



УДК 577.171.7:577.152.34'135

РАСЩЕПЛЕНИЕ ЖЕЛУДОЧНЫМ СОКОМ ЧЕЛОВЕКА АНАЛОГОВ ЛЮЛИБЕРИНА, СОДЕРЖАЩИХ ОСТАТОК D-АЛАНИНА

© 1997 г. О. А. Миргородская[#], Н. В. Савельева,
А. Н. Симанкова, А. А. Шевченко, С. Л. Александров*

Институт цитологии РАН, 198103, С.-Петербург, Тихорецкий просп., 4;

*Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва

Поступила в редакцию 17.09.96 г. Принята к печати 13.02.97 г.

Исследован гидролиз сурфагона и других аналогов люлиберина, содержащих остатки D-аминокислот, под действием желудочного сока человека. Хроматографически и масс-спектрометрически показано, что гидролиз пептидов по связи, образованной остатком DAla в P₋₁-положении, катализируется гастроксином, а не пепсином А. Предполагается, что гастроксин является высокоспецифичной протеиназой. Результаты согласуются с концепцией конформационной специфичности протеиназ в отношении природных олигопептидов.

Ключевые слова: желудочный сок человека, аналоги люлиберина, сурфагон, пепсин А, гастроксин, специфичность.

Регуляторные пептиды и их синтетические аналоги обычно быстро разрушаются в желудочно-кишечном тракте (ЖКТ), и поэтому их пероральное применение в качестве лекарств неэффективно, хотя именно оно наиболее удобно и для пациента, и для врача. Предотвратить же расщепление лекарственного пептида в ЖКТ практически невозможно, если неизвестен фермент, под действием которого он распадается.

Первичное расщепление пептидов и белков в ЖКТ человека происходит под действием желудочного сока (ЖСЧ), как правило, в результате гидролиза, катализируемого различными пепсинами.

В предварительных исследованиях мы заметили, что синтетические аналоги люлиберина расщепляются ЖСЧ по связи, образованной остатками DAla. По нашему мнению, пепсин А, основной фермент ЖСЧ, специфичность которого хорошо изучена [1–4], вряд ли ответствен за разрыв таких связей. Мы предположили, что их расщепляет гастроксин – минорная аспаргатная протеиназа ЖСЧ, которая отличается от пепсина крайне малой чувствительностью к пепстатину ([4], с. 255). Данные о специфичности гастроксина скупы и противоречивы [5].

Сокращения: ЖКТ – желудочно-кишечный тракт; ЖСЧ – желудочный сок человека; SFN – сурфагон; Glp – пироглутаминовая кислота; ESI-MS – масс-спектрометрический метод с электродинамическим способом ионизации; в аббревиатуре аминокислотных остатков указана их принадлежность только к D-ряду, символ L опущен.

[#] Автор для переписки.

Наше предположение подтвердилось в результате описанных ниже исследований, в которых для идентификации и количественного определения продуктов протеолиза аналогов люлиберина (табл. 1) использовали ВЭЖХ и масс-спектрометрию (ESI-MS-метод), успешно примененные нами ранее (например, при исследовании протеолиза брадикинина [6]).

Типичная хроматограмма реакционной смеси при действии ЖСЧ на сурфагон (SFN) представлена на рис. 1, а пептиды, идентифицированные во фракциях масс-спектрометрически, приведены в табл. 2. Скорость расщепления SFN определяли по уменьшению его относительной концентрации. Результаты ВЭЖХ хорошо коррелировали с данными, полученными при прямом вводе

Таблица 1. Люлиберин и его аналоги

Соединение	Аминокислотная последовательность*
Люлиберин	GlpHisTrpPheTyrGlyLeuArgProGly
Сурфагон (SFN)	GlpHis [↓] Trp [↓] SerTyr [↓] DAlaLeuArgPro
Бусерилин	GlpHisTrp [↓] SerTyr [↓] DSer(Bu [↓])LeuArgPro
SFN-(3–9)	TrpSerTyr [↓] DAlaLeuArgPro
SFN-(4–9)	SerTyr [↓] DAlaLeuArgPro
SFN-(5–9)	TyrDAlaLeuArgPro
Пептид H7	ProSerTyr [↓] DAspLeuArgPro
Пептид F7	CMFU-ProSerTyr [↓] DAspLeuArgPro**

* Жирным шрифтом выделен остаток Gly в люлиберине и соответствующие ему D-аминокислоты в его аналогах; гидролизуемые ЖСЧ связи показаны двойными линиями.

** CMFU – 2-(6-фторурацил-5-ил)ацетил.

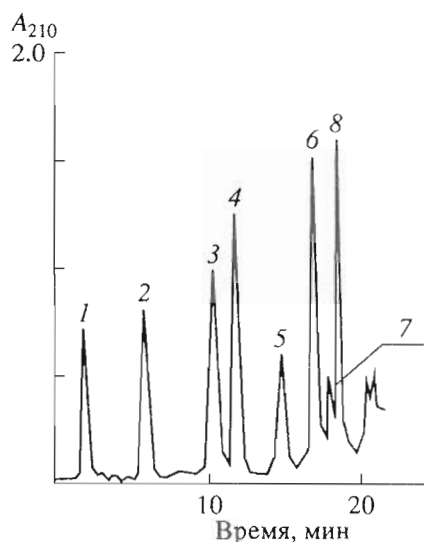


Рис. 1. ВЭЖХ-хроматограмма смеси продуктов расщепления SFN желудочным соком человека (ЖСЧ). Отнесение пиков см. табл. 2. Время инкубации в ЖСЧ 5 ч.

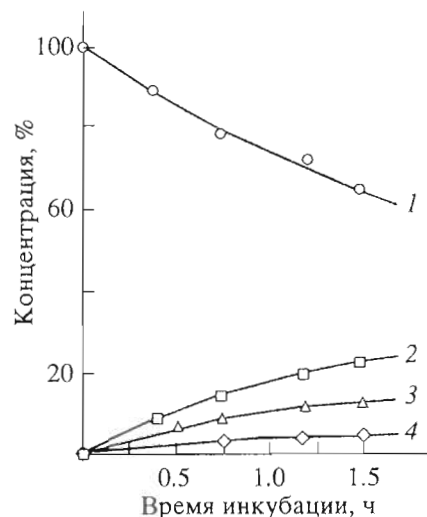


Рис. 2. Кинетика гидролиза сурфагона ЖСЧ. Концентрация сурфагона и его фрагментов выражена в процентах от начальной концентрации сурфагона: 1 — SFN; 2 — SFN-(1-3); 3 — SFN-(1-5); 4 — SFN-(3-9).

гидролизата в масс-спектрометр. Судя по нарастанию относительной концентрации продуктов распада, SFN расщепляется ЖСЧ по трем связям: His²-Trp³, Trp³-Ser⁴ и Tyr⁵-DAla⁶. Наиболее быстро гидролизуются связи Trp³-Ser⁴ и Tyr⁵-DAla⁶ (рис. 2), причем образующиеся продукты устойчивы к ЖСЧ, за исключением SFN-(1-5), который при дальнейшей инкубации медленно распадается с образованием SFN-(1-2) и SFN-(3-5).

Отдельно было показано, что гомогенный пепсин А свиньи гидролизует SFN только по связям His²-Trp³ и Trp³-Ser⁴ с соотношением скоростей, примерно равным 1 : 5. Это вполне соответствует специфичности пепсина, расщепляющего главным образом связи между объемистыми гидрофобными остатками (P₁- и P₋₁-положения по

номенклатуре Шехтера и Бергера [7]). Как и следовало ожидать, пепсин совершенно не гидролизует связь Tyr⁵-DAla⁶. Поскольку видовые различия специфичности у пепсинов неизвестны (в отличие от регуляторных аспартатных протеиназ вроде ренина [8]), мы полагаем, что пепсин А человека обладает теми же свойствами.

Если пепсин А свиньи добавлять в ЖСЧ, степень гидролиза связи Trp³-Ser⁴ зависит от кислотности ЖСЧ и пропорциональна концентрации пепсина, тогда как скорость разрыва связи Tyr⁵-DAla⁶ от нее не зависит (рис. 3).

Итак, можно утверждать, что гидролиз связи Tyr⁵-DAla⁶ катализируется не пепсином, а какой-то другой протеиназой. Ряд данных позволяет допустить, что этот фермент — гастриксин.

Таблица 2. Продукты гидролиза сурфагона желудочным соком человека

Номер пика ВЭЖХ*	Масс-спектрометрические данные: m/z (I, %), [тип иона]	Продукты	Строение
1	267 (100), [M + H] ⁺	SFN-(1-2)	GlpHis
2	483 (100), [M + H] ⁺	SFN-(6-9)	DAlaLeuArgPro
3	242 (65), [M + 2H] ²⁺	SFN-(4-9)	SerTyrDAlaLeuArgPro
	733 (100), [M + H] ⁺		
4	364 (50), [M + 2H] ²⁺	SFN-(1-3)	GlpHisTrp
	453 (100), [M + H] ⁺		
5	455 (100), [M + H] ⁺	SFN-(3-5)	TrpSerTyr
6	703 (100), [M + H] ⁺	SFN-(1-5)	GlpHisTrpSerTyr
7	461 (100), [M + 2H] ²⁺	SFN-(3-9)	TrpSerTyrDAlaLeuArgPro
8	585 (100), [M + 2H] ²⁺	SFN	Сурфагон

* См. рис. 1.

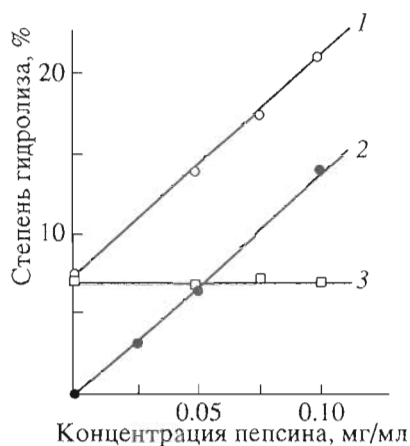


Рис. 3. Зависимость степени гидролиза сурфактона по связям $\text{Trp}^3\text{-Ser}^4$ (1, 2) и $\text{Tyr}^5\text{-DAla}^6$ (3) от концентрации пепсина А в растворе ЖСЧ в 0.04 М НСl (1, 3) и в растворе 0.1 М НСl (2). Время инкубации 1.5 ч.

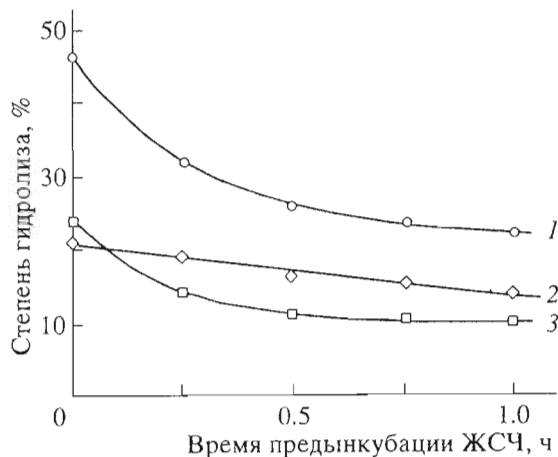


Рис. 4. Зависимость степени гидролиза сурфактона (1) и разрыва связей $\text{Tyr}^5\text{-DAla}^6$ (2) и $\text{Trp}^3\text{-Ser}^4$ (3) при различном времени прединкубации ЖСЧ при рН 6.0. Время инкубации 1.5 ч.

Хорошо известно, что пепсин А в отличие от гастриксина быстро и необратимо инактивируется в нейтральных растворах ([4], с. 217). Оказалось, что после прединкубации ЖСЧ при рН 6.0 в течение 15 мин скорость гидролиза связи $\text{Trp}^3\text{-Ser}^4$ в SFN, определенная по содержанию как исходного пептида, так и продуктов распада, уменьшается в ~1.5 раза, тогда как скорость гидролиза связи $\text{Tyr}^5\text{-DAla}^6$ практически не изменяется. Вместе с тем с увеличением времени прединкубации SFN в ЖСЧ скорости гидролиза обеих связей симбатно уменьшаются (рис. 4). В совокупности эти данные позволяют предположить, что связь $\text{Trp}^3\text{-Ser}^4$ гидролизуют оба фермента примерно с одинаковой скоростью, тогда как связь $\text{Tyr}^5\text{-DAla}^6$ разрывается только под действием гастриксина (кривая 2).

То, что связь $\text{Tyr}^5\text{-DAla}^6$ в SFN не расщепляется пепсином, подтверждается необычной рН-зависимостью скорости ее гидролиза в ЖСЧ. рН-Зависимости скоростей убыли SFN и нарастания продуктов гидролиза по связи $\text{Trp}^3\text{-Ser}^4$ имеют характерную колоколообразную форму с максимумом около рН 4.7 (рис. 5). Аналогичные кривые ранее были получены при изучении гидролиза пепсином А свиньи как похожего на SFN *n*-нитроанилида GlpHisPhe-Phe [9], так и других субстратов [10–14]. В то же время скорость катализируемого ЖСЧ гидролиза связи $\text{Tyr}^5\text{-DAla}^6$ в SFN, определенная по содержанию SFN-(6–9), практически не зависит от рН в интервале 1–4.7 (рис. 5).

Расщепление гастриксином связи $\text{Tyr}^5\text{-DAla}^6$ в SFN непосредственно наблюдалось нами в предварительных опытах с гомогенным образцом этого фермента. К сожалению, его не хватило на более детальные исследования.

Существенно, что ни в бусерилине, ни в одном из более коротких аналогов люлиберина (см.

табл. 1), за исключением соединения SFN-(3–9), ЖСЧ не гидролизует связь, образованную *D*-аминокислотой. По-видимому, для гидролиза субстрата последний должен включать не менее 7 а. о. и иметь остаток *DAla* в P_{-1} -положении.

Эти данные согласуются с предложенной нами ранее концепцией конформационного типа специфичности большинства протеиназ в отношении олигопептидов [15]. Гастриксин, по-видимому, не является исключением. Остатки *DAla* и *Trp* в P_{-1} - и P_{-3} -положениях, вероятно, необходимы для такой конформации пептида, в которой он образует продуктивный комплекс с ферментом. Аналогичную роль при расщеплении химозинном фрагмента к-казеин-(103–111) играет остаток Leu^{103} [16].

Вклад конформационной составляющей в специфичность протеиназ по отношению к олигопептидам зависит от того, насколько последняя

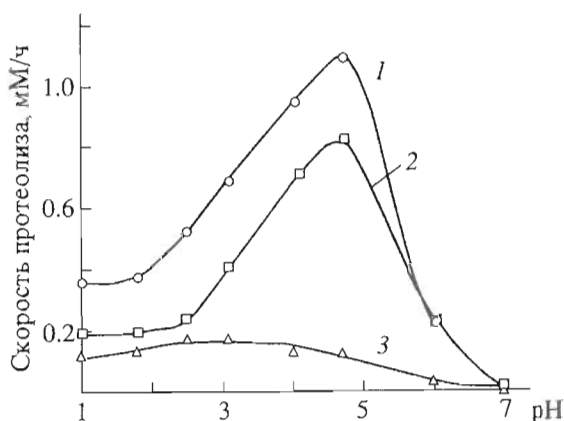


Рис. 5. рН-Зависимость скорости убыли сурфактона SFN (1) и образования продуктов разрыва связей $\text{Trp}^3\text{-Ser}^4$ (2) и $\text{Tyr}^5\text{-DAla}^6$ (3).

близка к абсолютной. Мы полагаем, что успех статистического анализа специфичности пепсина А [2] связан с тем, что основной вклад в специфичность здесь вносят локальные взаимодействия фермента с отдельными остатками, а не пространственная структура пептидов в целом. Однако и в случае пепсина А конформационный тип специфичности в некоторых случаях может проявляться в большей степени. Так, например, именно большим вкладом конформационной специфичности можно объяснить, почему этот фермент, эффективно катализируя гидролиз связей His²-Trp³ и Trp³-Ser⁴ в SFN, не разрывает связь His²-Trp³ в бусерилине и связь Trp³-Ser⁴ в SFN-(3-9).

В случае же протеиназ, обладающих узкой специфичностью и высокой эффективностью (например, регуляторных), конформационная специфичность доминирует над локальными взаимодействиями. Последние лишь необходимы, но не достаточны для образования продуктивного комплекса фермента с олигопептидом. Чтобы он возник, определенные консервативные остатки должны обеспечить некоторую особую конформацию этого олигопептида. Пример тому – взаимодействие ангиотензиногена с ренином, при котором аминокислотная последовательность прогормона является лишь предпосылкой связывания, тогда как эффективность процессинга достигается лишь при условии присутствия определенных консервативных остатков, например в P₂- и P₃-положениях [17].

В рамках нашей концепции конформационного характера специфичности протеиназ в отношении олигопептидов особая роль отводится остатку в P₋₁-положении, природа и конформация которого обеспечивает эффективное протонирование амидного N-атома и определяет кинетическую специфичность фермента, оцениваемую по величине k_{cat} . Известны сериновые DAla-DAla-карбоксипептидазы [18] и DAla-металлокарбоксипептидаза [19] *Streptomyces* sp., специфически расщепляющие только связи с участием D-аминокислот как в P₁-, так и в P₋₁-положениях. По нашему мнению, наличие именно DAla-остатка в P₋₁-положении не случайно. Так, например, α-химотрипсин в пептидах, содержащих остатки D-аминокислот, эффективно гидролизует только связи с DAla в P₋₁-положении [20]. Однако если с α-химотрипсином гидролиз таких связей протекает достаточно эффективно в дипептидах (лишь бы их структура соответствовала первичной специфичности фермента), то с гастриксином продуктивность связывания зависит от конформации олигопептида.

По-видимому, остаток DAla в аналогах люлиберина совместно с другими остатками, такими, как Trp³, является консервативным, обеспечивая их конформацию, необходимую для гидролиза гастриксином. Действительно, бусерилин и пептиды H7 и F7, имея в P₋₁-положении остаток DAsp

или DAsp, не гидролизуются по связям Tyr⁵-DAsp⁶ и Tyr⁵-DAsp⁶.

Таким образом, результаты проведенного исследования позволяют предположить, что гастриксин в ЖКЧ является высокоспецифической протеиназой, расщепляющей структурно аномальные олигопептиды благодаря конформационному типу его специфичности. Важнейшую роль в образовании продуктивной для протеолиза конформации P₋₁-остатка в этих олигопептидах играют не столько протяженность N- и C-концевых фрагментов субстрата, сколько пространственная структура олигопептида в целом.

Способность гастриксина гидролизовать сурфагон (SFN) по определенной связи может быть использована в клинико-диагностических целях для разработки методов дифференцированного определения гастриксина в ЖКЧ.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использованы пепсин А свиньи, гастриксин (Serva) и ацетонитрил (Merck). Остальные реактивы имели квалификации ч. д. а. и “для спектрального анализа”.

Сурфагон (SFN) и бусерилин синтезированы в лаборатории проф. М.И. Титова (СП “Константа”, Москва), пептиды SFN-(3-9), SFN-(4-9), SFN-(5-9) выделены хроматографически из гидролизатов SFN, причем пептид SFN-(4-9) был выделен из гидролизата SFN многократными смывами раствором 0.1 M NaCl из слизистой оболочки двенадцатиперстной кишки крысы с последующим центрифугированием и концентрированием этих смывов. Пептиды H7 и F7 получены в лаборатории проф. Г.П. Власова (Институт высокомолекулярных соединений, С.-Петербург).

Желудочный сок взят у пациентов на кафедре проф. В.Л. Пайкова (Санитарно-гигиенический медицинский институт, С.-Петербург). Его образцы осветляли центрифугированием и использовали непосредственно после получения.

ВЭЖХ проводили на микроколоночном жидкостном хроматографе “Милихром” (ПО “Научприбор”) с колонкой из нержавеющей стали размером 2 × 62 мм с сорбентом Nucleosil 5 C₁₈ (Macherey Nagel). Объем вводимой пробы составлял 5–10 мкл. Элюцию осуществляли градиентом концентрации ацетонитрила от 0 до 30% (по объему) в растворе 0.005 M H₂SO₄ (pH 2) при скорости элюции 0.1 мл/мин.

Масс-спектрометрические исследования проводили ESI-MS-методом на масс-спектрометре с электрогидродинамическим источником (ХЖ-МХ 3303). Аликвоты хроматографических фракций высушивали, растворяли остаток в 70% (по объему) водном метаноле и вводили раствор в масс-спектрометр со скоростью 0.2 мкл/мин. Время регистрации составляло 30 с.

Гидролиз пептидов в ЖСЧ проводили при 37°C. Растворы пептидов с концентрацией 1 мМ инкубировали в ЖСЧ, периодически отбирая из реакционной смеси аликвоты объемом 10 мкл. В пробах останавливали протеолиз кипячением, а затем фракционировали их ВЭЖХ. Содержание продуктов гидролиза пептидов оценивали, используя молярные коэффициенты поглощения, рассчитанные по аддитивной схеме [21].

Гидролиз SFN гастроксином проводили в условиях, описанных для гидролиза ЖСЧ, при pH 1 и 3. Концентрация SFN и гастроксина 0.4 мг/мл.

Гидролиз SFN пепсином А свиньи проводили в аналогичных условиях либо в 0.1 М HCl, либо в ЖСЧ, разбавленном 0.04 М HCl.

Влияние прединкубации ЖСЧ при pH 6.0 на скорость гидролиза SFN определяли, предварительно титруя аликвоту ЖСЧ 0.2 М Na-фосфатным буфером до pH 6 и инкубируя ее необходимое время при 37°C. Затем ЖСЧ титровали раствором 0.1 М HCl до pH 1.5, растворяли в нем SFN и выдерживали в течение 1.5 ч.

pH-Зависимость скорости протеолиза исследовали титрованием аликвоты ЖСЧ до требуемого значения pH 0.2 М Na-фосфатным буфером с pH 7. Затем в ЖСЧ растворяли соответствующий пептид и инкубировали этот раствор при 37°C.

Авторы благодарят М.И. Титова и В.А. Виноградова (ВКНЦ АМН РФ) за любезно предоставленные образцы сурфагона и участие в обсуждении результатов работы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Tang J. // *Methods Enzymol.* 1970. V. 19. P. 406–421.
2. Зинченко А.А., Руми Л.Д., Антонов В.К. // *Биоорг. химия.* 1977. Т. 3. С. 1663–1670.
3. Fruton J.S. // *Adv. Enzymol.* 1976. V. 44. P. 1–36.
4. Антонов В.К. *Химия протеолиза.* М.: Наука, 1991. С. 185–189.
5. Dunn B.M., Jimenez M., Parten B.F., Valler M.J., Rolph C.E., Kay J. // *Biochem. J.* 1986. V. 237. P. 899–906.
6. Mirgorodskaya O.A., Shevchenko A.A. // *FEBS Lett.* 1992. V. 307. P. 263–266.
7. Schechter J., Berger A. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1967. V. 27. P. 157–162.
8. Kunugi S., Fukuda M., Hayashi R. // *Eur. J. Biochem.* 1985. V. 153. P. 37–40.
9. O'Connor B., O'Cuinn G. // *Biochem. Soc. Trans.* 1986. V. 14. P. 456–457.
10. Horsthemke B., Knisatchek H., Rivier J., Sandow J., Bauer K. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1981. V. 100. P. 753–759.
11. Hedger M.P., Roleston D.M., Tepe S.J., Broune C.A., De Kretser D.M. // *Mol. Cell. Endocrinol.* 1986. V. 46. P. 59–70.
12. Bienert M., Albrecht E., Berger H., Klausenz E., Pleiss U., Niedrich H., Burkhard A. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1983. V. 761. P. 183–190.
13. Strittmatter S.M., Thiele E.A., Vapiloff M.S., Snyder S.H. // *J. Biol. Chem.* 1985. V. 260. P. 9825–9832.
14. Skidgel R.A., Erdos E.G. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1985. V. 82. P. 1025–1029.
15. Александров С.Л. // *Биоорг. химия.* 1994. Т. 20. С. 5–13.
16. Carles C., Martin P. // *Arch. Biochem. Biophys.* 1985. V. 242. P. 411–416.
17. Green D.W., Rivetna M.N. // *Structure and Function of the Aspartic Proteinases* / Ed. B. Dunn. N.Y.: Plenum Press, 1991. P. 383–386.
18. Joris B., Ghuysen J.M., Dive G., Renard A., Dideberg O., Charlier P., Frere J.-M., Kelly J.A., Boyington J.C., Moews P.C., Knox J.R. // *Biochem. J.* 1988. V. 250. P. 313–324.
19. Joris B., Beeumen J., Casagrande F., Gerday C., Frere J.-M., Ghuyusen J.-H. // *Eur. J. Biochem.* 1983. V. 130. P. 53–69.
20. Bizzozero S.A., Baumann W.K., Dutler H. // *Eur. J. Biochem.* 1982. V. 122. P. 251–258.
21. Yang C.-Y., Downall H.J., Gotto A.M. // *Anal. Biochem.* 1985. V. 145. P. 67–72.

The Digestion of Luliberine Analogues Containing D-Alanine Residue by Human Gastric Juice

O. A. Mirgorodskaya*, N. V. Savel'eva*, A. N. Simankova**,
A. A. Shevchenko*, and S. L. Aleksandrov***

*Institute of Cytology, Russian Academy of Sciences, Tikhoretskii pr. 4, St. Petersburg, 198103 Russia

**Department of Biochemistry, Biology–Soil Faculty, St. Petersburg State University

***Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, ul. Miklukho-Maklaya 16/10, GSP-7 Moscow, 117871 Russia

Abstract—The digestion of surphagone and other luliberine analogues containing residues of D-amino acids by human gastric juice was studied. By means of chromatography and mass spectrometry, these peptides were shown to undergo hydrolysis of the bond formed by D-Ala at the P₁ position, and this hydrolysis was shown to be catalyzed by gastricsin rather than pepsin A. Gastricsin was assumed to be a highly specific protease. The results are in a good agreement with the concept of conformational specificity of proteases towards the natural oligopeptides.

Key words: human gastric juice, luliberine analogues, surphagone, pepsin A, gastricsin, specificity