

УДК 577.152.3.

©Коллектив авторов

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ИНГИБИТОРА ТРИПСИНА ИЗ АКТИНИИ *RADIANTHUS MACRODACTYLUS* С РАЗЛИЧНЫМИ ПРОТЕИНАЗАМИ

*И.Н. Сокогутун¹, О.В. Гнеденко², Е.В. Лейченко¹, М.М. Монастырская¹,
Э.П. Козловская¹, А.А. Мольнар², А.С. Иванов²*

¹Тихоокеанский институт биоорганической химии ДВО РАН, 690022, г. Владивосток, пр-т 100 лет Владивостоку, 159; факс: (4232) 31-40-50
²ГУ НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича РАМН, 119121, г. Москва, Погодинская ул. 10; факс 7(495)245-0857; эл. почта: alexei.ivanov@ibmc.msk.ru

Методом биосенсорного анализа исследовано взаимодействие ингибитора VJ (InhVJ), выделенного из актинии *Radianthus macrodactylus*, с сериновыми (трипсин, α -химотрипсин, плазмин, тромбин, калликреин), цистеиновой (папаин) и аспарагиновой (пепсин) протеиназами. Обнаружено, что в исследуемом диапазоне концентраций (10-400 нМ) InhVJ взаимодействует только с трипсином и α -химотрипсином. Определены кинетические и термодинамические параметры реакций комплексообразования InhVJ с трипсином и α -химотрипсином. K_D для пары InhVJ/трипсин составляет $7,38 \cdot 10^{-8}$ М и для пары InhVJ/ α -химотрипсин - $9,93 \cdot 10^{-7}$ М, соответственно.

Ключевые слова: актинии, ингибитор протеиназ, протеолитические ферменты, константа диссоциации, поверхностный плазмонный резонанс, оптический биосенсор, Biacore 3000.

ВВЕДЕНИЕ. Природные белковые ингибиторы протеолитических ферментов находят широкое применение в медицине, биотехнологии и сельском хозяйстве, а также используются в качестве прототипов для создания новых синтетических аналогов [1-3]. Ингибиторы протеиназ используются при лечении заболеваний, связанных с повышенной активностью протеолитических ферментов, таких как панкреатит, воспалительные процессы органов дыхания и другие. К настоящему времени накоплено много сведений об участии различных протеаз в опухолевом росте.

При выборе ингибиторов ферментов в качестве потенциальных кандидатов для создания лекарственных препаратов большое значение имеет величина константы ингибирования (K_i) и/или константы диссоциации комплекса ингибитор-фермент (K_D). Для определения K_D применяют различные методы, среди которых биосенсорный анализ с использованием эффекта поверхностного плазмонного резонанса (SPR) занимает лидирующее положение, так как позволяет определять как кинетические, так и термодинамические характеристики межмолекулярных взаимодействий [4-9]. Данная работа посвящена исследованию взаимодействия ингибитора, выделенного из актинии *Radianthus macrodactylus*, с различными протеиназами методом биосенсорного анализа с использованием эффекта поверхностного плазмонного резонанса.

МЕТОДИКА. Белки. Ингибитор протеиназ (InhVJ) был выделен из актинии *R. macrodactylus* с помощью гидрофобной хроматографии на Полихромel, гельфильтрации на Биогеле P4, ионообменной хроматографии на Bio-Rex 70 и высокоэффективной жидкостной хроматографии на носителе с обращенной фазой сорбента Nucleosil C₁₈.

В работе использовали следующие препараты ферментов фирмы “Sigma”, (США): трипсин и α-химотрипсин из поджелудочной железы быка; плазмин, тромбин и калликреин из плазмы крови человека; папаин из латекса папайи и пепсин из слизистой оболочки желудка свиньи.

Химические реактивы. Следующие растворы и реагенты были получены от “Biacore” (Швеция): 1) HBS-буфер (150 mM NaCl, 3 mM ЭДТА, 0,005% сурфактанта P20, 10 mM HEPES, pH 7,4); 2) 10 mM ацетатный буфер, pH 4,0; 3) 50 mM NaOH; 4) набор реагентов для ковалентной иммобилизации лигандов за первичные аминогруппы: EDC (1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид гидрохлорид), NHS (N-гидроксисукцинимид), этаноламин-HCl.

Определение параметров белок-белкового взаимодействия с помощью оптического биосенсора.

Эксперименты по исследованию взаимодействия ингибитора с ферментами выполняли на оптическом биосенсоре Biacore 3000 “Biacore”. В работе использовали оптические чипы CM5. Карбоксиметилированный декстран чипа CM5 активировали путем введения смеси 0,2 M EDC /0,05 M NHS через измерительную кювету в течение 7 мин при скорости 5 мкл/мин и промывали HBS-буфером при той же скорости 3 мин. Затем осуществляли иммобилизацию InhVJ путем пропускания раствора ингибитора (100 мкг/мл) в 10 mM ацетатном буфере (pH 4,0) в течение 10 мин при скорости потока 5 мкл/мин. Карбоксильные группы декстрана, активированные EDC/NHS, но не прореагировавшие с InhVJ, блокировали 1 M этаноламином (pH 8,5) в течение 6 мин при скорости потока 1 мкл/мин.

Взаимодействие протеиназ с иммобилизованным ингибитором исследовали в диапазоне концентраций от 10 нМ до 400 нМ. В качестве рабочего буфера использовали стандартный HBS-буфер. После пропускания каждого образца протеиназ чип регенерировали путём введения 50 mM NaOH в течение 2 мин при скорости потока 5 мкл/мин. Канал без иммобилизованного белка использовали в качестве контрольного. Для расчета кинетических параметров реакции комплексообразования была использована программа BIAevaluation Version 4.1 “Biacore” и математическая модель 1:1 Langmuir binding.

Изменение свободной энергии Гиббса (G) рассчитывали по уравнению:

$$\Delta G = -RT \ln K_A \quad (1),$$

где K_A – константа ассоциации.

Изменение энтальпии (H) и энтропии (S) рассчитывали из линейного уравнения:

$$\Delta G = \Delta H - T \Delta S \quad (2)$$

с помощью линейной аппроксимации полученной зависимости G от температуры.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Функциональная роль ингибиторов протеиназ, присутствующих в организмах пресмыкающихся и кишечнорастворимых совместно с протеолитическими ферментами, нейро- и цитотоксинами, в настоящий момент полностью не установлена. Это стимулирует работы по исследованию структуры, свойств и биологической роли ингибиторов протеиназ. Из тела тропической актинии *R. macrodactylus* был выделен ингибитор VJ (InhVJ) - полипептид с молекулярной массой 6 кДа. Подобно другим выделенным из актиний ингибиторам трипсина, он относится к семейству ингибитора Кунитца: его полипептидная цепь состоит из 57 аминокислотных остатков с тремя дисульфидными связями и не содержит остатков триптофана и метионина. Известно, что принадлежащие к семейству ингибитора Кунитца ингибиторы

протеиназ из актиний блокируют активность протеиназ различной специфичности [10-12]. Например, ингибитор из актинии *Stichodactyla helianthus* ShPI-I ингибирует сериновые протеиназы: трипсин ($K_i = 1,1 \times 10^{-10}$ М), плазмин ($K_i = 2,7 \times 10^{-9}$ М), химотрипсин ($K_i = 2,3 \times 10^{-9}$ М) и калликреин ($K_i = 8,5 \times 10^{-8}$ М), цистеиновые протеиназы: бромелан и папаин, а также аспарагиновые протеиназы пепсин ($K_i = 2,5 \times 10^{-8}$ М) и протеиназу из *M. miehei* [10].

Мы исследовали взаимодействие InhVJ с сериновыми протеиназами – трипсином, α -химотрипсином, плазмином, тромбином и калликреином, цистеиновой протеиназой папаином и аспарагиновой – пепсином с помощью оптического SPR биосенсора.

InhVJ был иммобилизован на карбоксиметилдекстрановой подложке стандартного оптического чипа CM5 (рис. 1). Количество иммобилизованного белка составило 460 RU ($0,46$ нг/мм²).

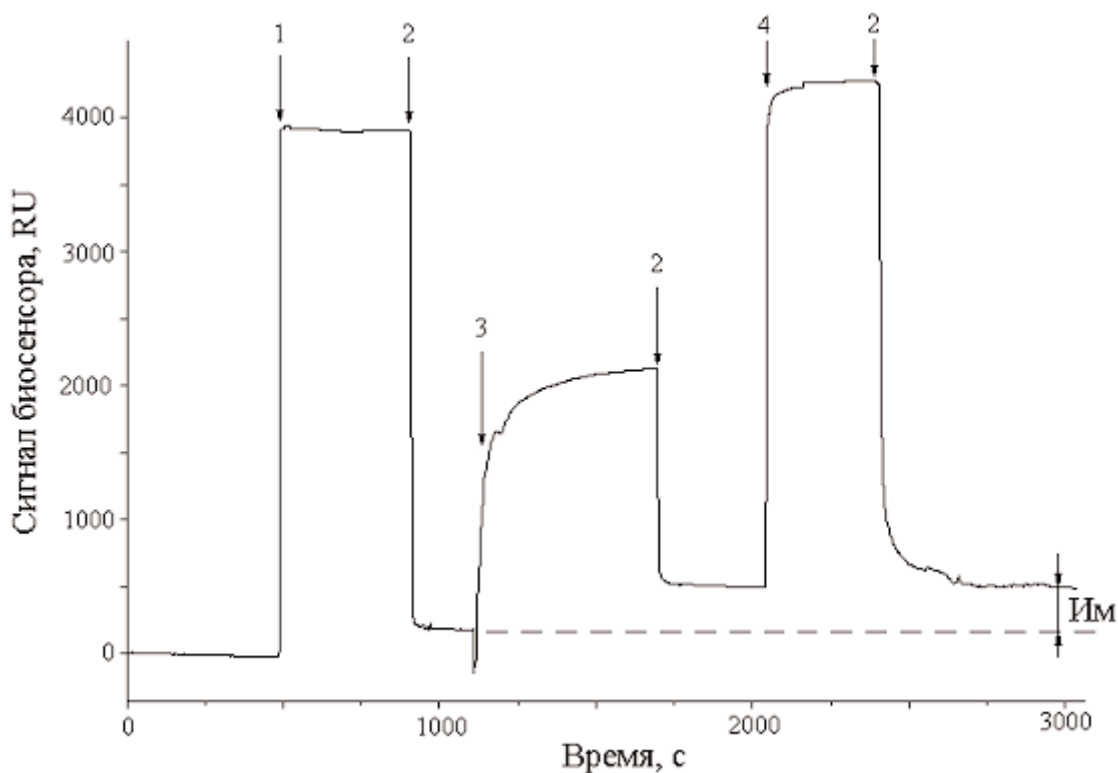


Рисунок 1.

Иммобилизация InhVJ на оптическом чипе CM5. Стрелками указаны добавки:

1 – 0,2 М EDC/0,05 М NHS; 2 – HBS-буфер; 3 – раствор InhVJ (100 мкг/мл) в 10 мМ ацетатном буфере, pH 4,0; 4 – 1 М раствор этаноламина, pH 8,5. Им – количество иммобилизованного белка.

При пропускании через измерительную кювету ферментов в концентрации от 10 до 400 нМ наблюдалось взаимодействие только с трипсином (Тр) и α -химотрипсином (ХТр) (рис. 2). Таким образом, ингибитор VJ является специфичным по отношению к двум сериновым протеиназам – к трипсину и α -химотрипсину, и не взаимодействует с остальными, перечисленными выше, протеиназами.

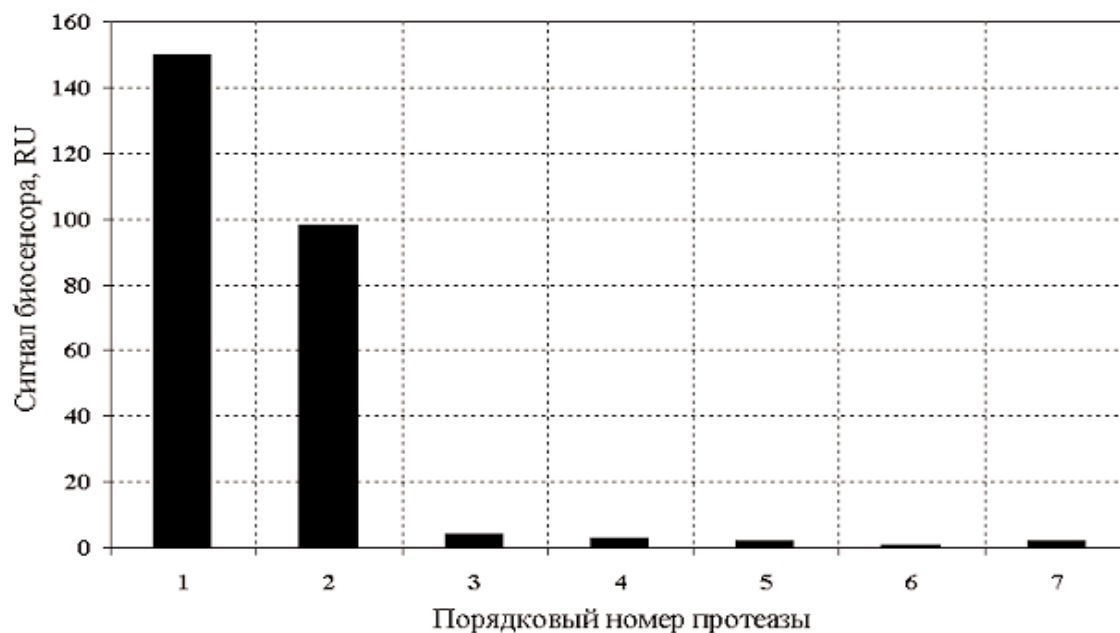


Рисунок 2.

Сенсограммы взаимодействия протеолитических ферментов с иммобилизованным ингибитором InhVJ при 25°C. 1 – трипсин, 2 – α-химотрипсин, 3 – калликреин, 4 – плазмин, 5 – тромбин, 6 – папаин, 7 – пепсин. Концентрация протеаз 200 нМ.

Сенсограммы связывания Тр и ХТр в различных концентрациях с иммобилизованным ингибитором (InhVJ_{im}) представлены на рисунке 3. Были рассчитаны константы скорости образования (k_a) и диссоциации (k_d) комплексов ингибитора с трипсином и -химотрипсином, а также константы ассоциации (K_A) и диссоциации (K_D) этих комплексов при 25°C (таблица). Константы диссоциации комплексов ингибитора с трипсином и α-химотрипсином отличаются на порядок. Как видно из таблицы, такое различие обусловлено величиной константы скорости диссоциации этих комплексов.

Таблица. Константы скорости образования (k_a) и диссоциации (k_d) комплексов ингибитора с трипсином (Тр) и α-химотрипсином (ХТр) и константы ассоциации (K_A) и диссоциации (K_D) этих комплексов.

Комплекс	$k_a, \text{M}^{-1} \text{с}^{-1}$	$k_d, \text{с}^{-1}$	$K_A (k_a / k_d), \text{M}^{-1}$	$K_D (k_d / k_a), \text{M}$
InhVJ _{im} /Тр	$8,56 \cdot 10^4$	$6,31 \cdot 10^{-3}$	$1,36 \cdot 10^7$	$7,38 \cdot 10^{-8}$
InhVJ _{im} /ХТр	$2,39 \cdot 10^4$	$2,37 \cdot 10^{-2}$	$1,01 \cdot 10^6$	$9,93 \cdot 10^{-7}$

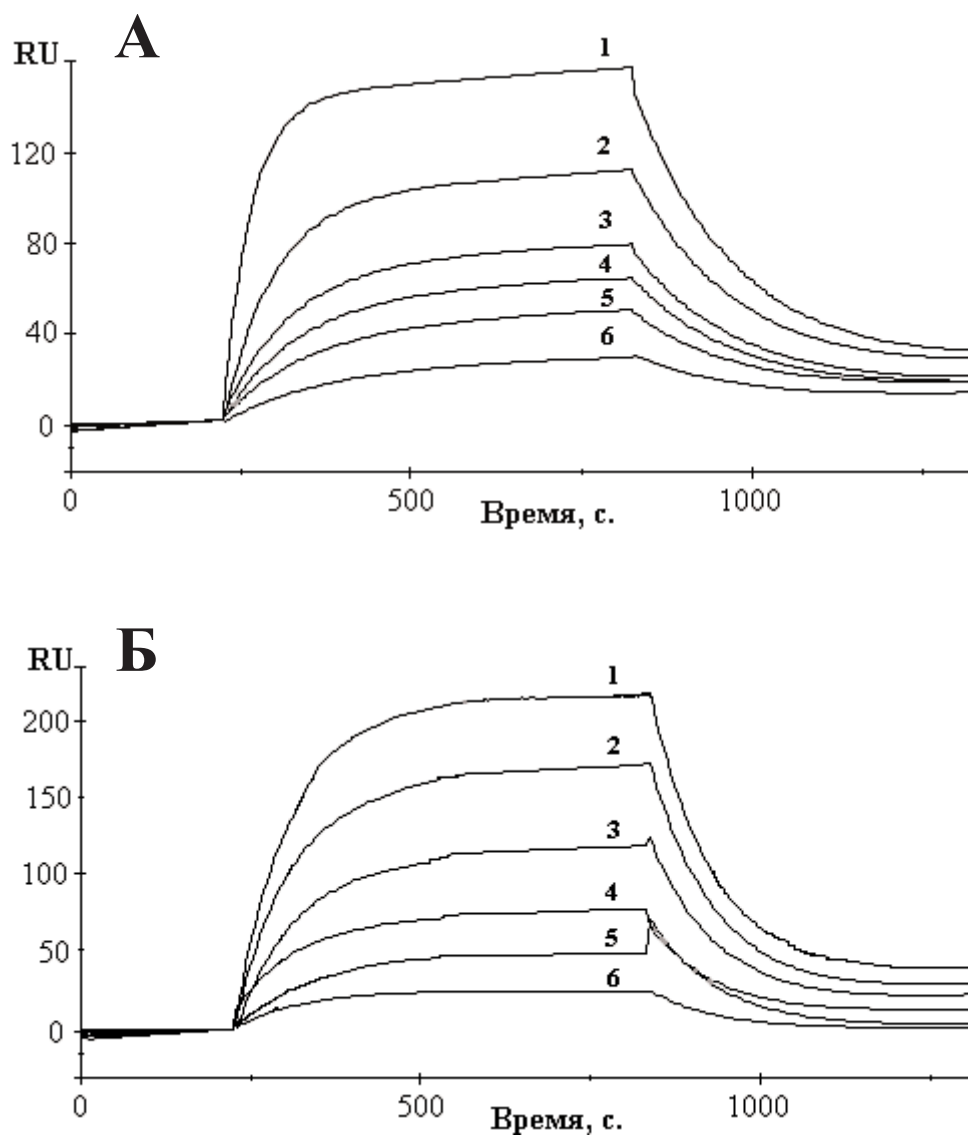


Рисунок 3.

Сенсограммы взаимодействия протеолитических ферментов с иммобилизованным ингибитором (InhVJ_{im}) при 25°C. (а) Взаимодействие Тр с InhVJ_{im} в диапазоне концентраций от 10 до 200 нМ: 1 – 200 нМ; 2 – 90 нМ; 3 – 40 нМ; 4 – 30 нМ; 5 – 20 нМ; 6 – 10 нМ. (б) Взаимодействие ХТр с InhVJ_{im} в диапазоне концентраций от 40 до 400 нМ: 1 – 400 нМ; 2 – 300 нМ; 3 – 200 нМ; 4 – 120 нМ; 5 – 90 нМ; 6 – 40 нМ.

Температурную зависимость взаимодействия InhVJ_{im} с Тр и ХТр исследовали в диапазоне температур от 10 до 30°C в интервале концентраций от 10 до 400 нМ. Расчёт изменения энергии Гиббса (ΔG) для реакций комплексообразования выполнялся по уравнению (1).

Температурная зависимость ΔG реакции комплексообразования InhVJ_{im} с Тр и ХТр удовлетворительно аппроксимируется полиномом первого порядка. Изменение энтальпии (ΔH) и энтропии (ΔS) были определены из уравнения (2) и составили для пары InhVJ_{im}/Тр 44,15 ккал/моль и 165,6 кал/(моль•К), для пары InhVJ_{im}/ХТр 77,29 ккал/моль и 276,3 кал/(моль•К), соответственно.

Таким образом, с помощью метода биосенсорного анализа была показана высокая специфичность взаимодействия ингибитора VJ из актинии *R. macrodactylus* с двумя протеиназами – трипсином и α -химотрипсином, что отличает данный ингибитор от других представителей семейства ингибиторов Кунитца. В дальнейшем планируется установить пространственную структуру молекулы ингибитора, что позволит выяснить молекулярные основы взаимодействия ингибитор-фермент: определить сайты связывания ингибитора с протеиназами и установить причины его высокой специфичности.

Работа выполнена при финансовой поддержке программы Президиума РАН “Молекулярная и клеточная биология” (грант № 03-1-0-05-002).

ЛИТЕРАТУРА

1. Birk Y. (1985) Int. J. Pept. Protein Res., **25**, 113-131.
2. Christensen S., Sottrup-Jensen L. (1994) Biochem. J., **303** 383-390.
3. Мосолов В.В., Валуева Т.А. (2005) Прикл. биохим. микробиол., **41**, 261-282.
4. Vадgаmа P., Crump P.W. (1992) Analyst, **117**, 1657-1670.
5. O'Shannesy D.J. (1994) Curr. Opin. Biothechnol., **5**, 65-71.
6. Szabo A., Stolz L., Granzow R. (1995) Curr. Opin. Struct. Biol., **5**, 699-705.
7. Brigham-Burke M., Edwards J.R., O'Shannesy D.J. (1992) Anal. Biochem., **205**, 125-131.
8. O'Shannesy D.J., Brigham-Burke M., Peck K. (1992) Anal. Biochem., **205**, 125-131.
9. Deinum J., Gustavsson L., Gyzander E., Kullman-Magnusson M., Edstrom A., Karlsson R. (2002) Anal. Biochem., **300**, 152-162.
10. Delfin J., Martinez I., Antuch W., Morera V., Gonzalez Y., Rodriguez R., Marquez M., Saroyan A., Larionova N., Diaz J., Padron G., Chavez M. (1996) Toxicon, **34**, 1367-1376.
11. Minagawa S., Ishida M., Shimakura K., Nagashima Y., Shiomi K. (1997) Comp. Biochem. Physiol. (B) Biochem. Mol. Biol., **118** (2), 381-386.
12. Mebs D., Liebrich M., Reul A., Samejima Y. (1983) Toxicon, **21**, 257-264.

Поступила: 05. 06. 2006.

INTERACTION INVESTIGATION OF TRYPSIN INHIBITOR FROM SEA ANEMONE *RADIANTHUS MACRODACTYLUS* WITH PROTEASES

I.N. Sokotun¹, O.V. Gnedenko², E.V. Leychenko¹, M.M. Monastyrnaya¹, E.P. Kozlovskaya¹,
A.A. Molnar², A.S. Ivanov²

¹Pacific Institute of Bioorganic Chemistry FEB RAS, pr. 100 let Vladivostoku 159, Vladivostok, 690022 Russia; fax: (4232)314-050

²V.N.Orekhovich Institute of Biomedical Chemistry RAMS, Pogodinskaya ul., 10, Moscow, 119121 Russia; fax +007(495)245 0857; e-mail: alexei.ivanov@ibmc.msk.ru

The interaction of inhibitor VJ (InhVJ), isolated from sea anemone *R. macrodactylus*, with different proteases was investigated. The following enzymes were tested: serine proteases (trypsin, α -chymotrypsin, plasmin, thrombin, kallikrein), cysteine protease (papain) and aspartic protease (pepsin). Inhibitor VJ interacted only with trypsin and α -chymotrypsin. Kinetic and thermodynamics parameters of intermolecular complexes formation were determined: $K_D=7,38 \cdot 10^{-8}$ M and $9,93 \cdot 10^{-7}$ M for pairs InhVJ/trypsin and InhVJ/ α -chymotrypsin, respectively.

Key words: sea anemone, protease inhibitor, trypsin, α -chymotrypsin, dissociation constant, SPR, Biacore.