



Структура і функція біополімерів

УДК 547.586.2:577.154.35

С. А. Пояркова, В. П. Кухар, М. Т. Количева,
С. М. Храпунов, А. І. Драган

СИНТЕЗ ДИПЕПТИДІВ, ЩО МІСТЯТЬ МЕТА- І ПАРА-ФТОРФЕНІЛАЛАНІН. РОЗДІЛЕННЯ НА ОПТИЧНІ ІЗОМЕРИ ТА ВИВЧЕННЯ ЇХ РЕАКЦІЙНОЇ ЗДАТНОСТІ У ВІДНОШЕННІ ДО ТРОМБІНА *

Із рацемату тозил-м- і тозил-п-фторфенілаланіну синтезовано серію оптично активних дипептидів загальної формули: $Tos-X-Arg-OCH_3$, де $X=D-Phe(mF)$, $L-Phe(mF)$, $D-Phe(pF)$, $L-Phe(pf)$.

Дослідження спектрів поглинання та різницевих спектрів флюоресценції виявило ряд розбіжностей, обумовлених конформаційною рухомістю DL- і LL-ізомерів. Батохромний зсув спектрів поглинання і флюоресценції дипептидів з м-фторфенілаланіном відмінний від такого, що належить дипептиду, який містить п-фторфенілаланін.

Вивчення кінетики гідролізу синтезованих сполук тромбіном показало, що субстрати, які містять D-ізомери фторфенілаланіну, ферментом не розщиплюються. Дипептиду, що містить L-ізомер п-фторфенілаланіну, притаманний біорегуляторний ефект, в той час як дипептид, що містить L-ізомер м-фторфенілаланіну, подібним ефектом не володіє.

Обговорюється зв'язок між конформаційною рухливістю пептидів та їх субстратними характеристиками, а також роль π - π -взаємодії при утворенні фермент-субстратного комплексу.

Вступ. Тромбін (КФ 3:4:21:5) як біорегуляторна серинова протеїназа, що відзначається вузькоспецифічною дією у відношенні до свого природного субстрата — фібриногена — як і раніше, залишається предметом пильної уваги дослідників. Це обумовлено не тільки важливістю його фізіологічної функції, але й участю тромбіна в інших багаточисельних процесах, що характеризують його як біорегуляторну протеїназу [1, 2]. Тому вивчення механізму каталітичної дії тромбіна, який, скоріш за все, трохи відмінний від механізму дії інших серинових протеїназ, таких як хімотрипсин і трипсин, є досить актуальною проблемою.

Багаточисельні роботи по дослідженню тромбіна сформували уяву про те, що він має більш подовжений вторинний зв'язуючий центр, ніж інші споріднені йому серинові протеїнази, наприклад трипсин [3, 4]. Не раз було відмічено важливість гідрофобних контактів пептидних лігандів з підцентрами S_2 і S_3 ферменту [5]. Було вказано також на необхідність вигнутої конформації пептидних лігандів для їх продуктивного зв'язування. Так, найкращими синтетичними субстратами або інгібіторами є пептиди, які в підцентрі P_2 містять пролін, а в положенні P_3 — гідрофобний залишок D-фенілаланіну [6, 7]. І нарешті, висунуто здогад про наявність в молекулі тромбіна додаткового центру

* Представлена членом редколегії В. К. Кібіревим.

впізнання — зв'язування високомолекулярних субстратів, що знаходиться поза зоною активного центру фермента [8]. Однак питання просторової організації активного центру тромбіна та механізм каталітичного акту з урахуванням природи сил, які приймають участь в ньому, на сьогодні вивчено недостатньо для цілісного уявлення про природу вузької специфічності тромбіна.

Тому метою нашої роботи є синтез нових субстратів, що містять *D*- і *L*-ізомери *m*- та *n*-фторфенілаланіну, а також дослідження каталітичного розщеплення їх тромбіном. Аналіз різної конфігурації гідрофобного залишку фенілаланіну та різного розподілення електронної щільності у бензолному ядрі фенілаланіну за рахунок введення атому фтора в *m*- чи *n*-положення дозволить одержати додаткові відомості про функціонування активного центру тромбіна.

Матеріали і методи. Використовували аргінін фірми «Reanal» (Угорщина). Температуру плавлення ($T_{пл}$) синтезованих сполук визначали на малогабаритному столику типу «Boetins» (Німеччина). Про гомогенність пептидів дізнавалися із даних ТСХ на пластинках «Silufol» (ЧСФР) в таких системах розчинників: А) *n*-бутанол — піридин — оцтова кислота—вода (30 : 20 : 6 : 10); С) бензол—етилацетат (5 : 4). Для препаративної очистки пептидів використовували колонкову хроматографію на окислі алюмінію («Reanal»), нейтральну, активність за Брокманом II. Електрофорез пептидів здійснювали на папері «Filtgак-16» (Німеччина) на протязі 1 год при рН 6,5 та градієнті напруги 60 В/см. Електрофореграми проявляли реактивом Сакагучі. Речовини після ТСХ виявляли йодом. Питоме обертання пептидів вимірювали на спектрополяриметрі «Spectropol-1» («Sofica», Франція).

Спектри поглинання, різниці спектри поглинання досліджуваних сполук реєстрували на спектрофотометрі КСВУ-23; спектри флюоресценції — на спектрофлюориметрі Елюмін-2М.

N-Тозил-(*D*, *L*)-*n*-фторфенілаланін. До розчину 2,5 г (14 ммоль) *n*-фторфенілаланіну у 14 мл водного 2 н. розчину NaOH добавляли по краплях розчин 2,6 г (14 ммоль) *n*-толуолсульфохлориду при інтенсивному перемішуванні. Випадав білий осад. Суміш залишали на 12 год при 5 °С, після чого осад фільтрували, розчиняли у 20 % -му водному розчині NaOH при температурі 100 °С. Гарячий розчин підкислювали 6 н HCl до рН 2,0. Після охолодження розчину випавший осад відфільтровували, висушували і кристалізували із бензолу. Одержано 3,9 г (83 %) N-тозил-*n*-фторфенілаланіну. $T_{пл}$ 145—146 °С. Знайдено (%): С 56,97; Н 4,75; F 5,64. $C_{18}H_{16}FNO_4S$. Обчислено (%): С 56,71; Н 4,86; F 5,64.

N-Тозил-(*D*, *L*)-*m*-фторфенілаланін одержували аналогічно із виходом 66 %. $T_{пл}$ 122—124 °С. Знайдено (%): С 56,58; Н 4,65; F 5,61. $C_{18}H_{16}FNO_4S$. Обчислено (%): С 56,71; Н 4,86; F 5,64.

N-Оксисукцинімідний ефір тозил-(*D*, *L*)-*n*-фторфенілаланіну. До розчину 3,96 г (11,74 ммоль) тозил-*n*-фторфенілаланіну і 1,35 г (11,74 ммоль) N-гідроксисукциніміда в 25 мл абс. ТГФ, охоложеному до 0 °С, додавали 2,42 г (11,74 ммоль) діциклогексилкарбодіміда та перемішували 4 год при 0 °С і 12 год при кімнатній температурі. Осад діциклогексилсечовини відфільтровували, фільтрат випаровували на ротаційному випарнику при 40 °С, осад кристалізували з ізпропанолу. Вихід 4,52 г (96 % від теор.). R_f (С) 0,36. $T_{пл}$ 200 °С. Знайдено (%): С 55,24; Н 4,44; N 6,40; F 4,36. $C_{20}H_{19}O_6N_2FS$. Обчислено (%): С 55,29; Н 4,41; N 6,45; F 4,37.

N-Тозил-(*D*, *L*)-*n*-фторфенілаланіларгінін. До розчину 3,4 г (8,17 ммоль) Tos-(*D*, *L*)-Phe(pF)-OSu в 20 мл діоксану додавали розчин 1,43 г (8,17 ммоль) аргініну в 7 мл води. Реакційну суміш розмішували 18 год при кімнатній температурі. Розчинник відганяли у вакуумі при 40 °С. Осад кристалізували із 50 %-го водного етанолу. Одержано 3,08 г (76 % від теор.). $T_{пл}$ 258—260 °С. R_f (А) 0,67; $E_{Arg} = 0,13$. Знайдено (%): С 53,56; Н 5,78; N 14,22; F 3,86. $C_{22}H_{28}O_5N_5FS$. Обчислено (%): С 53,54; Н 5,72; N 14,19; F 3,85.

N-Тозил-(D, L)-*m*-фторфеніла ланіларгінін. Синтезували, як описано вище, із 3,7 г (8,9 ммоль) Tos-(D, L)-Phe(*mF*)-OSu і 1,55 г аргініну. Одержано 44,25 г (96 %). R_f (A) 0,67; $E_{Arg} = 0,13$. $T_{пл}$ 265 °C. Знайдено (%): C 53,50; H 5,70; N 14,15; F 3,85. $C_{22}H_{28}O_5N_5FS$. Обчислено (%): C 53,54; H 5,72; N 14,19; F 3,85.

Розділення на оптичні ізомери. 1 г суміші діастереомерів розчиняли при кип'ятінні в 250 мл 50 %-го водного розчину етанолу і залишали при кімнатній температурі. Осад фільтрували, фільтрат випаровували до зменшення об'єму в два рази, охолоджували до кімнатної температури, потім до 4 °C і осад відфільтровували. Кожну з фракцій кристалізували ще двічі (1 г *LL*-ізомера із 250 мл 50 %-го етанолу і 1 г *DL*-ізомера із 150 мл 50 %-го етанолу).

Метилловий ефір N-тозил-(D, L)-*n*-фторфеніла ланіларгініну. Розчин 0,3 г (0,61 ммоль) дипептиду Tos-(D, L)-Phe(*pF*)-Arg-OH в 5 мл абс. метанолу охолоджували до -30 °C, при інтенсивному перемішуванні і охолодженні додавали 0,05 мл (0,7 ммоль) хлористого тіоніла. Температуру реакційної суміші довільно піднімали до кімнатної і залишали розмішуватися на протязі ночі. Реакційну суміш випаровували на ротаційному випарнику при 40 °C. Цю операцію повторювали тричі з 10 мл абс. метанолу. Осад розчиняли в 1 мл метанолу і пропускали через колонку 2×25 см, наповнену окислом алюмінію. Дипептиди елюювали метанолом. Фракцію, що містить пептидний матеріал, випаровували і висушували в ексикаторі над P₂O₅. Вихід 0,3 г (92 %). $T_{пл}$ 107—109 °C. R_f (A) 0,65; $E_{Arg} = 0,55$. Знайдено (%): C 50,67; H 5,61; N 12,91; F 3,50. $C_{23}H_{30}O_5N_5FS \cdot HCl$. Обчислено (%): C 50,78; H 5,56; N 12,87; F 3,49.

Сполуки X—XIII одержано аналогічно. Фізико-хімічні характеристики всіх синтезованих сполук наведено в табл. 1.

Таблиця 1
Фізико-хімічні характеристики синтезованих сполук

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

Кінетичні вимірювання. В роботі застосовано реактиви кваліфікації о. с. ч. чи х. ч. Використовували препарати тромбіна активністю 2000—2500 NIH од/мг (NIH — одиниця активності тромбіна, запропонована National Institute of Health, USA). Субстрати гідролізували тромбіном в 0,15 М KCl. Швидкість ферментативної реакції реєстрували потенціометричним титруванням в стаціонарних умовах при pH 8,5 і 25 °C, як описано раніше [10]. Значення $K_{ув\text{в}}$, K_i , K_A і $k_{кат}$ знаходили інтегральним методом [11].

Результати і обговорення. Раніше [9] було показано, що тромбіну притаманна добре виражена вторинна стереоспецифічність. Проявляється це у відсутності гідролізу цим ферментом субстратів, що містять залишки гідрофобних амінокислот *D*-конфігурації в положенні P₂, зокрема Tos-*D*-Val-Arg-OCH₃, в той час як *LL*-ізомер такого пеп-

тида легко гідролізується ферментом. Отримані дані добре інтерпретуються у рамках роботи, де тромбін досліджували рентгеноструктурним методом [12]. Згідно з цією роботою вторинний зв'язуючий центр тромбіну організований у так звану «гідрофобну клітину», яка виникає за рахунок бокових ланцюгів амінокислот Trp215, Leu99, His57, Trp60A і Trp60D. У досліджуваному комплексі клітина «закрита» залишком *D*-фенілаланіну інгібітора *D*-Phe-Pro-Arg-CH₂Cl [12], а пролін займає відповідне положення у цій клітині. Крім цього, авторами знайдено нову особливість укладання В-ланцюга тромбіна у вигляді унікальної петлі Trp60A—Pro60H, яка разом з петлею навколо Trp148 створює вузьку і глибоку щілину активного центру [12]. Беручи до уваги ці дані з організації вторинного зв'язуючого центру тромбіна, можна наступним чином пояснити відсутність гідролізу дипептида Tos-*D*-Val-Arg-ONH₂. Роль гідрофобного залишка, що зачиняє «гідрофобну клітину», може грати тозильна група дипептида в орієнтації, заданій аміногрупою *D*-валіну, який укладається у простір підцентру P₂. Однак, як можна сподіватися, достатньо сильні гідрофобні взаємодії, що виникають між гідрофобним кластером, створеним Tos-*D*-Val, і гідрофобними залишками амінокислот активного центру фермента, не дозволяють залишку аргініну проникнути до вузької і глибокої щілини активного центру тромбіна завдяки згорнутій конформації дипептида, роблячи тим самим неможливим розщеплення складноєфірного зв'язку аргініну.

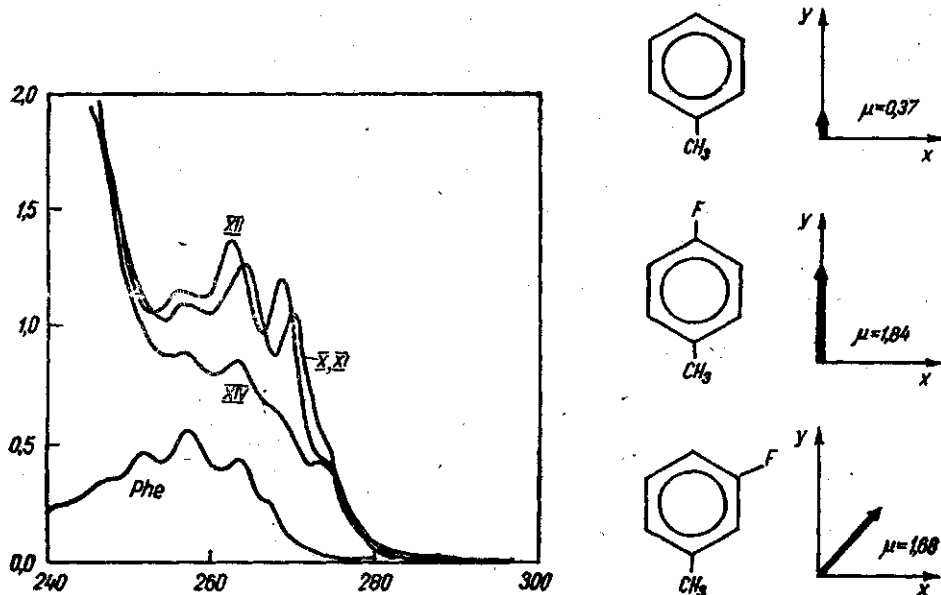
Особливо цікавим і малодослідженим моментом у функціонуванні активного центру тромбіна може бути виникнення взаємодій між індольними кільцями двох триптофанів, що беруть участь в утворенні підцентрів S₂ і S₄, та залишком ароматичної амінокислоти субстрата, яка попадає в ці підцентри. Моделлю, що заслуговує на увагу, для вивчення внеску π—π-взаємодій вторинного зв'язуючого центру тромбіна можуть бути субстрати, що містять фтор у *m*- та *p*-положеннях бензольного кільця фенілаланіну. Введення атома фтору до бензольного ядра фенілаланіну не спричиняє суттєвих змін в геометрії молекули, так як атоми фтору і водню близькі за об'ємом, та не впливає на кислотно-основні характеристики амінокислоти. У той же час блокування *p*- чи *m*-положення ароматичного ядра, а також зміна електронної щільності бензольного кільця можуть мати важливе значення у вивченні питання субстратного зв'язування і інгібіторних властивостей пептидів у відношенні ферментних систем різного типу. Тому для дослідження механізму ферментативного каталізу та пошуку нових субстратів (інгібіторів) тромбіна було вирішено замінити в молекулі найкращого із субстратів тромбіна дипептида Tos-Phe-Arg-ONH₂ фенілаланін на його фторований у *m*- і *p*-положеннях аналог для того, щоб одержати нові субстрати цього фермента та вивчити їх взаємодію з тромбіном.

Браховуючи важкодоступність оптично чистих *L*- і тим більш *D*-ізомерів фторфенілаланіна, як вихідний продукт було використано рацемат фторфенілаланіна та одержано його *p*-толуолсульфонільне (тозильне) похідне, яке далі за типовою методикою взаємодії *N*-заміщеної амінокислоти з *N*-гідроксисукцинімідом у присутності діциклогексилкарбодіміда було перетворено на оксисукцинімідний ефір.

N-Оксисукцинімідний ефір тозил-(*D*, *L*)-фторфенілаланіну конденсували з вільним *L*-аргініном у водно-діоксановому середовищі. Одержану суміш діастереомерів *LL*- і *DL*-тозилфторфенілаланіну кристалізували із 50 %-го водного етанолу. Виявилось, що трикратної кристалізації було достатньо для розділення суміші на оптично чисті *LL*- і *DL*-ізомери. Про це свідчила постійність кутів оптичного обертання при наступній кристалізації. Причому більш низькою розчинністю відзначається *LL*-ізомер, він першим випадає з розчинника. *DL*-ізомер виділяли після часткового відгону розчинника і повторної кристалізації. Завдяки кращій розчинності вихід *DL*-ізомеру майже у два рази нижчий, ніж *LL*-ізомеру (див. табл. 1). Кінцевим етапом синтезу

було перетворення дипептидів із вільним С-кінцевим аргініном у відповідні метилові ефіри за рахунок обробки хлористим тіонілом в абсолютному метанолі при -30°C . Одержані метилові ефіри очищали на колонці, заповненій окисом алюмінію (рН 8,0, ступінь активності за Брокманом II).

Вивчення спектрів поглинання у діапазоні 246—292 нм, різнице-вих спектрів поглинання і спектрів флюоресценції дозволило виявити розбіжності у спектральних характеристиках *DL*- і *LL*-стереоізомерів



Мал. 1. Спектри поглинання водних розчинів фенілаланіна, Tos-Phe Arg-OCH₃ (XIV); Tos-D-Phe(pF)-Arg-OCH₃ (XI); Tos-Phe(pF)-Arg-OCH₃ (X); Tos-Phe(mF)-Arg-OCH₃ (XII). Концентрація сполук X—XIV у розчині 10^{-3} М, фенілаланіна $3,5 \cdot 10^{-2}$ М

Мал. 2. Величина і напрямок дипольних моментів в ароматичних ядрах фенілаланіна (1), *p*-фторфенілаланіна (2) та *m*-фторфенілаланіна (3)

дипептидів, а також дипептидів, що містять фтор у *m*- чи *p*-положен-нях бензольного ядра фенілаланіну. У табл. 2 представлено відповідні дані.

Як можна бачити з мал. 1, у водних розчинах сполуки X—XIV ма-ють структуровані спектри поглинання з добре вираженою коливаль-ною структурою. При цьому чітко вирізняються розбіжності у спектрах поглинання. (див. мал. 1) і флюоресценції (мал. 5) *p*- і *m*-фтор-похідних фенілаланіну дипептидів Tos-L-Phe(pF)-Arg-OCH₃ і Tos-D-Phe(pF)-Arg-OCH₃, що пов'язані, скоріш за все, з розбіжністю в симетрії хромофорів і відповідно в коливальних частотах електронного спектру, а також у величині та напрямку дипольних моментів хромо-форів (мал. 2). Спектральні розбіжності досліджуваних сполук X—

XIV найбільш чітко прослід-жуються у різнице-вих спектрах поглинання (мал. 3), які можуть виступати в ролі кон-тролю наявності *p*- і *m*-фтор-похідних фенілаланіну.

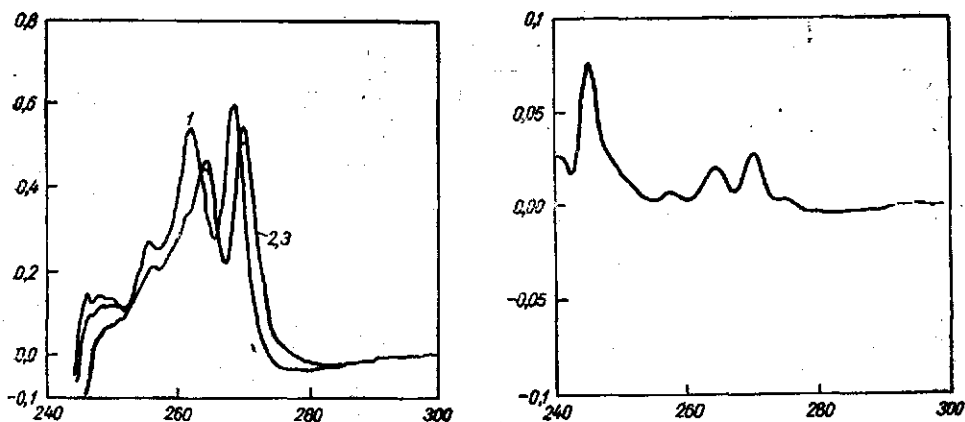
Спектри поглинання *DL*- і *LL*-стереоізомерів, що мі-стять *p*-фторфенілаланін (спо-луки X і XI), різняться не-значно. Однак ці розбіжності чітко можна бачити у різни-цевому спектрі, отриманому

Таблиця 2

Положення максимумів спектрів поглинання сполук X—XIV

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

відніманням спектру поглинання сполуки X із відповідного спектру дипептида XI (мал. 4). Даний різницевий спектр поглинання свідчить про розширення спектра поглинання *D*(*pF*)-фенілаланіну у складі дипептида порівняно з *L*(*pF*)-фенілаланіном. Знайдені розбіжності, мабуть, пов'язані з впливом позитивно зарядженого залишку аргініна дипептидів на електронний стан кільця, тобто існують розбіжності в конформації дипептидів X та XI, що позначаються на їх спектрах поглинання. Більш суттєві розбіжності між сполуками X і XI проявляються



Мал. 3. Різницеві спектри поглинання: 1 — з спектра поглинання XII віднято спектр поглинання XIV; 2, 3 — те саме з X та XI. Концентрація речовин 10^{-3} М

Мал. 4. Різниця між спектрами поглинання Tos-Phe (*pF*)-Arg-OCH₃ (X); і Tos-D-Phe(*pF*)-Arg-OCH₃ (XI). Концентрація 10^{-3} М

у спектрах флюоресценції (мал. 5). Напівширина спектра флюоресценції сполуки XI більша, ніж сполуки X (подібно до спектрів поглинання). Останнє, мабуть, обумовлене тим, що в збудженому стані зростає дипольний момент фторзаміщених похідних фенілаланіну та відбувається взаємодія з катіонним залишком аргініну. Причому це більше стосується *DL*-стереоізомерів (сполука XI), у яких *D*-фторфенілаланін може бути просторово зближеним із залишком аргініну. Розбіжності у конформації *DL*- і *LL*-стереоізомерів Tos-Phe(*pF*)-Arg-OCH₃ досліджували також за ступенем гасіння їх флюоресценції в комплексі з ДНК. Відомо, що при взаємодії пептидів і білків, що містять ароматичні амінокислоти, відбувається гасіння їх флюоресценції в результаті міграції енергії на ДНК [15]. При цьому ступінь гасіння залежить від відстані хромофорів від ДНК та їх взаємної орієнтації. У розчинах з низькою іонною силою дипептиди Tos-Phe(*pF*)-Arg-OCH₃ взаємодіють з ДНК за посередництва позитивно зарядженого залишку аргініну, що супроводжується гасінням їх флюоресценції. Додання NaCl до концентрації 500 мМ призводить до дисоціації дипептидів від ДНК та збільшення флюоресценції. Виміряні коефіцієнти гасіння для

Таблиця 3

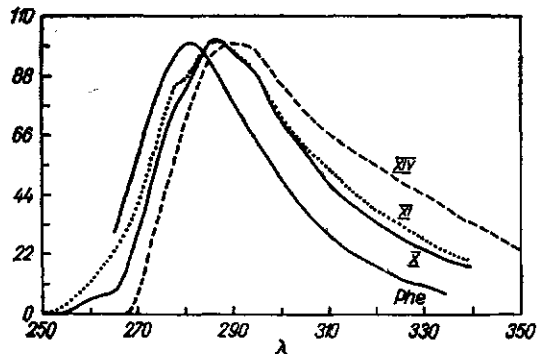
Кінетичні параметри гідролізу дипептидів тромбіном за 25 °С та рН 8,5

Сполука	$K_M \cdot 10^{-5}$ М	$k_{кат} \cdot c^{-1}$	$\frac{k_{кат}}{K_M} \cdot 10^5$ М ⁻¹ с ⁻¹
Tos-Phe (<i>pF</i>)-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 (<i>mF</i>)-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

Примітка. Середньоквадратичну помилку знаходили з 3–5 незалежних визначень.

досліджуваних дипептидів Tos-L-Phe(pF)-Arg-OCH₃ і Tos-D-Phe(pF)-Arg-OCH₃ дорівнювали 0,92 і 0,83 відповідно. Таким чином, різниця в ступені гасіння флуоресценції вивчених сполук, як і розбіжності у їх електронних спектрах, мабуть, обумовлені розбіжностями в конформації DL- і LL-стереоізомерів хромофорів у складі дипептидів.

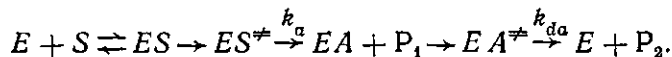
Субстратні властивості сполук вивчали методом потенціометричного титрування при pH 8,5 і температурі 25 °С. Кінетичні параметри гідролізу цих субстратів тромбіном наведено в табл. 3. Як впливає з даних цієї таблиці, дипептиди, що містять D-ізомери фторфенілаланіну, не гідролізуються тромбіном до величини його концентрації 10⁻⁵ М. Це цілком збігається з результатами, одержаними нами при аналізі гідролізу стереоізомерів ди-



Мал. 5. Спектри флуоресценції фенілаланіна, Tos-Phe-Arg-OCH₃ (XIV); Tos-Phe(pF)-Arg-OCH₃ (X); Tos-D-Phe(pF)-Arg-OCH₃ (XI) в комплексі з ДНК; λ_{екс} = 257 нм

пептида Tos-D-Val-Arg-OCH₃ та підтверджує наявність у тромбіна добре вираженої вторинної специфічності.

При дослідженні ферментативного гідролізу Tos-L-Phe(pF)-Arg-OCH₃ з'ясувалося, що кінетичні параметри гідролізу (K_M і $k_{кат}$) суттєво залежать від концентрації субстрата. Так, при концентрації дипептида нижче значення K_M спостерігається пригнічення продуктом реакції, як це впливає із графіка залежності у координатах Клесова [11] (мал. 6). Константа пригнічення, що визначена за графіком залежності $K_{увм} \div (S)$, дорівнює $K_i = 0,3 \cdot 10^{-5}$ М (мал. 7). Видно, що продукт ферментативної реакції зв'язується сильніше, ніж субстрат, або гальмування реакції відбувається за рахунок уповільнення стадії деацлювання згідно зі схемою ферментативної реакції [11]:

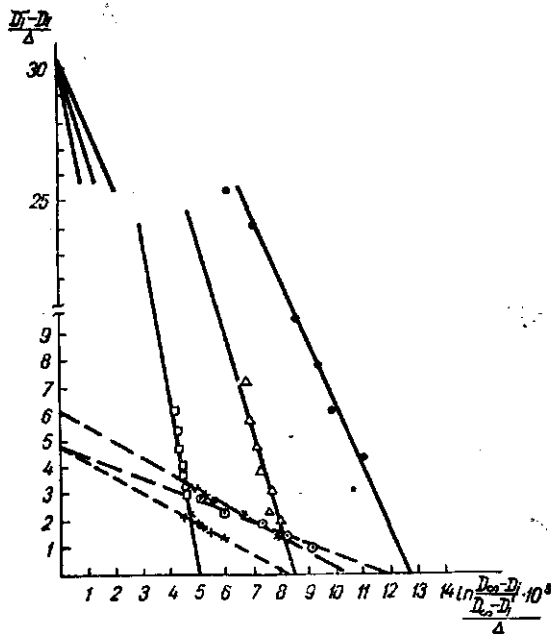


Можна припустити, що продукт реакції — дипептид з гідрофобним кластером в P₂ і P₃ — за рахунок сильних гідрофобних взаємодій з відповідними підцентрами тромбіну і можливих π-π-взаємодій повільно залишає активний центр фермента, що перешкоджає зв'язуванню наступної молекули субстрата та викликає гальмування реакції.

При збільшенні концентрації субстрата друга його молекула може зв'язуватись в активному центрі тромбіна, викликаючи активацію. З літератури відомо [3, 5], що недалеко від «карману» первинного зв'язування знаходиться вторинний зв'язуючий центр ферменту, що має гідрофобну природу. Ця ж ділянка відіграє помітну роль у проявленні так званої субстратної активації [16]. З урахуванням цього, а також даних рентгеноструктурного аналізу [12] можна припустити, що функцію такого центру здатний виконувати підцентр тромбіна S₄, зформований залишками гідрофобних амінокислот Trp215, Ile174, Glu217 та відмінний за архітектурою від такого трипсина, а субцентр S₃, що знаходиться поряд з ним, вважається більш кислим через залишок Glu192 [12]. Виходячи з наведеного вище, виникає припущення про те, що субстратна активація, виявлена при ферментативному гідролізі Tos-Phe-(pF)-Arg-OCH₃ при концентраціях пептида вище значень $K_{увм}$, обумовлена, скоріш за все, взаємодією слідуєчої молекули субстрата з підцентрами S₄ і S₃. На користь такого припущення свід-

чить також робота [6], згідно з якою кращими субстратами тромбіна є тетрапептиди, що містять два залишки аргініна.

Згідно з даними табл. 3, дипептид, що містить *m*-фторфенілаланін, такого ефекту не має і гідролізується тромбіном так само, як і нефторований аналог, але зв'язується з ферментом майже у два рази гірше. Однак потрібно зауважити, що наведені у таблиці значення $K_{M}^{уав}$ є складними величинами, тому що визначаються не тільки спорідненістю субстрата до ферменту, а й залежать від швидкостей стадій ацилювання і деацилювання. Раніш нами [10] були визначені індивідуальні константи швидкостей та істинна константа зв'язування для дипептида Tos-Phe-Arg-OCH₃ ($K_i = 1,5 \times 10^{-5}$ М). Це практично відповідає константі Міхаеліса для фторованого у *m*-положенні аналога. Можливо, що введення фтору до *m*-положення бензольного ядра фенілаланіну порушує



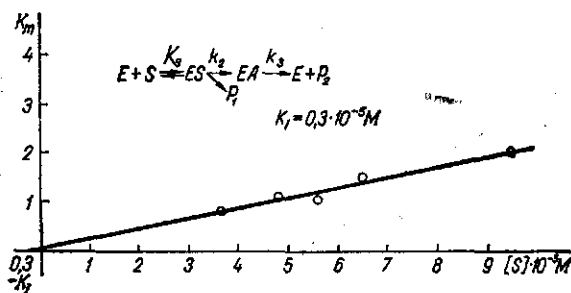
Мал. 6. Обробка кінетичних кривих у координатах Клесова [11]. Концентрація субстрата Tos-Phe(*pF*)-Arg-OCH₃ (2—6) · 10⁻⁵ М

непродуктивне зв'язування субстрата з ферментом, яке має місце у випадку нефторованого аналога, що призводить до зміни співвідношення k_2 і k_3 та наближає значення $K_M^{уав}$ до істинного значення константи зв'язування.

Розбіжності у кінетичній поведінці дипептидів, що містять фтор у *m*- і *n*-положеннях бензольного ядра фенілаланіну, стають більш зрозумілими і при розгляді спектрів поглинання і флюоресценції синтезованих сполук. Розширення спектрів флюоресценції *DL*-стереоізомерів свідчить про те, що позитивно заряджена група аргініна впливає на ароматичне ядро фторфенілаланіна. Це в свою чергу дозволяє припустити наявність більш компактної структури *DL*-стереоізомерів порівняно з *LL*-ізомерами. «Згорнута» конформація *DL*-ізомера перешкоджає ефективному укладанню субстрата у «гідрофобній клітині» вторинного зв'язуючого центру тромбіна, вона також не дозволяє складнофірній групі аргініну прийняти конформацію, необхідну для її ферментативного розщеплення тромбіном. Можна думати, що цим і пояснюється стійкість до гідролізу тромбіном дипептидів з залишками гідрофобних *D*-амінокислот у субцентрах P₂ і P₃.

Не менш важливу інформацію одержано при розгляді різницевих спектрів поглинання дипептидів, що містять фтор у *m*- і *n*-положеннях бензольного ядра фенілаланіну. Різниця в батохромному зсуві спектрів поглинання і флюоресценції *m*- (6 нм) і *n*-похідних (7—8 нм) відносно фенілаланіна свідчить про розбіжність у дипольних моментах цих сполук, обумовлених заміщенням атома водню на атом фтору. Заміна водню в бензольному кільці фенілаланіну на фтор, який має близький ван-дер-ваальсів радіус, але значно більшу електронегативність (для водню 2,11; для фтора 4,0), збільшує величину екстинкції та змінює співвідношення інтенсивностей окремих вібронних смуг (див. мал. 1). З наведених на мал. 1 спектрів можна бачити також

розбіжності в положенні спектрів поглинання досліджуваних сполук. Значення максимумів спектрів поглинання сполук X—XIV наведено в табл. 2. Збіднення електронної щільності бензольного ядра за рахунок введення атома фтору, мабуть, порушує π — π -взаємодії між фенілаланіном та залишками триптофану вторинного центру тромбіна, що призводить до погіршення зв'язування і, як наслідок, до збільшення константи Міхаеліса. При цьому для *m*-фторфенілаланінових похідних завдяки відмінному у випадку *m*-похідного дипольному моменту (див.



мал. 2) зберігається можливість взаємодій, які можуть здійснюватися з другим залишком триптофану підцентра S_4 і тим самим викликати біорегуляторну

Мал. 7. Визначення константи пригнічення K_i для Tos-Phe(pF)-Arg-OCH₃

дію. Дипольний момент *m*-фторпохідних лише порушує π — π -взаємодії, які мають місце у відсутності фтора у фенілаланіні, та не створює умов, потрібних для проявлення біорегуляторної дії. Беручи до уваги участь залишків триптофану активного центра тромбіна в зв'язуванні з субстратами та можливий вклад π — π -взаємодії в міцність фермент-субстратного комплексу, можна припустити, що різна щільність електронної хмари ароматичного кільця субстрата і різний напрямок диполів, обумовлений введенням фтора в *m*- чи *p*-положення бензольного ядра фенілаланіна, здатні впливати на ефективність реакції з тромбіном дипептидів, які містять фторфенілаланін, що ми й спостерігали в дійсності (див. табл. 3).

Цікавими, на наш погляд, виявилися дані з ферментативного гідролізу суміші діастереомерів дипептида Tos-(*D, L*)-Phe(pF)-Arg-OCH₃, одержаного із пептида Tos-(*D, L*)-Phe(pF)-Arg-OH (без попереднього його розділення на оптичні ізомери) обробкою хлористим тіонілом абсолютному метанолі при $-20^\circ C$.

Якщо при дослідженні ферментативного розщеплення оптично чистого субстрата кількість лугу, витраченого на титрування кислоти, що створюється в процесі гідролізу, відповідає кількості внесеного до реакції субстрата, то при ферментативному гідролізі суміші діастереомерів кількість створеної в процесі реакції кислоти виявилася величиною постійною і дорівнювала 66 % від загальної концентрації речовини, внесеної до реакції. Через те, що *DL*-ізомер не гідролізується тромбіном, є можливість визначити відсотковий склад суміші діастереомерів, яка, згідно з цими даними, складається на 66 % з *LL*-ізомера і 34 % — з *DL*-ізомера. Такі величини досить слушні, тому що розчинність *LL*-ізомера у 50 %-му етанолі гірша, ніж *DL*-ізомера, завдяки чому вихід останнього був нижчим. Ці дані ще раз підтверджують наявність у тромбіна вторинної стереоспецифічності та дозволяють запропонувати метод ферментативного гідролізу тромбіном метилових ефірів дипептидів, що містять залишки гідрофобних амінокислот у положенні P_2 і P_3 , для визначення їх оптичної чистоти.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

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, E. 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., Кубирев 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., Кубирев 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 refined 1,9 A 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. Свердловца Щ. В. Электронные спектры в органической химии.— Л.: Химия, 1973.— 248 с.
15. Лакович Дж. Основы флуоресцентной 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 индолем// Биохимия.— 1980.— 45, № 4.— С. 738—748.

Ін-т біоорг. хімії і нафтохімії АН України,
Київ

Одержано 10.12.91

УДК 517.150.6

Н. Н. Береговська, О. В. Савич

МОЖЛИВЕ КОДУВАННЯ ЦИТОХРОМУ C₁ ДІЛЯНКАМИ МІТОХОНДРІАЛЬНОГО ГЕНОМУ

Проведено порівняння амінокислотних послідовностей та розраховано показники гомологічності для цитохромів C₁-типу і білків НДб, які кодуються ділянками мітохондріального геному. Останні мають найбільшу гомологічність у відношенні до цитохрому C₁. У геномі мітохондрій ген, який кодує білок НДб, розташований поряд з геном, що кодує цитохром b — компоненту II комплексу дихального ланцюга, до якого входить і цитохром C₁.

Визначення структури мітохондріального геному дрозофіли [1] виявило, що склад його той самий, що й у генома мітохондрій хребетних, але порядок розташування дещо інший. Ці розбіжності продемонстровано на мал. 1, де геном дрозофіли поділено на чотири ділянки, які різняться за напрямом зчитування інформації з мРНК. У порівнянні з геномом дрозофіли у мітохондріальному геномі хребетних (людина, бик, миша, амфібія) ділянки 2 і 4 помінялися місцями. Крім того, як видно з цього малюнка, помінялося положення ділянок, які кодують 10 тРНК. Послідовність генів у геномі дрозофіли відтворює поступове ускладнення у процесі еволюції дихального ланцюга. На ділянці 1 кодується елемент НАДН-дегідрогеназного комплексу НД1. На ді-