

УДК 577.152.344
© Коллектив авторов

ИНГИБИРОВАНИЕ ХИМЕРНЫМ БЕЛКОМ IFN-(ASP)₄LYS-HIV ГИДРОЛИЗА НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНОГО СУБСТРАТА ЛЕГКОЙ ЦЕПЬЮ ЭНТЕРОПЕПТИДАЗЫ.

Е.Д. Шибанова, Ю.Б. Гришина, Л.Д. Руми

Институт биоорганической химии им. М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова РАН,
117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10;
тел.: (095) 330-63-74; эл. почта: shib@enzyme.sioc.ras.ru

Полноразмерная энтеропептидаза быка или ее легкая цепь часто используются для гидролиза гибридного белка, содержащего специфический линкер -(Asp)₄Lys-, с целью получения конечного продукта. Однако не все гибридные белки эффективно гидролизуются энтеропептидазой. Ранее было показано, что негидролизуемый химерный белок IFN-(Asp)₄Lys-HIV является конкурентным ингибитором гидролиза синтетического субстрата полноразмерной энтеропептидазой. В настоящей работе установлено, что этот химерный белок является конкурентным ингибитором гидролиза того же субстрата легкой цепью энтеропептидазы. Сравнение констант ингибирования реакций для полноразмерного фермента и его легкой цепи позволяет предполагать участие тяжелой цепи фермента в связывании химерного ингибитора полноразмерной энтеропептидазой.

Ключевые слова: энтеропептидаза, легкая цепь, химерный белок, ингибирование.

ВВЕДЕНИЕ. В последнее время в биотехнологии широко используется подход экспрессии гибридных белков соответствующих гибридных генов в клетках *E. coli* с последующим гидролизом полученного белка высокоспецифичной протеиназой для получения целевого белка. Во многих случаях для этой цели применяется сериновая протеиназа - энтеропептидаза (энтерокиназа, КФ 3.4.21.9) быка. Энтеропептидаза играет ключевую роль в активации каскада ферментов системы пищеварения, осуществляя процессинг своего природного субстрата трипсиногена в трипсин. При этом происходит отщепление N-концевого активационного пептида трипсиногена Val-(Asp)₄Lys- [1].

Полноразмерная энтеропептидаза содержит две цепи: тяжелую (120 кДа) и каталитически активную легкую (47 кДа). На основании рентгеноструктурных данных легкой цепи энтеропептидазы и сравнения кинетических параметров гидролиза полноразмерным ферментом и легкой цепью различных субстратов [2] сделано предположение о наличии нескольких участков связывания фермента с субстратом. В области каталитического центра легкой цепи происходит связывание остатка Lys гидролизуемой пептидной связи; на некотором удалении существует экзосайт, способный к узнаванию и связыванию четырех остатков Asp активационного пептида. Кроме этого предполагается наличие участка связывания природного субстрата на тяжелой цепи, что, по всей видимости, и обуславливает высокую эффективность процессинга трипсиногена [3].

ИНГИБИРОВАНИЕ ЛЕГКОЙ ЦЕПИ ЭНТЕРОПЕПТИДАЗЫ.

Для гидролиза пептидной связи после специфического линкера $-(\text{Asp})_4\text{Lys-}$ в гибридных белках используется как полноразмерный фермент, так и каталитически активная легкая цепь.

Однако известны примеры, когда отщепление целевого белка от белка-носителя полноразмерной энтеропептидазой происходит с низкой эффективностью или вообще химерный белок, несмотря на наличие в нём специфического линкера $-(\text{Asp})_4\text{Lys-}$, не подвергается гидролизу [4]. Было показано [5], что негидролизуемый энтеропептидазой по специфическому линкеру химерный белок IFN- $(\text{Asp})_4\text{Lys-HIV}$ [фрагмент γ -интерферона (12 кДа)-специфический линкер $(\text{Asp})_4\text{Lys-}$ протеиназа вируса иммунодефицита человека (11 кДа)] является конкурентным ингибитором гидролиза энтеропептидазой синтетического субстрата Gly-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys-Nfa, где Nfa - β -нафтиламид, (788,8 Да) с $K_i = 3,4 \times 10^{-6}$ М.

Исследование ингибирования полноразмерного фермента химерным белком IFN- $(\text{Asp})_4\text{Lys-HIV}$ позволило предположить, что конформационное состояние области линкера химерного белка приводит к непродуктивному связыванию его с ферментом и невозможности расщепления пептидной связи [4]. Задачей представляемой работы было определение эффективности ингибирования химерным белком IFN- $(\text{Asp})_4\text{Lys-HIV}$ гидролиза синтетического субстрата Gly- $(\text{Asp})_4\text{Lys-}\beta$ -Nfa легкой цепью энтеропептидазы.

МЕТОДИКА. Получение, очистка и рефолдинг химерного ингибитора IFN- $(\text{Asp})_4\text{Lys-HIV}$ проводились, как описано в [4].

Гидролиз лёгкой цепью энтеропептидазы флуорогенного субстрата HGly- $(\text{Asp})_4\text{Lys-Nfa}$ ("Sigma") контролировали с помощью спектрофлуориметра Hitachi (Япония) по возрастанию интенсивности флюоресценции β -нафтола ($\lambda_{\text{возб}}=335$ нм, $\lambda_{\text{эм}}=410$ нм). Реакцию проводили при 20° С в 10 мМ трис-HCl буфере, pH 7,5 (объем проб составлял 0,6 мл). Концентрация субстрата составляла 3,99 мМ, а концентрация фермента (легкая цепь энтеропептидазы) 0,1 мкМ. Концентрация химерного ингибитора в пробах варьировалась в пределах 2,8-8,3 мкМ.

Все используемые реактивы имели квалификацию "о.с.ч."

Исследование кинетики гидролиза легкой цепью энтеропептидазы синтетического субстрата HGly- $(\text{Asp})_4\text{Lys-Nfa}$ проводилось без добавления химерного белка IFN- $(\text{Asp})_4\text{Lys-HIV}$ и в его присутствии по стандартной методике для механизма, описываемого уравнением Михаэлиса-Ментен. Для обработки кинетических данных использовали координаты Лайнуивера-Берка и Диксона.

Изменения значения константы Михаэлиса при 20°С ($K_m = 2,3 \times 10^{-4}$ М) согласуются с ранее полученными данными [6]. Скорость расщепления пептида при разных соотношениях концентраций пептидного субстрата и химерного белка-ингибитора измеряли при концентрациях HGly- $(\text{Asp})_4\text{Lys-Nfa}$ 10^{-3} - 10^{-4} М, химерных белков - 10^{-3} - 10^{-6} М, фермента - 10^{-7} М. Последним в реакционную смесь добавляли фермент. Анализ полученных данных проводился по методу Диксона, согласно уравнению:

$$v_0/v_i = 1 + K_m/(K_m + [S]) \times [I]/K_i$$

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. На рис. 1 представлены зависимости отношения скорости реакции без ингибитора к скорости реакций с ингибитором v_0/v_i от концентрации ингибитора при различных концентрациях субстрата. Как видно на рис. 1, угол наклона полученных прямых различается для разных концентраций субстрата, что свидетельствует о конкурентном характере ингибирования. Исходя из полученных данных, было определено значение I_{50} для каждой концентрации субстрата и построен график зависимости I_{50} от концентрации субстрата $[S]$ (рис.2). По уравнению:

$$I_{50} = K_i \times (1 + [S]/K_m),$$

была определена константа ингибирования, которая составила $K_i = 2,7 \times 10^{-3}$ М.

Полученные экспериментальные данные позволяют сделать вывод, что химерный белок IFN- $(\text{Asp})_4\text{Lys-HIV}$ является конкурентным ингибитором гидролиза

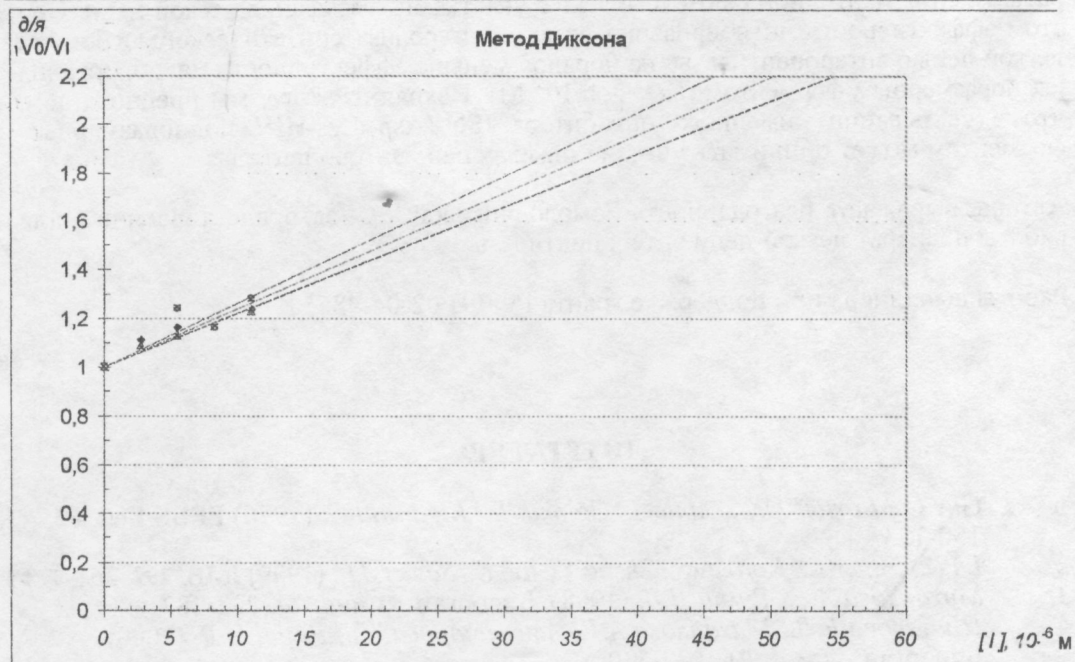


Рисунок 1

Ингибирование химерным белком IFN-(Asp)₄Lys-HIV гидролиза легкой цепью энтеропептидазы синтетического субстрата. Условия определения: 10 mM трис-HCl-буфер, pH 7,5, 20°C. [E] = 1×10^{-7} M, [I] = $2,75 \cdot 10^{-5}$ M; $5,5 \cdot 10^{-5}$ M; $8,25 \cdot 10^{-5}$ M; $11,0 \cdot 10^{-5}$ M. [S] = $9,975 \cdot 10^{-5}$ M, $13,0 \cdot 10^{-5}$ M, $16,25 \cdot 10^{-5}$ M.

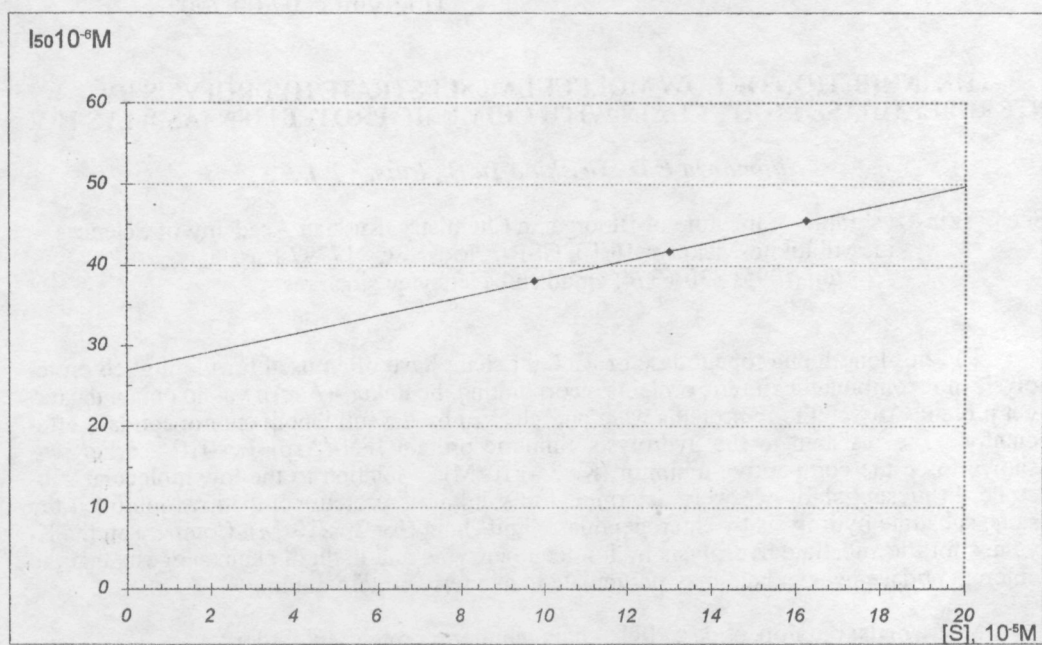


Рисунок 2.

Определение константы ингибирования химерным белком IFN-(Asp)₄Lys-HIV исследуемой реакции.

легкой цепью энтеропептидазы флуорогенного субстрата HGly-(Asp)₄Lys-Nfa. Это свидетельствует, что химерный ингибитор формирует непродуктивный для

ИНГИБИРОВАНИЕ ЛЕГКОЙ ЦЕПИ ЭНТЕРОПЕПТИДАЗЫ.

расщепления пептидной связи комплекс с участками связывания легкой цепи. При этом эффективность ингибирования реакции гидролиза синтетического субстрата легкой цепью энтероцептидазы на порядок меньше эффективности ингибирования полноразмерным ферментом ($K_i = 3,4 \times 10^{-6}$ M). Исходя из этого, мы предполагаем, что в связывании химерного ингибитора IFN-(Asp)₄Lys-HIV полноразмерным ферментом может принимать участие тяжелая цепь энтероцептидазы.

Авторы выражают благодарность Замолодчиковой Т.С. за предоставленный для работы препарат легкой цепи энтероцептидазы.

Работы выполнены при поддержке гранта РФФИ 02-04-48553.

ЛИТЕРАТУРА.

1. Guy O., Bartlet D.C., Amic J., Colomb E., Figarella C. (1976) FEBS Lett. **62**, 150-153.
2. Lu D., Futter K., Korolev S., Zheng X., Tan K., Sadler J.E. (1999) JMB, **292**, 361-373
3. Михайлова А.Г., Румш Л.Д. (1998), Биоорган. химия, **24**, 282-287.
4. Шибанова Е.Д., Михайлова А.Г., Александров С.Л., Румш Л.Д. (2000) Биоорган. химия, **26**, 522-530.
5. Shibanova E., Alexandrov S., Miroshnikov A. (2000), Protein and Peptide Lett., **7**, 43-48.
6. Mikhailova A.G., Rumsh L.D. (1999) FEBS Lett. **442**, 226-230.

Поступила 07.09.2002.

THE INHIBITION OF LOW MOLECULAR SUBSTRATE HYDROLYSIS BY ENTEROPEPTIDASE LIGHT CHAIN WITH CHIMERIC PROTEIN IFN-(ASP)₄LYS-HIV.

Shibanova E.D., Grishina Yu.B., Rumsh L.D.

Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,
ul. Miklukho-Maklaya 16/10, GSP-7, Moscow, 117997 Russia;
tel.: (095) 330-6374; email:shib@enzyme.siobc.ras.ru

The full length enteropeptidase or it's light chain have often used for the limited proteolysis of recombinant chimeric proteins incorporating the linker -(Asp)₄Lys- to obtain the target protein. Any chimeric proteins were not cleaved by the full length enteropeptidase efficiently. The resistant to the hydrolysis chimeric protein IFN-(Asp)₄Lys-HIV earlier was shown to be the competitive inhibitor ($K_i=3,4 \times 10^{-6}$ M) in relation to the low molecular substrate. In present study we were determined this chimeric protein competitive inhibited the same substrate hydrolysis by enteropeptidase light chain ($K_i=2,7 \times 10^{-5}$ M). Comparison the K_i values for the substrate hydrolysis by full length enzyme and its light chain suggests that the enteropeptidase heavy chain may participate in chimeric protein binding.

Key words: enteropeptidase, light chain, chimeric protein, inhibition.