

УДК 577.112.083

©Коллектив авторов

ВЫСОКОАКТИВНЫЕ ФРАКЦИИ РЕКОМБИНАНТНОГО ДЕСТАБИЛАЗЫ-ЛИЗОЦИМА МЕДИЦИНСКОЙ ПИЯВКИ

Ю.И. Фадеева¹, Н.В. Антипова¹, И.П. Баскова^{2*}, Л.Л. Завалова¹

¹Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина
и Ю.А. Овчинникова РАН, ул. Миклухо-Маклая 16/10, Москва

²МГУ им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, 119991, Москва,
ГСП 1, Ленинские горы, 1, стр. 12; эл. почта: saliva1@yandex.ru

В результате фракционирования высокоочищенного низкоактивного рекомбинантного белка дестабилазы-лизоцима (Дест-Лиз) на катионообменной колонке TSK CM 3-SW удалось отделить неактивную фр.IV, содержащую 90% белка, от трёх фракций (I, II и III), представляющих белки, лизоцимная и изопептидазная активности которых коррелируют с активностями нативного фермента. Однако, соотношение лизоцимной и изопептидазной активностей во фракциях I – III таково, что максимальная лизоцимная активность сосредоточена во фракции III, а изопептидазная – во фракции I. Обсуждается возможность регуляции разных функций Дест-Лиз в связи с образованием его комплексных форм.

Ключевые слова: дестабилаза-лизоцим *Hirudo medicinalis*, лизоцимная и изопептидазная функции, формы рекомбинантного фермента.

ВВЕДЕНИЕ. Фермент Дест-Лиз (КФ 3.5.1.44), компонент секрета слюнных клеток медицинской пиявки, сначала был обнаружен и выделен как эндо-ε-(γ-Glu)-Lys-изопептидаза, расщепляющая эти связи в стабилизированном фибрине – основе кровяного тромба и в продукте его протеолиза – D-димере [1, 2]. Позднее у этого фермента были выявлены лизоцимная и прямая антимикробная функции [3, 4]. В результате экспрессии одного из трёх генов Дест-Лиз был получен и очищен его рекомбинантный вариант, которому свойственны все функции природной формы [5]. Однако активности полученного высокоочищенного препарата рекомбинантного фермента в лизоцимном и изопептидазном тестах составляли 1-5% относительно природного, выделенного из медицинской пиявки, что свидетельствует о низкой эффективности стадии рефолдинга. Последнее может быть обусловлено тем, что при формировании структуры Дест-Лиз образуется семь внутримолекулярных дисульфидных связей, а используемая система экспрессии гена не включает S-S-изомеразы. По-видимому рекомбинантный препарат фермента содержит не только активные, правильно “свёрнутые”, но и неупорядоченные его формы, образованные, например,

* - адресат для переписки

за счёт как эндо-, так и экзомолекулярных дисульфидных связей. Присутствие таких балластных неактивных форм в полученном препарате фермента является ограничением при создании на его основе перспективного лекарственного тромболитического препарата. Кроме того, эти формы фермента препятствуют его использованию в сравнительных кинетических исследованиях изопептидазной функции Дест-Лиз, реализующейся с низкой каталитической скоростью [6]. Таким образом, как для разработки подходов к созданию нового медицинского препарата на основе Дест-Лиз, так и для изучения каталитических центров фермента необходимы его высокоактивные формы.

Целью настоящего исследования была разработка способа фракционирования высокоочищенного, но низкоактивного препарата рекомбинантного фермента для получения его высокоактивных форм.

МЕТОДИКА. Получение высокоочищенного препарата рекомбинантной Дест-Лиз предполагает его очистку из телец включения, образующихся в цитоплазме клеток *Escherichia coli* в результате экспрессии одного из генов фермента (EMBL accession number U24122) в составе pQE-30. Ранее нами разработан метод выделения такого препарата, содержащего, по данным электрофореза в полиакрамидном геле, проводимого в денатурирующих условиях (SDS-ПААГ), около 95% целевого белка [5].

Фракционирование высокоочищенного препарата Дест-Лиз. Полученный препарат (0,2 мл, 0,1 мг/мл) наносили на колонку TSK CM 3-SW, 7,5×150 мм ("LKB UltroPac Column", Швеция) в 10 mM фосфатном буфере (pH 7,0), который содержал 50 mM NaCl. Элюцию проводили градиентом NaCl (0,05-0,5 M) в том же буфере со скоростью 1 мл/мин и собирали фракции объёмом 1 мл.

Определение белка. Белок регистрировали при $\lambda=280$ нм и определяли затем в каждой фракции по методу Бредфорд [7], для чего 1-5 мкл исследуемого раствора белка смешивали с 0,8 мл дистиллированной воды, добавляли 0,2 мл реагента Бредфорд (0,1 г/л Coomassie Brilliant Blue G250 ("Bio-Rad", США), 0,05% этанол, 0,085% H_3PO_4 и через 5-10 мин измеряли оптическую плотность при $\lambda=595$ нм. Концентрацию белка рассчитывали по калибровочному графику, построенному с помощью бычьего сывороточного альбумина ("Sigma", Германия).

Лизоцимная активность. Определение лизоцимной активности Дест-Лиз проводили нефелометрическим методом и рассчитывали по степени просветления суспензии клеточных стенок бактерии *Micrococcus lysodeikticus* ("MP Biomedicals, LLC", Франция). Инкубационная проба 0,8 мл содержала 0,02 M Трис-HCl (pH 7,4) и 1 мг клеточных стенок, добавляемых из их исходной суспензии (20 мг/мл). Реакцию запускали добавлением к инкубационной пробе 50 мкл раствора фермента и проводили при 22°C. Активность фермента регистрировали спектрофотометрически по снижению оптической плотности при 450 нм (ΔA_{450}) во времени и рассчитывали в единицах активности (ЕА лиз). За одну ЕА лиз принимали $\Delta A_{450} = 0,001/\text{мин}$ [3]. Для сравнения каталитических свойств разных фракций Дест-Лиз рассчитывали их удельную активность (ЕА лиз/мг фермента).

Изопептидазная активность. Определение изопептидазной активности Дест-Лиз проводили с использованием D-димера стабилизированного фибрина из бычьей крови ("HyTest Ltd", Финляндия) в качестве субстрата. Реакцию проводили в 20 мкл инкубационной смеси, содержащей 3 мкг D-димера, 0,02 M Трис-HCl (pH 7,4), 0,5 M NaCl и от 0,1 до 2 мкг фермента, в течение

20 ч при 22°C. Активность фермента тестировали с помощью SDS-ПААГ по степени расщепления γ - γ -цепи D-димера, содержание которой в геле после его окрашивания и сканирования рассчитывали с помощью программы Gel-Pro Analyzer 3.1. За единицу изопептидазной активности (ЕА ип) принимали расщепление 1 мкг γ - γ -цепи D-димера за 20 ч инкубации при 22°C.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Значения лизоцимной и изопептидазной активностей исходного препарата Дест-Лиз, используемого в качестве источника высокоактивных форм фермента, представлены в таблице 1. Содержание активных молекул фермента, составляющих около 2% в его высокоочищенном исходном препарате, можно оценить путём сопоставления лизоцимной активности исходной рекомбинантной Дест-Лиз (940 АЕ лиз/мг) и её природной формы (43 000 АЕ лиз/мг) [3].

Таблица 1. Активности исходного высокоочищенного препарата рекомбинантной Дест-Лиз и его фракций после хроматографии на колонке TSK CM 3-5W.

Функции	Активность рекомбинантной Дест-Лиз				
	Исходный препарат	Фракции элюата колонки			
		I	II	III	IV
Лизоцимная (ЕА лиз/мг)*	940 ± 250	45000 ± 3600	60000 ± 5500	110000 ± 10700	0
Изопептидазная (ЕА ип/мг)**	≤100 ± 100	1100 ± 170	850 ± 120	800 ± 140	0

Примечание. * - За единицу лизоцимной активности (ЕА лиз) принимали снижение оптической плотности суспензии *Micrococcus lysodeikticus* на 0,001/мин при 450 нм.

** - За единицу изопептидазной активности (ЕА ип) принимали расщепление 1 мкг γ - γ -цепи D-димера за 20 ч. Приведенные значения рассчитаны по результатам 3-5 измерений.

Предлагаемый метод фракционирования исходного препарата фермента основан на использовании высокоэффективной катионообменной хроматографии на колонке TSK CM-35W (рис. 1). В результате фракционирования менее 10% суммарного белка обнаружено в составе трёх активных фракций: I (60-65 мин), II (74-79 мин) и III (80-83 мин), включающих около 80% суммарной активности. При этом фракция IV (85-90 мин), включающая более 90% суммарного белка, фактически не содержала активных форм фермента. Для фракций I-III (60-83 мин) на рисунке 1 видно совпадение профилей лизоцимной активности и оптической плотности белка (пики 1-3). До 55 мин фракционирования либо такого совпадения нет (15-25 мин), либо возникают низкоактивные фракции фермента (26-30 мин, 37-42 мин). Все полученные фракции содержат в основном Дест-Лиз, так как выделены из высокоочищенного исходного препарата фермента. Их разделение на катионообменном сорбенте может быть связано с присутствием во фракциях разных форм фермента, различающихся как числом молекул Дест-Лиз, так и типом их взаимодействия. Известно, что для природной Дест-Лиз из медицинской пиявки также характерно существование по меньшей мере двух форм (43 000 и 180 000 ЕА лиз/мг), природа которых пока не выяснена [3]. Показано, что изопептидазная активность Дест-Лиз во фракциях I-III тоже значительно увеличивалась по сравнению с активностью исходного препарата фермента (табл. 1). Это позволяет допустить, что фракции I-III содержат

ВЫСОКОАКТИВНЫЕ ФРАКЦИИ РЕКОМБИНАНТНОГО ДЕСТАБИЛАЗЫ-ЛИЗОЦИМА

в основном активные молекулы Дест-Лиз. Однако распределение лизоцимной активности по фракциям не соответствует распределению изопептидазной: максимальная лизоцимная активность сосредоточена во фракции III, а изопептидазная – во фракции I (табл. 2).

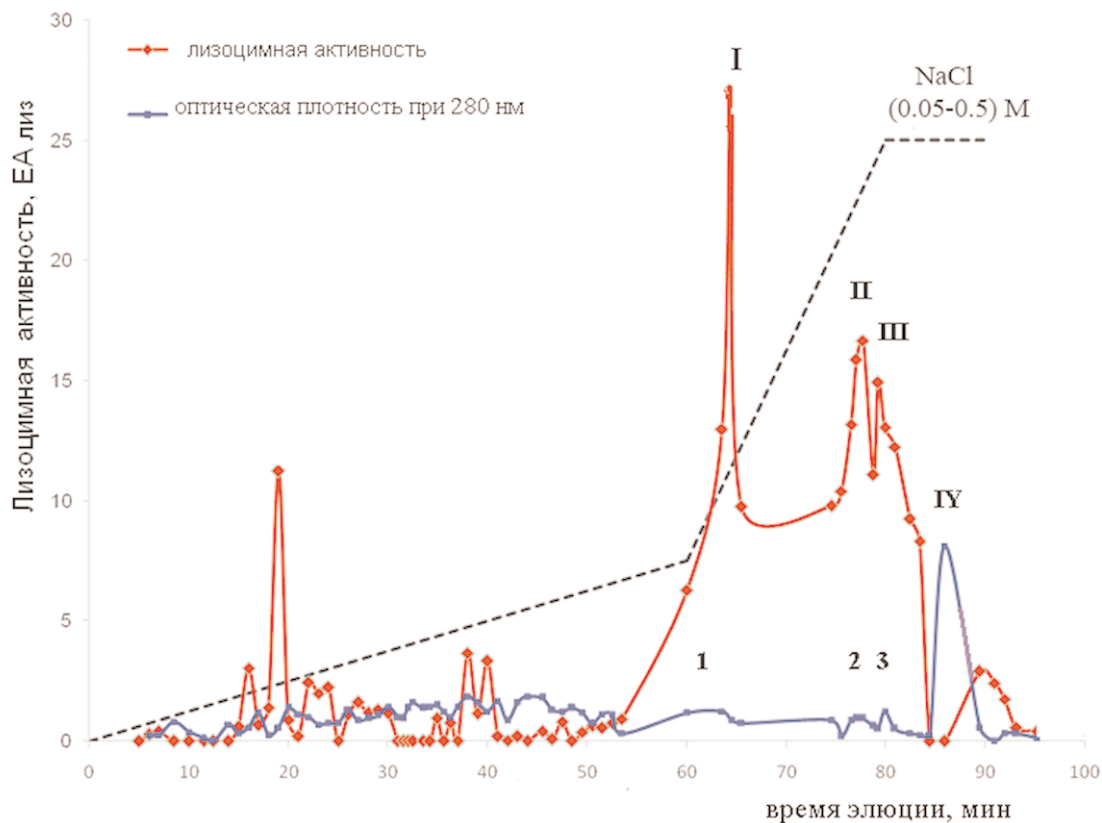


Рисунок 1.

Фракционирование высокоочищенного Дест-Лиз на колонке TSK CV 3-5W.

Таблица 2. Соотношение лизоцимной и изопептидазной активностей Дест-Лиз во фракциях I-III (относительные единицы).

Функции Дест-Лиз	Фракции		
	1	II	III
Лизоцимная	1,0	1,3	2,4
Изопептидазная	1,4	1,0	1,0

Можно предположить, что этот факт связан с присутствием в высокоактивных фракциях I-III разных форм фермента, возникших на стадии его рефолдинга, в виде олигомеров или комплексов, так как известна способность Дест-Лиз к образованию ди- и тетрамеров, сохраняющихся, например, в условиях электрофореза в SDS ПААГ [8]. Склонность к образованию димерных комплексов показана и для высокоомологичного Дест-Лиз лизоцима из морского моллюска *Tapes japonica* [9]. Более того, авторы показали, что в присутствии 0,15 M NaCl, то есть в условиях,

вызывающих диссоциацию димера, наблюдается резкое увеличение активности фермента, что указывает на важную функцию солевого компонента. В этом эксперименте авторы не анализировали изопептидазную активность, но в нашем случае мы можем предположить, что близко расположенные активные центры (лизоцимный и изопептидазный) Дест-Лиз находятся в постоянном взаимодействии (рисунок 2) [10]. Они противоположным образом реагируют на любое внешнее воздействие, например, на образование или диссоциацию комплексов Дест-Лиз для сохранения баланса и поддержания ферментативного статуса молекулы бифункционального фермента.

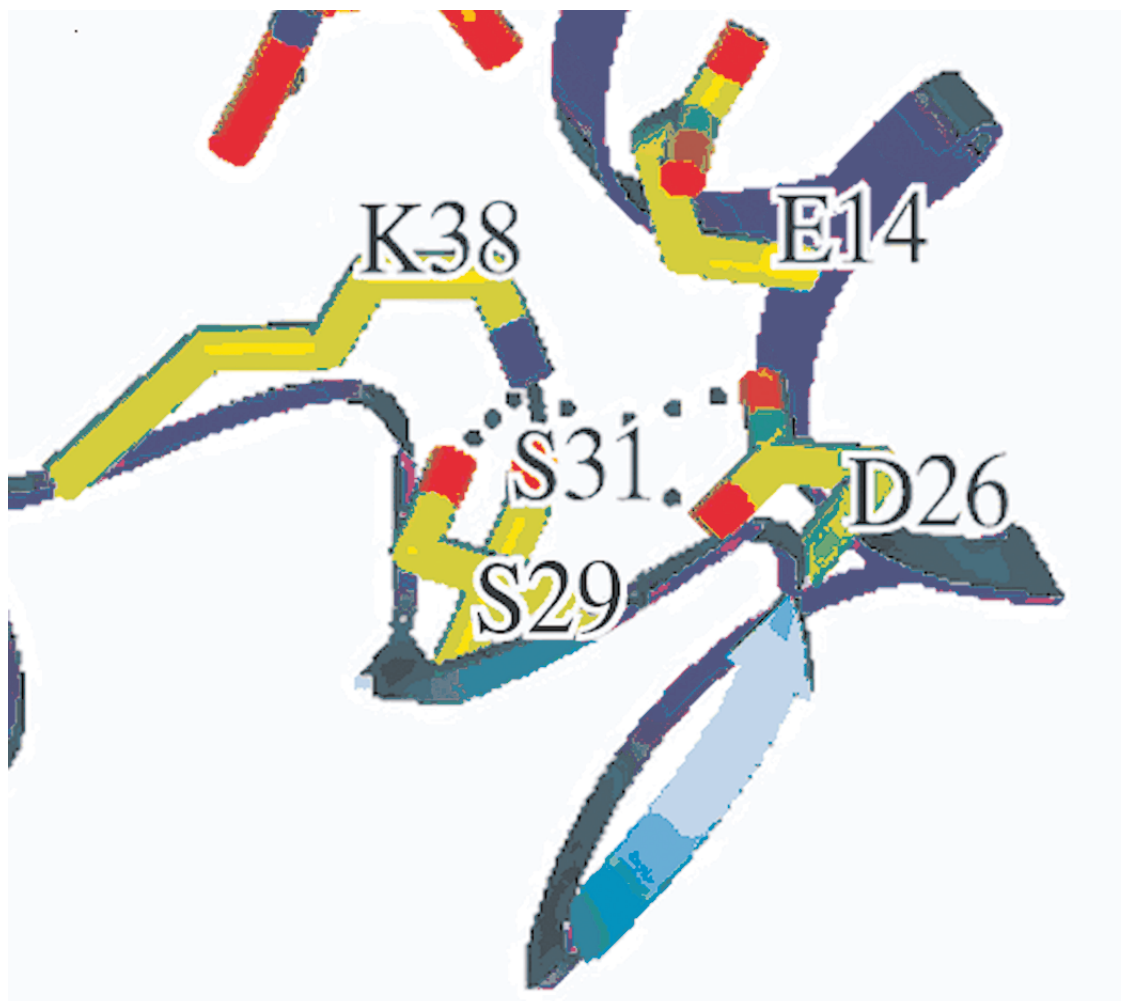


Рисунок 2.

Фрагмент пространственной структуры Дест-Лиз. Расположение лизоцимного (E14 и D26) и изопептидазного (S29 и K38) активных центров фермента [10].

ВЫВОДЫ.

1. Получены три высокоактивные фракции рекомбинантного белка Дест-Лиз, лизоцимная активность которых сопоставима с активностью природного препарата.
2. Предполагается, что полученные фракции представляют собой комплексные формы Дест-Лиз, различающиеся количеством мономерных форм фермента.

ЛИТЕРАТУРА

1. Баскова И.П., Никонов Г.И. (1985) Биохимия, **50**, 424–431.
2. Zavalova L., Lukyanov S., Baskova I., Snezhkov E., Akopov S., Berezhnoy S., Bogdanova, E., Barsova E., Sverdlov E. (1996) Mol. Gen. Genet., **253**, 20–25.
3. Zavalova L.L., Baskova I.P., Lukyanov A.V., Sass A.V., Snezhkov E.V., Akopov S.B., Artamonova I.I., Archipova V.S., Nesmeyanov V.A., Kozlov D.G. et al. (2000) Biochim. Biophys. Acta, **1478**, 69–77.
4. Zavalova L.L., Yudin T.G., Artamonova I.I., Baskova I.P. (2006) Chemotherapy, **52**, 158–160.
5. Завалова Л.Л., Лазарев В.Н., Левицкий С.А., Юдина Т.Г., Баскова И.П. (2010) Биохимия, **75**, 1314–1324.
6. Баскова И.П., Завалова Л.Л., Басанова А.В., Григорьева О.В. (1999) Биоорг. химия, **25**, 435–438.
7. Bradford M.M. (1976) Anal. Biochem., **72**, 248–254.
8. Baskova I.P., Nikonov G.I. (1991) Blood Coagulation and Fibrinolysis, **2**, 167–172.
9. Goto T., Abe Y., Kakuta Y., Takeshita K., Imoto T., Ueda T. (2007) J. Biol. Chem., **282**, 27459–27467.
10. Завалова Л.Л., Антипова Н.В., Фадеева Ю.И., Павлюков М.С., Плетнева Н.В., Плетнев В.З., Баскова И.П. (2012) Биоорг. химия, **38**, 229–233.

Поступила: 27. 06. 13.

HIGHLY ACTIVE FRACTIONS OF THE MEDICINAL LEECH RECOMBINANT DESTABILASE-LYSOZYME

Yu.I. Fadeeva¹, N.V. Antipova¹, I.P. Baskova², L.L. Zavalova¹

¹Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,
ul. Miklukho-Maklaya, 16/10, Moscow, 117997 Russia

²Biological Faculty, Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119991 Russia;
e-mail: salival@yandex.ru.

From the highly purified but lowly active recombinant protein Destabilase-Lysozyme (Dest-Lys) by use cation-exchange column TSK CM 3-SW chromatography, it was separated non-active fraction IV, contained 90% of protein. Fractions I, II and III, represented proteins with lysozyme and isopeptidase activities. Their lysozyme activity correlates with the activity of natural Des-Lys. The ratio of the activities in fractions I – III is such, that maximal lysozyme activity is concentrated in fraction III, isopeptidase – in fraction I. It is discussed the possibility of Dest-Lys different functions regulation is depended on the formation of protein complex forms.

Key words: destabilase-lysozyme of *Hirudo medicinalis*, lysozyme and isopeptidase functions, forms of recombinant enzyme.