиды, которые в подцентре P₂ содержат пролин, а в положении P₃ — гидрофобный остаток *D*-фенилаланина [6, 7]. И, наконец, выдвинуто предположение о наличии в молекуле тромбина дополнительного центра узнавания — связывания высокомолекулярных субстратов, находящегося вне зоны активного центра фермента [8]. Однако вопрос пространственной организации активного центра тромбина и механизм каталитического акта с учетом природы сил, принимающих в нем участие, в настоящее время изучен недостаточно для целостного представления о природе узкой специфичности тромбина.

Поэтому задачей настоящей работы является синтез новых субстратов, содержащих *D*- и *L*-изомеры *m*- и *n*-фторфенилаланина, и исследование каталитического расщепления их тромбином. Анализ различной конфигурации гидрофобного остатка фенилаланина и различного распределения электронной плотности в бензольном ядре фенилаланина за счет введения фтора в *m*- или *n*-положение позволит получить дополнительные сведения о функционировании активного центра тромбина.

Материалы и методы. Использовали аргинин фирмы «Reanal» (Венгрия). Температуру плавления (T_{пл}) синтезированных соединений определяли на малогабаритном столике типа «Boetins» (Германия). О гомогенности пептидов судили по данным ТСХ на пластинках «Silufol» (ЧСФР) в следующих системах растворителей: А) *n*-бутанол — пиридин — уксусная кислота — вода (30 : 20 : 6 : 10); С) бензол — этилацетат (5 : 4). Для препаративной очистки пептидов использовали колоночную хроматографию на окиси алюминия («Reanal»), нейтральная, активность по Брокману II. Электрофорез пептидов осуществляли на бумаге «Filtrak-16» (Германия) в течение 1 ч при pH 6,5 и градиенте напряжения 60 В/см. Электрофореграммы проявляли реактивом Сакагучи. Вещества после ТСХ обнаруживали йодом. Удельное вращение пептидов измеряли на спектрополяриметре «Spectropol-1» («Sofica», Франция).

Спектры поглощения, разностные спектры поглощения исследуемых соединений регистрировали на спектрофотометре КСВУ-23; спектры флюоресценции — на спектрофлюориметре Элюмин-2М.

N-Тозил-(*D*, *L*)-*n*-фторфенилаланин. К раствору 2,5 г (14 ммоль) *n*-фторфенилаланина в 14 мл водного 2 н. раствора NaOH прибавляли по каплям раствор 2,6 г (14 ммоль) *n*-толуолсульфохлорида в эфире при интенсивном перемешивании. Выпадал белый осадок. Смесь оставляли на 12 ч при 5 °С, затем осадок отфильтровывали, растворяли в 20 %-м водном растворе NaOH при температуре 100 °С. Горячий раствор подкисляли 6 н. HCl до pH 2,0. После охлаждения раствора выпавший осадок отфильтровывали, высушивали и кристаллизовали из бензола. Получено 3,9 г (83 %) *N*-тозил-*n*-фторфенилаланина. T_{пл} 145—146 °С. Найдено (%): С 56,97; Н 4,75; F 5,64. C₁₆H₁₆FNO₄S. Вычислено (%): С 56,71; Н 4,86; F 5,64.

N-Тозил-(*D*, *L*)-*m*-фторфенилаланин получен аналогично с выходом 66 %. T_{пл} 122—124 °С. Найдено (%): С 56,58; Н 4,65; F 5,61. C₁₆H₁₆FNO₄S. Вычислено (%): С 56,71; Н 4,86; F 5,64.

N-Оксисукцинимидный эфир тозил-(*D*, *L*)-*n*-фторфенилаланина. К раствору 3,96 г (11,74 ммоль) тозил-*n*-фторфенилаланина и 1,35 г (11,14 ммоль) *N*-гидроксисукцинимиды в 25 мл абс. ТГФ, охлажденному до 0 °С, прибавляли 2,42 г (11,74 ммоль) дициклогексилкарбодиимида и размешивали 4 ч при 0 °С и 12 ч при комнатной температуре. Осадок дициклогексилмочевины отфильтровывали, фильтрат упаривали на ротационном испарителе при 40 °С, остаток кристаллизовали из изопропанола. Выход 4,52 г (96 % от теор.). R_f (С) 0,36. T_{пл} 200 °С. Найдено (%): С 55,24; Н 4,44; N 6,40; F 4,36. C₂₀H₁₉O₆N₂FS. Вычислено (%): С 55,29; Н 4,41; N 6,45; F 4,37.

N-Тозил-(D, L)-*n*-фторфенилаланиларгинин. К раствору 3,4 г (8,17 ммоль) Tos-(D, L)-Phe(pF)-OSu в 20 мл диоксана прибавили раствор 1,43 г (8,17 ммоль) аргинина в 7 мл воды. Реакционную смесь размешивали 18 ч при комнатной температуре. Растворитель отгоняли в вакууме при 40 °С. Осадок кристаллизовали из 50 %-го водного этанола. Получено 3,08 г (76 % от теор.). $T_{пл}$ 258—260 °С. R_f (A) 0,67; E_{Arg} = 0,13. Найдено (%): С 53,56; Н 5,78; N 14,22; F 3,86. $C_{22}H_{28}O_5N_5FS$. Вычислено (%): С 53,54; Н 5,72; N 14,19; F 3,85.

N-Тозил-(D, L)-*m*-фторфенилаланиларгинин. Синтезировали, как описано выше, из 3,7 (8,9 ммоль) Tos-(D, L)-Phe(mF)-OSu и 1,55 г аргинина. Получено 4,25 г (96 %). R_f (A) 0,67; E_{Arg} = 0,13. $T_{пл}$ 265 °С. Найдено (%): С 53,50; Н 5,70; N 14,15; F 3,85. $C_{22}H_{28}O_5N_5FS$. Вычислено (%): С 53,54; Н 5,72; N 14,19; F 3,85.

Разделение на оптические изомеры. 1 г смеси диастереомеров растворяли при кипячении в 250 мл 50 %-го водного этанола и оставляли при комнатной температуре. Осадок фильтровали, фильтрат упаривали до уменьшения объема в два раза, охлаждали до комнатной температуры, затем до 4 °С и осадок отфильтровывали. Каждую из фракций кристаллизовали еще дважды (1 г LL-изомера из 250 мл 50 %-го этанола и 1 г DL-изомера из 150 мл 50 %-го этанола).

Метилловый эфир N-тозил(D, L)-*n*-фторфенилаланиларгинина. Раствор 0,3 г (0,61 ммоль) дипептида Tos-(D, L)-Phe(pF) Arg-OH в 5 мл абс. метанола охлаждали до -30 °С, при интенсивном перемешивании и охлаждении прибавляли 0,05 мл (0,7 ммоль) хлористого тионила. Температуру реакционной смеси произвольно поднимали до комнатной и оставляли размешиваться в течение ночи. Реакционную смесь упаривали на ротационном испарителе при 40 °С. Эту операцию повторяли трижды с 10 мл абс. метанола. Остаток растворяли в 1 мл метанола и пропускали через колонку 2 × 25 см, наполненную окисью алюминия. Дипептиды элюировали метанолом. Фракцию, содержащую пептидный материал, упаривали и высушивали над P_2O_5 . Выход 0,3 г (92 %). $T_{пл}$ 107—109 °С. R_f (A) 0,65; E_{Arg} = 0,55. Найдено (%): С 50,67; Н 5,61; N 12,91; F 3,50. $C_{23}H_{30}O_5N_5FS \cdot HCl$. Вычислено (%): С 50,78; Н 5,56; N 12,87; F 3,49.

Соединения X—XIII получены аналогично. Физико-химические характеристики всех синтезированных соединений приведены в табл. 1.

Кинетические измерения. Для работы применяли реактивы квалификации о. с. ч. или х. ч. Использовали препараты тромбина с активностью 2000—2500 NIH ед/мг (NIH — единица активности тромбина, предложенная National Institute of Health, USA). Субстраты гидролизovali тромбином в 0,15 М KCl. Скорость ферментативной

Таблица 1
Физико-химические характеристики синтезированных соединений

№	Формула	Выход, %	$T_{пл}$, °С	R_f	E_{Arg}	$[\alpha]_D^{25}$, $c=1$ (растворитель)
I	Tos-(D, L)-Phe(pF)-OH	83	145—146	0,43(C)	—	—
II	Tos-(D, L)-Phe(mF)-OH	66	122—124	0,45(C)	—	—
III	Tos-(D, L)-Phe(pF)-OSu	96	200	0,36(C)	—	—
IV	Tos-(D, L)-Phe(mF)-OSu	76	200	0,38(C)	—	—
V	Tos-L-Phe(pF)-Arg-OH	44	270	0,67(A)	0,13	-33 (2 н. NaOH)
VI	Tos-D-Phe(pF)-Arg-OH	27	245	0,55(A)	0,13	+59 (2 н. NaOH)
VII	Tos-L-Phe(mF)-Arg-OH	34	270	0,61(A)	0,13	-33 (2 н. NaOH)
VIII	Tos-D-Phe(mF)-Arg-OH	23	238	0,61(A)	0,13	+58 (2 н. NaOH)
IX	Tos-(D, L)-Phe(pF)-Arg-OCH ₃	92	107—109	0,65(A)	0,55	—
X	Tos-L-Phe(pF)-Arg-OCH ₃	84	108—109	0,64(A)	0,55	-52 (CH ₃ OH)
XI	Tos-D-Phe(pF)-Arg-OCH ₃	79	104—105	0,66(A)	0,55	+9 (CH ₃ OH)
XII	Tos-L-Phe(mF)-Arg-OCH ₃	91	107—108	0,64(A)	0,55	-51 (CH ₃ OH)
XIII	Tos-D-Phe(mF)-Arg-OCH ₃	85	102—104	0,65(A)	0,55	+9 (CH ₃ OH)
XIV	Tos-Phe-Arg-OCH ₃	97	101—103	0,65(A)	0,55	-54 (CH ₃ OH)

реакции регистрировали потенциометрическим титрованием в стационарных условиях при pH 8,5 и 25 °С, как описано ранее [10]. Значения $K_M^{\text{каж}}$, K_i , K_A и $k_{\text{кат}}$ определяли интегральным методом [11].

Результаты и обсуждение. Ранее [9] показано, что тромбин обладает ярко выраженной вторичной стереоспецифичностью. Проявляется это в отсутствии гидролиза этим ферментом субстратов, содержащих остатки гидрофобных аминокислот *D*-конфигурации в положении P_2 , в частности Tos-*D*-Val-Arg-ОСН₃, в то время как *LL*-изомер такого пептида легко гидролизует ферментом. Полученные данные хорошо интерпретируются в рамках работы, где тромбин исследовали рентгеноструктурным методом [12]. Согласно этой работе, вторичный связывающий центр тромбина организован в так называемую «гидрофобную клетку», которая образуется за счет боковых цепей аминокислот Trp215, Leu99, His57, Tyr60A и Trp60D. В исследуемом комплексе клетка «закрыта» остатком *D*-фенилаланина ингибитора *D*-Phe-Pro-Arg-СН₂Cl [12], а пролин занимает соответствующее положение в этой клетке. Кроме того, авторами обнаружена новая особенность укладки В-цепи тромбина в виде уникальной петли Tyr60A — Pro60H, которая вместе с петлей вокруг Trp148 образует узкую и глубокую щель активного центра [12]. Учитывая эти данные по организации вторичного связывающего центра тромбина, можно следующим образом объяснить отсутствие гидролиза дипептида Tos-*D*-Val-Arg-ОСН₃. Роль гидрофобного остатка, захлопывающего «гидрофобную» клетку, может играть тозилльная группа дипептида в ориентации, заданной аминогруппой *D*-валина, который укладывается в пространство подцентра P_2 . Однако, по всей видимости, достаточно сильные гидрофобные взаимодействия, возникающие между гидрофобным кластером, образованным Tos-*D*-Val, и гидрофобными остатками аминокислот активного центра фермента, не позволяют остатку аргинина проникнуть в узкую и глубокую щель активного центра тромбина ввиду свернутой конформации дипептида, делая тем самым невозможным расщепление сложной эфирной связи аргинина.

Особенно интересным и малоисследованным моментом в функционировании активного центра тромбина может быть возникновение взаимодействий между индольными кольцами двух триптофанов, участвующих в образовании подцентров S_2 и S_4 , и остатком ароматической аминокислоты субстрата, попадающей в эти подцентры. Заслуживающей внимания моделью для изучения вклада π — π -взаимодействий вторичного связывающего центра тромбина могут быть субстраты, содержащие фтор в *m*- и *p*-положениях бензольного кольца фенилаланина. Введение атома фтора в бензольное ядро фенилаланина не вносит существенных изменений в геометрию молекулы, так как атомы фтора и водорода близки по объему, и не оказывает влияния на кислотно-основные характеристики аминокислоты. В то же время блокирование *p*- или *m*-положения ароматического ядра, а также изменение электронной плотности бензольного кольца могут иметь существенное значение в изучении вопроса субстратного связывания и ингибиторных свойств пептидов по отношению к ферментным системам различного типа. Поэтому для исследования механизма ферментативного катализа и поиска новых субстратов (ингибиторов) тромбина было решено заменить в молекуле лучшего в ряду субстратов тромбина дипептида Tos-Phe-Arg-ОСН₃ фенилаланин на его фторированный в *m*- и *p*-положениях аналог с тем, чтобы получить новые субстраты этого фермента и изучить их взаимодействие с тромбином.

Учитывая труднодоступность оптически чистых *L*- и тем более *D*-изомеров фторфенилаланина, в качестве исходного продукта был взят рацемат фторфенилаланина и получено его *p*-толуолсульфонильное (тозилльное) производное, которое затем по типичной методике взаимодействия *N*-замещенной аминокислоты с *N*-гидроксисукцинимидом в присутствии дициклогексилкарбодиимида было превращено в оксисукцинимидный эфир.

N-Оксисукцинимидный эфир тозил-(D, L)-фторфенилаланина подвергали конденсации со свободным L-аргинином в водно-диоксановой среде. Полученную смесь диастереомеров LL- и DL-тозилфторфенилаланиларгинина кристаллизовали из 50 %-го водного этанола. Оказалось, что трехкратной кристаллизации было достаточно для разделения смеси на оптически чистые LL- и DL-изомеры. Об этом свидетельствовало постоянство углов оптического вращения при последующей кристаллизации. Причем худшей растворимостью обладает LL-изомер,

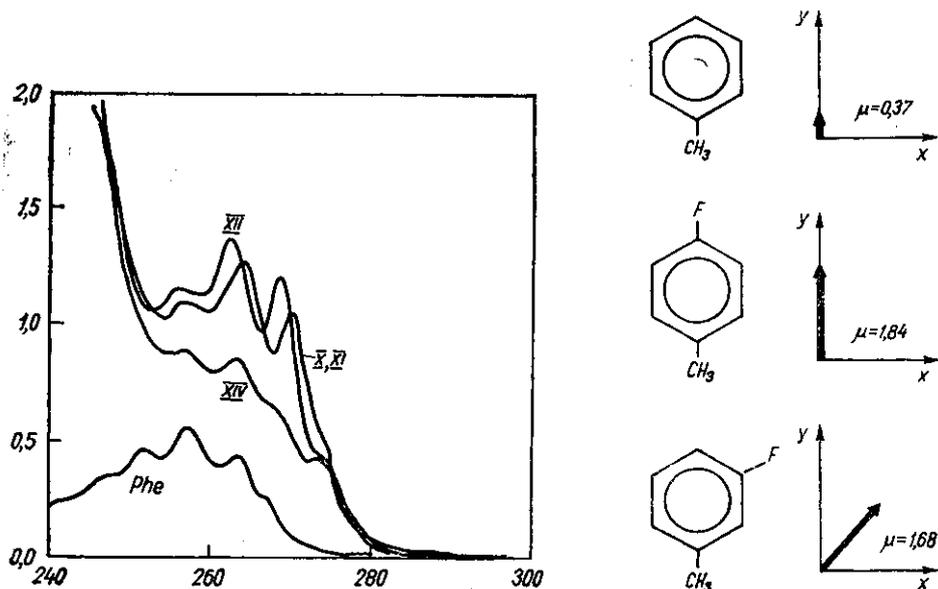


Рис. 1. Спектры поглощения водных растворов фенилаланина, Tos-Phe-Arg-OCH₃ (XIV); Tos-D-Phe(pF)-Arg-OCH₃ (XI); Tos-Phe(pF)-Arg-OCH₃; Tos-Phe(mF)-Arg-OCH₃ (XII). Концентрация соединений X—XIV в растворе 10⁻³ М, фенилаланина 3,5·10⁻² М

Рис. 2. Величина и направление дипольных моментов в ароматических ядрах фенилаланина (1), *p*-фторфенилаланина (2) и *m*-фторфенилаланина (3)

он первым выпадает из растворителя. DL-Изомер выделяли после частичного отгона растворителя и повторной кристаллизации. Из-за лучшей растворимости DL-изомера его выход почти в два раза ниже, чем LL-изомера (см. табл. 1). Конечным этапом синтеза было превращение дипептидов со свободным C-концевым аргинином в соответствующие метиловые эфиры за счет обработки хлористым тиоилом в абсолютном метаноле при -30 °С. Полученные метиловые эфиры очищали на колонке, заполненной окисью алюминия (рН 8,0, степень активности по Брокману II).

Изучение спектров поглощения в диапазоне 246—292 нм, разностных спектров поглощения и спектров флюоресценции позволило обнаружить отличия в спектральных характеристиках DL- и LL-стереоизомеров дипептидов, а также дипептидов, содержащих фтор в *m*- или *p*-положениях бензольного ядра фенилаланина. В табл. 2 представлены соответствующие данные.

Как видно из рис. 1, в водных растворах соединения X—XIV обладают структурированными спектрами поглощения с хорошо разрешенной колебательной структурой. При этом четко проявляются различия в спектрах поглощения (см. рис. 1) и флюоресценции (рис. 5) *p*- и *m*-фторпроизводных фенилаланина дипептидов Tos-L-Phe(pF)-Arg-OCH₃ и Tos-D-Phe(pF)-Arg-OCH₃, связанные, по-видимому, с различием в симметрии хромофоров и соответственно в колебательных частотах электронного спектра, а также в величине и направлении дипольных моментов хромофоров (рис. 2). Спектральные отличия ис-

следованных соединений X—XIV наиболее четко обнаруживаются в разностных спектрах поглощения (рис. 3), которые могут служить в качестве контроля наличия *n*- и *m*-фторпроизводных фенилаланина.

Спектры поглощения *DL*- и *LL*-стереоизомеров, содержащих *p*-фторфенилаланин (соединения X и XI), различаются незначительно. Однако эти различия четко можно видеть в разностном спектре, полученном вычитанием спектра поглощения соединения X из соответствующего спектра дипептида XI (рис. 4). Разностный спектр (рис. 3) поглоще-

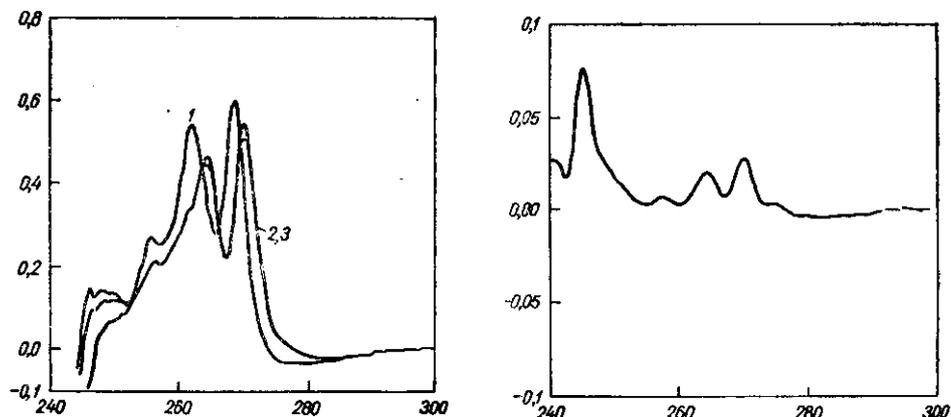


Рис. 3. Разностные спектры поглощения: 1 — из спектра поглощения XII вычтен спектр поглощения XIV; 2, 3 — то же из X и XI. Концентрация вещества 10^{-3} М

Рис. 4. Разность между спектрами поглощения Tos-Phe-(*p*F)-Arg-OCH₃ (X) и Tos-D-Phe-(*p*F)-Arg-OCH₃ (XI). Концентрация 10^{-3} М

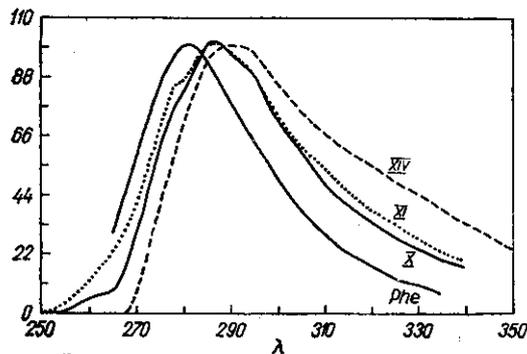
ния свидетельствует об уширении спектра поглощения *D* (*p*F)-фенилаланина в составе дипептида по сравнению с *L* (*p*F)-фенилаланином. Найденные отличия, по-видимому, связаны с влиянием положительно заряженного остатка аргинина дипептидов на электронное состояние кольца, т. е. существуют отличия в конформации дипептидов X и XI, отражающиеся на их спектрах поглощения. Более существенные отличия между соединениями X и XI проявляются в спектрах флуоресценции (рис. 5). Полуширина спектра флуоресценции соединения XI больше, чем соединения X (подобно как и в спектрах поглощения). Последнее, видимо, обусловлено тем, что в возбужденном состоянии возрастает дипольный момент фторзамещенных производных фенилаланина и происходит взаимодействие с катионным остатком аргинина. Причем это в большей степени касается *DL*-стереоизомеров (соединение XI), в которых *D*-фторфенилаланин может быть пространственно приближен к остатку аргинина. Различия в конформации *DL*- и *LL*-стереоизомеров Tos-Phe(*p*F)-Arg-OCH₃ исследовали также по степени тушения их флуоресценции в комплексе с ДНК. Известно, что при взаимодействии пептидов и белков, содержащих ароматические аминокислоты, происходит тушение их флуоресценции в результате миграции энергии на ДНК [15]. При этом степень тушения зависит от расстояния хромофоров от ДНК и их взаимной ориентации. В растворах с низкой ионной силой дипептиды Tos-Phe(*p*F)-Arg-OCH₃ взаимодействуют с ДНК посредством положительно заряженного остатка аргинина, что сопровождается тушением их флуоресценции. Добавление NaCl до концентрации 500 мМ при-

Таблица 2

Положение максимумов спектров поглощения соединений X—XIV

Фенилаланин	XIV	X, XI	XII
267 (плечо)	273,5	273,5 (плечо)	273,5
263	268 (плечо)	270	268,5
257	263	264	262,5
251	257	256	256
247	—	—	—
242	—	—	—

водит к диссоциации дипептидов от ДНК и увеличению флюоресценции. Измеренные коэффициенты тушения для исследованных дипептидов Tos-L-Phe(pF)-Arg-OCH₃ и Tos-D-Phe(pF)-Arg-OCH₃ были равны 0,92 и 0,83 соответственно. Таким образом, различия в степени тушения флюоресценции изученных соединений, так же как и отличия в их электронных спектрах, по-видимому, обусловлены отличиями в конформации DL- и LL-стереоизомеров хромофоров в составе дипептидов.

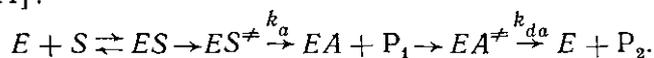


Субстратные свойства соединений изучали методом потенциометрического титрования при pH 8,5 и темпера-

Рис. 5. Спектры флюоресценции фенилаланина, Tos-Phe-Arg-OCH₃ (XIV); Tos-Phe-(pF)-Arg-OCH₃ (X); Tos-D-Phe(pF)-Arg-OCH₃ (XI) в комплексе с ДНК; λ_{ex} = 257 нм

туре 25 °С. Кинетические параметры гидролиза этих субстратов тромбином приведены в табл. 3. Как следует из данных, приведенных в этой таблице, дипептиды, содержащие D-изомеры фторфенилаланина, гидролизу тромбином не подвергаются вплоть до концентрации фермента 10⁻⁵ М. Это вполне согласуется с результатами, полученными нами при анализе гидролиза стереоизомеров дипептида Tos-D-Val-Arg-OCH₃, и подтверждает наличие у тромбина ярко выраженной вторичной специфичности.

При исследовании ферментативного гидролиза Tos-L-Phe(pF)-Arg-OCH₃ оказалось, что кинетические параметры гидролиза (K_М и k_{кат}) существенно зависят от концентрации субстрата. Так, при концентрации дипептида ниже значения K_М наблюдается ингибирование продуктом реакции, как это следует из графика зависимости в координатах Клевсова [11] (рис. 6). Константа ингибирования, определенная из графика зависимости K_М^{каж} ÷ (S), равна K_i = 0,3 · 10⁻⁵ М (рис. 7). Видно, что продукт ферментативной реакции связывается сильнее, чем субстрат, или торможение реакции происходит за счет замедления стадии деацилирования согласно схеме ферментативной реакции [11]:



Можно предположить, что продукт реакции — дипептид с гидрофобным кластером в P₂ и P₃ — за счет сильных гидрофобных взаимодействий с соответствующими подцентрами тромбина и возможных π — π-взаимодействий медленно покидает активный центр фермента,

Таблица 3
Кинетические параметры гидролиза дипептидов тромбином при 25 °С и pH 8,5

Соединение	K _М , 10 ⁻⁵ М	k _{кат} , с ⁻¹	k _{кат} /K _М , 10 ⁵ М ⁻¹ с ⁻¹
Tos-Phe (pF)-Arg-OCH ₃ 2,7 · 10 ⁻⁵ М	1,0 ± 0,13	8,0 ± 0,21	8,0
5,5 · 10 ⁻⁵ М	0,6 ± 0,03	73,0 ± 2,12	12,0
Tos-Phe (mF)-Arg-OCH ₃	1,66 ± 0,25	15,35 ± 1,23	15,0
Tos-Phe-Arg-OCH ₃	0,74 ± 0,01	18,75 ± 1,13	25,3

Примечание. Среднеквадратичную ошибку находили из 3—5 независимых определений.

что препятствует связыванию следующей молекулы субстрата и вызывает торможение реакции.

При увеличении концентрации субстрата вторая его молекула может связываться в активном центре тромбина, вызывая субстратную активацию. Из литературы известно [3, 5], что недалеко от «кармана» первичного связывания находится вторичный связывающий центр фермента, имеющий гидрофобную природу. Этот же участок играет заметную роль в проявлении так называемой субстратной активации [16]. С учетом этого, а также данных рентгеноструктурного анализа [12] можно предположить, что функцию такого центра способен выполнять подцентр тромбина S_4 , образованный остатками гидрофобных аминокислот Trp215, Ile174, Glu217 и отличный по архитектуре от такового трипсина, а находящийся рядом с ним субцентр S_3 считается более кислым из-за остатка Glu192 [12]. Исходя из вышеизложенного возникает предположение о том, что субстратная активация, обнару-

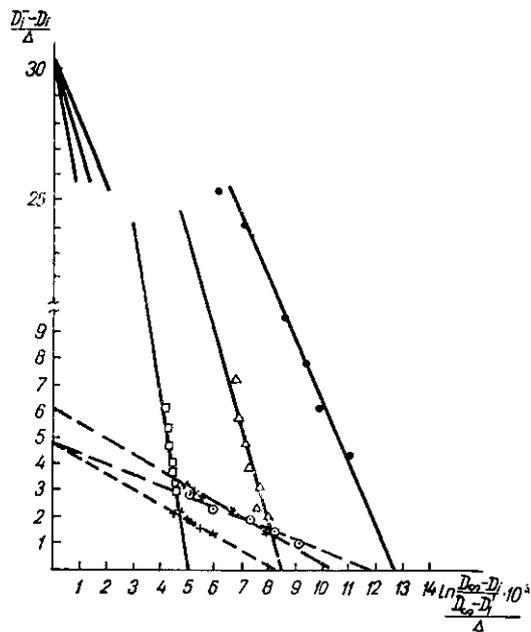


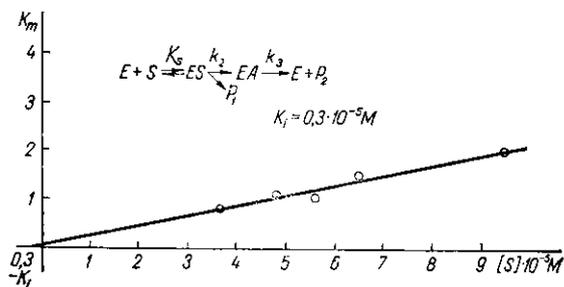
Рис. 6. Обработка кинетических кривых в координатах Клеса [11]. Концентрация субстрата Tos-Phe(pF)-Arg-OCH₃ (2—6) $\times 10^{-5}$ М

женная при ферментативном гидролизе Tos-Phe(pF)-Arg-OCH₃ при концентрациях пептида выше значений $K_M^{каж}$, обусловлена, по всей видимости, взаимодействием следующей молекулы субстрата с подцентрами S_4 и S_3 . В пользу такого предположения может свидетельствовать также работа [6], согласно которой лучшими субстратами тромбина являются тетрапептиды, содержащие два остатка аргинина.

Согласно данным, приведенным в табл. 3, дипептид, содержащий *m*-фторфенилаланин, таким эффектом не обладает и гидролизуется тромбином с той же эффективностью, что и нефторированный аналог, но связывается с ферментом почти в два раза хуже. Однако нужно заметить, что приведенные в таблице значения $K_M^{каж}$ являются сложными величинами, так как определяются не только сродством субстрата к ферменту, но и зависят от скоростей стадий ацилирования и деацилирования. Ранее нами [10] были определены индивидуальные константы скоростей и истинная константа связывания для дипептида Tos-Phe-Arg-OCH₃ ($K_i = 1,5 \cdot 10^{-5}$ М). Это практически соответствует константе Михаэлиса для фторированного в *m*-положении аналога. Возможно, что введение фтора в *m*-положение бензольного ядра фенилаланина нарушает непродуктивное связывание субстрата с ферментом, имеющее место в случае нефторированного аналога, что приводит к изменению соотношения k_2 и k_3 и приближает значение $K_M^{каж}$ к истинному значению константы связывания.

Различия в кинетическом поведении дипептидов, содержащих фтор в *m*- и *n*-положениях бензольного ядра фенилаланина, становятся более понятными и при рассмотрении спектров поглощения и флуоресценции синтетизированных соединений. Уширение спектров флуоресценции *DL*-стереоизомеров свидетельствует о том, что положительно заряженная группа аргинина оказывает влияние на ароматическое ядро фтор-

фенилаланина. Это в свою очередь позволяет предположить наличие более компактной структуры *DL*-стереоизомеров по сравнению с *LL*-изомерами. «Свернутая» конформация *DL*-изомера препятствует эффективной укладке субстрата в «гидрофобной клетке» вторичного связывающего центра тромбина, она также не позволяет сложной эфирной группе аргинина принять конформацию, необходимую для ее ферментативного расщепления тромбином. Можно думать, что этим и объясняется устойчивость к гидролизу тромбином дипептидов с остатками гидрофобных *D*-аминокислот в субцентрах P_2 и P_3 .



Не менее важная информация получена при рассмотрении разностных

Рис. 7. Определение константы ингибирования K_i для Tos-Phe(pF)-Arg-OCH₃

спектров поглощения дипептидов, содержащих фтор в *m*- и *n*-положениях бензольного ядра фенилаланина. Различие в bathochromном сдвиге спектров поглощения и флуоресценции *m*- (6 нм) и *n*-производных (7—8 нм) относительно фенилаланина свидетельствует о различии в дипольных моментах этих соединений, обусловленном замещением атома водорода на атом фтора. Замена водорода в бензольном кольце фенилаланина на фтор, имеющий близкий ван-дер-ваальсов радиус, но значительно большую электроотрицательность (для водорода 2,11; для фтора 4,0), повышает величину экстинкции и изменяет соотношение интенсивностей отдельных вибронных полос (см. рис. 1). Из приведенных на рис. 1 спектров видны также различия в положении спектров поглощения исследованных соединений. Значения максимумов спектров поглощения соединений X—XIV приведены в табл. 2. Обеднение электронной плотности бензольного ядра за счет введения атома фтора, по-видимому, нарушает π — π -взаимодействия между фенилаланином и остатками триптофана вторичного центра тромбина, что приводит к ухудшению связывания и, следовательно, к увеличению константы Михаэлиса. Причем для *n*-фторфенилаланиновых производных ввиду отличного в случае *m*-производных дипольного момента (см. рис. 2) сохраняется возможность взаимодействий, которые могут осуществляться с другими статком триптофана подцентра S_4 и тем самым вызывать биорегуляторное действие. Дипольный момент *m*-фторпроизводных лишь нарушает π — π -взаимодействия, имеющие место при отсутствии фтора в фенилаланине, и не создает нужных для проявления биорегуляторного действия. Принимая во внимание участие остатков триптофана активного центра тромбина в связывании с субстратами и возможный вклад π — π -взаимодействия в прочность фермент-субстратного комплекса, можно допустить, что различная плотность электронного облака ароматического кольца субстрата и различное направление диполей, обусловленное введением фтора в *m*- или *n*-положение бензольного ядра фенилаланина, способны воздействовать на эффективность реакции с тромбином дипептидов, содержащих фторфенилаланин, что мы и наблюдаем в действительности (см. табл. 3).

Интересными, на наш взгляд, оказались данные по ферментативному гидролизу смеси диастереомеров дипептида Tos-(*D*, *L*)-Phe(*pF*)-Arg-OCH₃, полученного из дипептида Tos-(*D*, *L*)-Phe(*pF*)-Arg-OH (без предварительного его разделения на оптические изомеры) обработкой хлористым тионилем в абсолютном метаноле при -20°C .

Если при исследовании ферментативного расщепления оптически чистого субстрата количество щелочи, идущее на титрование образу-

щейся в процессе гидролиза кислоты, соответствует количеству субстрата, внесенного в реакцию, то при ферментативном гидролизе смеси диастереомеров количество образующейся в процессе реакции кислоты оказалось величиной постоянной и равнялось 66 % от общей концентрации вещества, внесенного в реакцию. Так как *DL*-изомер не гидролизует тромбином, это позволяет определить процентный состав смеси диастереомеров, которая, согласно этим данным, состоит на 66 % из *LL*-изомера и 34 % — из *DL*-изомера. Такие величины достаточно разумны, поскольку растворимость *LL*-изомера в 50 %-м этаноле хуже, чем *DL*-изомера, и поэтому выход последнего был ниже. Эти данные еще раз убеждают в наличии у тромбина вторичной стереоспецифичности и позволяют предложить метод ферментативного гидролиза тромбином метиловых эфиров дипептидов, содержащих остатки гидрофобных аминокислот в положении P_2 и P_3 , для определения их оптической чистоты.

Summary. In order to search of new substrates and inhibitors for thrombin *DL*- and *LL*-stereoisomers of dipeptide Tos-Phe-(X)-Arg-OCH₃ (where X-*m*- or *p*-fluorophenylalanine) were synthesized by classical methods of peptide chemistry from racemate tosyifluorophenylalanine. Tos-*L*-Phe(*p*F)-Arg-OCH₃ showed substrate's activation at concentration $[S] > K_M$ and inhibition by substrate at $[S] < K_M$. Tos-*L*-Phe(*m*F)-Arg-OCH₃ has no bioregulatory effect. Isomers containing *D*-fluorophenylalanine are not split by thrombin. Study of absorption spectrum and difference in spectrums of fluorescence showed different conformational flexibility of *DL* and *LL* isomers. Bathochromic shift in absorption spectrum and fluorescent spectrums of *m*-fluorophenylalanine is differ from the same of dipeptide, containing *p*-fluorophenylalanine. The connection between conformational flexibility and substrate's properties of dipeptides is discussed.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Human thrombin: Preparative, evolution, structural properties, and enzymic specificity/J. W. Fenton, B. H. Landis, D. A. Walz et al.//Chem. and physiol. of human plasma proteins/Ed. D. H. Bing.— New York: Pergamon press, 1979.— P. 151—173.
2. Fenton J. W. II. Thrombin specificity//Ann. N. Y. Acad. Sci.— 1981.— 370.— P. 468—495.
3. Liem R. K. H., Scheraga H. A. Mechanism of action of thrombin on fibrinogen. III. Partial mapping of the active sites of thrombin and trypsin.//Arch. Biochem. and Biophys.— 1973.— 158, N 1.— P. 387—395
4. Mechanism of action of thrombin on fibrinogen. Size of the A α -fibrinogen-like peptide that contacts the active side of thrombin./J. C. Meinwald, R. A. Martinelli, G. W. van Nispen et al.//Biochemistry.— 1980.— 19, N 16.— P. 3820—3825.
5. Liem R. K. H., Scheraga H. A. Mechanism of action of thrombin on fibrinogen. IV. Further mapping of the active site of thrombin and trypsin.//Arch. Biochem. and Biophys. A.— 1974.— 160, N 1.— P. 333—339.
6. Study of specificity of thrombin with tripeptidyl-p-nitroanilide substrates /M. Pozsgay, G. C. Szabo, M. Bajusz et al.// Eur. J. Biochem.— 1981.— 115, N 3.— P. 491—495.
7. Inhibition of thrombin and trypsin by tripeptide aldehyds/S. Bajusz, E. Barabas, P. Tolney et al.//Int. J. Peptide and Protein Res.— 1978.— 12, N 1.— P. 217—221.
8. Fenton J. W. II. Regulation of thrombin generation and function//Semin. Throm. Hemost.— 1988.— 14, N 3.— P. 234—240.
9. Пояркова С. А., Кибирев В. К., Серебряный С. Б. Исследование ингибиторного действия метиловых эфиров аргининсодержащих олигопептидов на тромбин и трипсин // Укр. биохим. журн.— 1987.— 58, № 5.— С. 5—11.
10. Пояркова С. А., Кибирев В. К., Серебряный С. Б. Ингибирование протеолитической активности тромбина метиловыми эфирами аргининсодержащих олигопептидов // Укр. биохим. журн.— 1986.— 58, № 6.— С. 3—7.
11. Клесов А. А., Березин И. В. Применение интегральной формы уравнения скорости для определения кинетических констант ферментативной реакции // Биохимия.— 1972.— 36, № 1.— С. 170—183.
12. The refine 1,9 Å crystal structure of human α -thrombin: interaction with D-Phe-Pro-Arg-chloromethylketone and significance of the Tyr-Pro-Pro-Trp insertion segment/ W. Bode, I. Mayer, U. Baumann et al.//EMBO J.— 1989.— 8, N 11.— P. 3467—3475.
13. Бахшиев Н. Г. Спектроскопия межмолекулярных взаимодействий.— Л.: Наука, 1972.— 265 с.
14. Свердлова Ш. В. Электронные спектры в органической химии.— Л.: Химия, 1973.— 248 с.

15. *Лакович Дж.* Основы флюоресцентной спектроскопии.— М.: Мир, 1986.— 496 с.
16. *Струкова С. М., Семенова О. А., Киреева Е. Ф.* Регуляция активности α - β / γ форм тромбина гепарином и индолом /! Биохимия.— 1980.— 45, № 4.— С. 738—748.

Ин-т биоорг. химии и нефтехимии АН Украины,
Киев

Получено 10.12.91

УДК 581.198

И. Ф. Карпилова, И. М. Соколова, С. М. Газиянц

**ВЫДЕЛЕНИЕ АКТИВНОЙ
РИБУЛОЗО-1, 5-БИСФОСФАТКАРБОКСИЛАЗЫ
ИЗ ЛИСТЬЕВ ХЛОПЧАТНИКА ВИДОВ
GOSSYPIUM HIRSUTUM L. И G. BARBADENSE L.**

Предложен быстрый метод выделения и очистки рибулозо-1,5-бисфосфаткарбоксилазы из листьев хлопчатника. Определенный комплекс добавок полностью связывает полифенолы и позволяет получить высокую общую и удельную активность фермента, выделенного из листьев зрелых растений со значительным содержанием фенольных соединений. Метод пригоден для сравнительного анализа серии образцов, что позволяет использовать его для генетических и эволюционных исследований.

Введение. Рибулозо-1,5-бисфосфаткарбоксилаза/оксигеназа (Рубиско, КФ 1.1.39) является одним из ключевых ферментов фотосинтеза и фотодыхания. В настоящее время Рубиско представляет интерес для генноинженерных работ и генетических исследований, ориентированных на повышение фотосинтетической активности разных видов растений [1].

Выделение и очистка активной Рубиско из листьев хлопчатника затруднены из-за высокого содержания полифенольных соединений, в частности госсипола, что приводит к денатурации белка при гомогенизации ткани. Для предохранения Рубиско от действия полифенолов при работе с проростками хлопчатника использовали боратный буфер, прочно связывающий полифенолы и способствующий сохранению активности фермента в процессе его выделения [2]. В наших опытах выявлено, что этот метод пригоден для исследования растений лишь на ранних стадиях онтогенеза либо для безгоссипольных сортов, промышленно возделываемых в США. При получении частично очищенных препаратов Рубиско из листьев растений, достигших репродуктивной фазы, видов *G. hirsutum L.* и *G. barbadense L.* применение метода [3] не дало положительных результатов. В экстрактах из листьев сортов вида *G. hirsutum L.* отмечено низкое содержание белка, а вида *G. barbadense L.*— используемым методом белок не выявлен совсем. Очевидно, это обусловлено различной видовой специфичностью накопления госсипола и динамики его содержания в тканях в ходе онтогенеза. Известно, что содержание полифенолов в листьях хлопчатника вида *G. barbadense L.* значительно выше, чем у других видов.

Целью настоящей работы была модификация метода [3] выделения и частичной очистки Рубиско из листьев взрослых растений различных видов и сортов хлопчатника и определение активности фермента.

Материалы и методы. Материалами опыта служили контрастные сорта 108-Ф, ВНИИССХ-1, Короткостебельный вида *G. hirsutum L.* и сорта ТСХИ-21 и Карши-2 вида *G. barbadense L.* Растения выращивали в климатической камере в течение 1,5—2 месяцев до наступления массовой бутонизации. Для анализа использовали семядольные листья,

© И. Ф. КАРПИЛОВА, И. М. СОКОЛОВА, С. М. ГАЗИЯНЦ, 1992