

УДК 547.963.3:577.113.6:577.152.342*19'15

©Коллектив авторов

ГИДРОЛИЗ ЭНТЕРОПЕПТИДАЗОЙ НЕСПЕЦИФИЧЕСКИХ (МОДЕЛЬНЫХ) ПЕПТИДНЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ И ВОЗМОЖНАЯ ФИЗИОЛОГИЧЕСКАЯ РОЛЬ ЭТОГО ЯВЛЕНИЯ.

В.В. Лихарева, А.Г. Михайлова, Л.Д. Руми

Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
117997, Москва, ГСП-7, ул. Миклухо-Маклая, 16/10;
тел.: (095) 335-42-22; эл. почта: anna@enzyme.sioc.ras.ru; факс: (095)335-71-03

Энтеропептидаза (энтерокиназа; КФ 3.4.21.9) - высокоспецифичная протеиназа процессинга, действующая в начале каскада реакций активации пищеварительных ферментов дуоденального сока. Ее физиологическим субстратом является трипсиноген, при активации которого происходит гидролиз полипептидной цепи после остатка лизина-15 в специфичной для энтеропептидазы последовательности - DDDDK¹⁵-. Ранее нами был обнаружен кальций-зависимый внутримолекулярный автолиз тяжелой цепи энтеропепсидазы после остатков лизина-360 (-NNYEK³⁶⁰-INCN-), аргинина-422 (-GRRER⁴²²-VGLL-), аргинина-384 (-NEWER³⁸⁴-TQGS-) и лизина-465 (-QNMEK⁴⁶⁵-TIFQ), приводящий к тому, что фермент в значительной степени утрачивает эффективность катализа активации трипсиногена. В качестве субстратов, моделирующих процесс автолиза, использованы 7-9-членные пептиды: ангиотензин II человека (DR-VYIHPF) и фрагменты бета-цепи гемоглобина: LTAEЕКА и MLTAEЕКАА. Определение кинетических параметров гидролиза этих субстратов подтвердило нашу гипотезу, что фермент может гидролизовать полипептидную цепь после остатка лизина (или аргинина), которому в той или иной комбинации на расстоянии от четырех до одного аминокислотного остатка предшествуют 1-3 отрицательно заряженных аминокислотных остатка. Проведено сравнение особенностей кальций-зависимого автолиза тяжелой цепи энтеропептидазы и трипсина; деградация последнего в поджелудочной железе служит надежным защитным механизмом от преждевременной активации панкреатических проферментов, приводящей к панкреатиту. Предполагается, что подобный способ инактивации энтеропептидазы при низкой концентрации ионов кальция может являться составной частью этого защитного механизма.

Ключевые слова: энтеропептидаза; автолиз; трипсин, трипсиноген; пептидные субстраты; химерные белки, панкреатит.

ВВЕДЕНИЕ. Энтеропептидаза (энтерокиназа) (КФ 3.4.21.9) - высокоспецифичная протеиназа процессинга - действует в начале каскада реакций активации пищеварительных ферментов дуоденального сока [1]. Первой реакцией этого каскада является превращение трипсиногена в трипсин. При активации трипсиногена энтеропептидаза с высокой эффективностью катализирует гидролиз полипептидной цепи после N-концевой последовательности тетрааспартил-лизин. Данная последовательность консервативна и в природных белках обнаружена только в составе N-концевых активационных пептидов различных трипсиногенов [2]. Такая высокая специфичность позволяет использовать энтеропептидазу в качестве инструмента для специфического расщепления разнообразных химерных белков,

ГИДРОЛИЗ ЭНТЕРОПЕПТИДАЗОЙ МОДЕЛЬНЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

полученных методами генной инженерии, содержащих встроенную последовательность -DDDDK- (т. н. энтеропептидазный линкер) между белком-носителем и целевым белком [3, 4].

В 1998 г. мы обнаружили [5-7], что при удалении из молекулы энтеропептидазы ионов кальция происходит автолиз тяжелой цепи фермента по пептидным связям, образованным карбоксильными группами остатков лизина-465 в последовательности -QNMEK⁴⁶⁵-TIFQ-, лизина-360 (-NNYEK³⁶⁰-INCN-), аргинина-384 (-NEWER³⁸⁴-TQGS-) и аргинина-422 (-GRRER⁴²²-VGLL-). В результате этого автолиза энтеропептидаза в значительной степени снижает эффективность каталитической активации трипсиногена, в то же время сохраняя полностью активность по отношению к искусственным низко- и высокомолекулярным субстратам, содержащим линкерную последовательность -DDDDK-. Локализация мест расщепления в процессе автолиза позволила сделать вывод о наличии в N-концевом фрагменте 118-465 тяжелой цепи фермента вторичного субстрат-связывающего центра для природного субстрата, а также сформулировать концепцию строгой иерархии вторичных субстрат-связывающих центров энтеропептидазы [6, 7].

Однако другой стороной обнаруженного нами автолиза является вопрос о том, как гидролиз полипептидной цепи в приведенных выше последовательностях согласуется с предполагаемой абсолютной специфичностью энтеропептидазы (ее субстрат теоретически должен содержать остаток лизина в P₁-положении и четыре остатка глутаминовой/аспарагиновой кислоты в положениях P₂ - P₅).

Широкое использование энтеропептидазы в генноинженерных исследованиях для процессинга химерных белков позволило накопить (особенно за последние годы) определенное количество фактов, указывающих на то, что энтеропептидаза обладает способностью гидролизовать *in vitro* некоторые биологически активные пептиды: холецистокинин [8], α -эндорфин [9], адренокортикотропный гормон (АСТН) -(1-24) [10], а также белки аполипопротеин А-1 [11] и остеопонтин [12]. Во всех этих случаях субстраты не содержали необходимой для энтеропептидазы последовательности -(Asp)₄Lys-, их гидролитическое расщепление после остатков аргинина или лизина первоначально даже приписывали наличию в препаратах энтеропептидазы примесей какого-либо трипсиноподобного фермента [10].

Мы обратили внимание на то, что во всех случаях такого нетипичного энтеропептидазного гидролиза пептидных связей, образованных карбоксилами Lys и Arg (включая обнаруженный нами автолиз), как минимум один остаток Glu или Asp обязательно находится в положениях P₂ - P₅ по отношению к гидролизуемой связи. Таким образом, энтеропептидаза может гидролизовать субстраты общей формулы:

A-Asp_m(Glu_n)-Xaa_n-Lys(Arg)-↓-B, где Xaa - Asp, Glu, или любая аминокислота; m=0-1; n=0-3; A и B - защитные группы, аминокислотные остатки, их комбинации.

Эффективность гидролиза субстратов с укороченным линкером (m + n < 4) должна быть, по-видимому, меньше эффективности гидролиза типичных энтеропептидазных субстратов, однако при использовании энтеропептидазы для направленного гидролиза химерных белков следует учитывать возможность разрушения целевого пептида, как это происходит, например, в случае α -эндорфина (YGGFMTSEK-SQTPLVT) [9] или АСТН-(1-24) (SYSMEHFR-WGKKRRPVKVYP) [10].

Изучение кинетики обнаруженного нами автолиза тяжелой цепи энтеропептидазы при инкубации с ЭДТА показало, что начальная скорость реакции не зависит от концентрации энтеропептидазы и составляет 4 x 10⁻⁹ М/мин (20°C 10⁻³М ЭДТА). Таким образом, процесс, по-видимому, носит внутримолекулярный характер (реакция нулевого порядка). Кроме того, процесс автолиза проходит, по-видимому, одновременно по всем четырем центрам. В каком порядке могут образовываться N-концевые фрагменты различной длины,

соответствующие расщепления тяжелой цепи после остатков лизина-360 и 465 и аргинина-384 и 422, неизвестно. Конечным продуктом реакции всегда является С-концевая половина тяжелой цепи 466-800, связанная дисульфидной связью с легкой цепью.

Поэтому в качестве модельных субстратов для изучения автолиза энтеропептидазы мы выбрали имевшиеся в нашем распоряжении некоторые биологически активные пептиды, соответствующие вышеприведенной формуле энтеропептидазного субстрата с укороченным линкером ($m + n < 4$): ангиотензин II человека - DRVYIHPF (AT) и пептиды β -цепи гемоглобина крупного рогатого скота LTAEEKA [Hb-(2-8)] и MLTAEKAA [Hb (1-9)].

МЕТОДИКА. В работе использовали трис ("Merck", Германия), *n*-нитроанилид N^{α} -бензоил-D, L-аргинина, TFA для ВЭЖХ и трипсиноген быка ("Sigma", США), ацетонитрил для ВЭЖХ ("Криохим", Россия), реактив Protein Assay для количественного определения белка ("Bio-Rad", США), ангиотензин II человека ("Serva", Германия). Пептиды Hb (2-8) и Hb (1-9) любезно предоставлены Б. В. Васильевским.

Для ВЭЖХ использовали хроматограф "Beckman System Gold" (США). Хроматографию проводили на колонках Nucleosil ("Macherey-Nagel", Германия) и Nova-Pac C₈ ("Waters", США).

Энтеропептидаза получена из слизистой двенадцатиперстной кишки быка и очищена по разработанному нами методу [7]. Активность препаратов фермента определяли по активации трипсиногена [7].

Константы гидролиза пептидов энтеропептидазой определяли при инкубировании не менее шести концентраций соответствующего субстрата (в интервале 1-10 мМ) с 72,8 нМ энтеропептидазы [AT и Hb (2-8)] и 33,3 нМ [Hb (1-9)] в 0,1 М трис-HCl-буфере, pH 8,0, 37°C. В определенные интервалы времени, соответствующие не более 20% превращения каждого субстрата, отбирали по 6-8 проб (2-5 мкл), разбавляли 0,1% TFA до 25 мкл и хранили при температуре -70°C. Анализировали состав аликвоты с помощью ВЭЖХ на колонке Nucleosil 7/C₈ (250×4 мм) в 0,1% TFA с градиентом ацетонитрила 0-60% или Nova-Pac C₈ (3,9×150 мм) с градиентом ацетонитрила 0-40% за 35 мин., скорость элюции 1 мл/мин. Начальную скорость реакции рассчитывали по соотношению площадей пиков субстрата и одного из продуктов; поправку на разницу в молекулярном оптическом поглощении при 222 нм вносили после полного гидролиза.

При определении кинетических параметров гидролиза субстратов (k_{cat} и K_m) расчет проводили по методу Eisenthal-Cornish-Bowden [13]. Для доказательства структуры продуктов гидролиза собирали аликвоты индивидуальных пиков и анализировали с помощью масс-спектрометрии (MALDI). Так, для пика субстрата $m/z = 762$ [M+H]⁺; расчетная молекулярная масса MLTAEKAA=760,81 Да. Для пика продукта гидролиза значение $m/z=690,7$ [M+H]⁺, что соответствует LTAEEKA (расчетная молекулярная масса = 689,74 Да).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Молекула энтеропептидазы состоит из двух цепей: тяжелой (120-135 кДа) и легкой (47 кДа), соединенных дисульфидной связью. Полные нуклеотидные последовательности генов, кодирующих энтеропептидазу, были определены для быка [14], свиньи, человека, крысы и мыши [15]. Обнаружено, что эти ферменты синтезируются в виде одноцепочечного белка-предшественника. Легкая цепь соответствует аминокислотным остаткам 801-1035, а тяжелая цепь находится в N-концевой области белка-предшественника энтеропептидазы быка. Нами была определена N-концевая аминокислотная последовательность тяжелой цепи активного фермента [5], данные указывали на то, что в зрелом ферменте началом этой цепи является серин-118 предшественника.

Легкая цепь является трипсиноподобным сериновым ферментом и содержит весь набор аминокислотных остатков, необходимых для создания как каталитического центра, так и участка связывания тетрааспартильной последовательности субстрата.

ГИДРОЛИЗ ЭНТЕРОПЕПТИДАЗОЙ МОДЕЛЬНЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

Однако этого оказывается недостаточно для обеспечения высокой эффективности гидролиза природного субстрата - трипсиногена.

В результате систематического изучения ферментативных и структурных особенностей энтеропептидазы мы пришли к выводу, что уникальные свойства этого высокоспецифичного фермента обусловлены существованием трех субстрат-связывающих центров. Легкая (или каталитическая) цепь энтеропептидазы содержит два из них. Это первичный центр (S_1)- остаток Asp^{381} , определяющий первичную трипсиновую специфичность легкой цепи, и, кроме того, вторичный связывающий центр - остаток Lys^{889} (S_2), который координирует четыре остатка аспарагиновой кислоты в положении P_2 - P_3 субстрата [16], придавая тем самым ферменту присущую ему высокую специфичность. Для достижения высокой активности энтеропептидазы по отношению к ее природному субстрату трипсиногену при одновременном сохранении высокой специфичности гидролиза требуется участие еще одного вторичного субстрат-связывающего центра (S_{II}), расположенного на участке 118-465 тяжелой цепи фермента [5-7]. Таким образом, существует строгая иерархия вторичных субстрат-связывающих центров: один обеспечивает специфичность, а второй - эффективность гидролиза.

Взаимодействие молекулы трипсиногена со всеми тремя центрами энтеропептидазы приводит к значительно более прочному связыванию молекулы этого субстрата ($K_m \approx 10^{-6}$ М) по сравнению с искусственными пептидами и химерными белками ($K_m \approx 10^{-4}$ М), несмотря на то, что последние также содержат последовательность $-(Asp)_4Lys-$. Связывание соответствующей линкерной последовательности с первичным и вторичным субстрат-связывающими центрами легкой цепи фермента обычно приводит к значениям K_m или K_i порядка 10^{-4} М [5-7, 17].

Гидролиз модельных пептидных субстратов. Первые результаты по гидролизу субстратов типа:

$A-Asp_m(Glu_m)-Xaa_n-Lys(Arg)-\downarrow-B$:

AT ($m=1$; $n=0$; $A = H$; $B = -ValTyrIleHisProPhe-OH$);

Hb (2-8) ($m=2$; $n=0$; $A = H-LeuThrAla-$; $B = -Ala-OH$);

Hb (1-9) ($m=2$; $n=0$; $A = H-Met LeuThrAla-$; $B = -Ala-Ala-OH$)

продемонстрировали, что энтеропептидаза действительно обладает способностью гидролизовать пептиды по связям, образованным карбоксильными группами остатков лизина или аргинина, если в положениях P_2 - P_3 субстрата находится менее четырех отрицательно заряженных аминокислотных остатка. Однако укорачивание линкерной последовательности за счет уменьшения числа отрицательно заряженных аминокислотных остатков приводит к ухудшению связывания таких субстратов с вторичным центром Lys^{889} легкой цепи фермента на порядок. Значения K_m соответствующих субстратов энтеропептидазы (табл.) составляют более 10^{-3} М, причем не обнаружено какого-либо отличия между субстратом с одним таким остатком (AT) и двумя [Hb (2-8) и Hb (1-9)].

Значения k_{cat} для AT и Hb (2-8) также близки и невелики ($\approx 30 \text{ мин}^{-1}$). Общая эффективность гидролиза таких субстратов составляет не более 1% от соответствующей величины для химерного белка, содержащего полноразмерный линкер $-(Asp)_4Lys-$ (табл.). Однако удлинение с N- и C-конца на один аминокислотный остаток пептида Hb (2-8) привело к резкому возрастанию каталитической эффективности гидролиза: значение k_{cat} для Hb (1-9) составляет 1510 мин^{-1} ; гидролиз его всего в три раза менее эффективен, чем химерного белка с полноразмерным линкером (табл.).

Таким образом, на примере нонапептида Hb (1-9) продемонстрирован достаточно эффективный гидролиз энтеропептидазой полипептидной цепи после остатка лизина, которому предшествуют всего два остатка глутаминовой кислоты. По-видимому, существует критерий минимальной длины таких субстратов: при одинаковых значениях K_m каталитическая эффективность гепта и октапептидов Hb (2-8) и AT на два порядка меньше, чем нонапептида Hb (1-9). Более того, оба субстрата, которые являются фрагментами гемоглобина, имеют одинаковую аминокислотную последовательность в положениях P_1 '- P_6 .

Таблица. Константы гидролиза ряда субстратов энтеропептидазы при pH 8.0; 37°C

Субстрат	K_m , мМ	k_{cat} , мин ⁻¹	k_{cat}/K_m , мМ ⁻¹ мин ⁻¹
AT; DR-VYHPF	3.3±0.5	24.0±2	7.3±1.2
Hb-(2-8); LTAEEK-A	4.2±0.8	29.4±3.3	7.0±1.5
Hb-(1-9); MLTAEEK-AA	4.0±1	1510±189	378±105
PrAD ₄ K-P26* [5-7]	0.125	157.0	1260

Примечание: * - Химерный белок, содержащий в качестве носителя модифицированный белок А, а в качестве целевого продукта - рековерин.

Для выяснения влияния длины полипептидной цепи на эффективность энтеропептидазного гидролиза в настоящее время проводятся эксперименты с другими фрагментами гемоглобина, содержащими последовательность ЕЕК.

Потенциальные и экспериментально обнаруженные центры автолиза энтеропептидазы. Используемые нами субстраты (биологически активные пептиды) были выбраны всего лишь по структурным соображениям в качестве модели процесса автолиза энтеропептидазы. Мы определили количество и расположение потенциальных сайтов автолиза тяжелой цепи энтеропептидазы по ее аминокислотной последовательности [14]. Как правило (за исключением двух случаев), лишь один остаток Glu или Asp при этом предшествует остатку Lys или Arg ($m = 0$, $n = 1$); интересно, что распределение таких центров оказалось неравномерным (они в основном сконцентрированы в двух областях, которые находятся в N-концевой половине тяжелой цепи). Кроме того, обнаруженные нами области концентрации потенциальных сайтов автолиза согласуются с известными из литературы данными о подразделении тяжелой цепи на домены, гомологичные различным белкам [14].

Первый фрагмент (118-243) содержит семь таких центров, из которых теоретически самым предпочтительным представляется -DEDNK²³⁴-TC- ($m = 3$). Однако фрагмент 199-240 является богатым цистеином доменом, гомологичным различным белкам системы комплемента и рецепторам липопротеинов низкой плотности [14]. Семь цистеиновых остатков расположены в этой области. Безусловно, концентрация остатков цистеина на каком-либо небольшом участке повышает вероятность существования S-S-связей и образования компактной структуры, что, в общем, должно препятствовать автолизу на этом участке молекулы. При автолизе в этой области 98-82% тяжелой цепи осталось бы связанной дисульфидной связью с легкой цепью; в ходе инкубации с ЭДТА мы не обнаружили такого расщепления тяжелой цепи энтеропептидазы.

Вторая область - это фрагмент 359-465, гомологичный мембранносвязанной металлопротеазе меприну [14]. Из шести потенциальных центров автолиза мы экспериментально обнаружили кальций-зависимый автолиз в четырех: QNMEK⁴⁶⁵-TIFQ-, -NNYEK³⁶⁰-INCN-, -NEWER³⁸⁴-TQGS- (здесь $m + n = 2$) и -GRRER⁴²⁰-VGLL- [5-7]. Эта средняя часть тяжелой цепи, наиболее подверженная автолизу, содержит всего три остатка цистеина.

Наши данные позволяют также несколько уточнить расположение дисульфидных связей в молекуле энтеропептидазы. По аналогии с другими сериновыми ферментами предполагается локализация четырех внутренних дисульфидных связей легкой цепи: Cys⁸²⁶-Cys⁸⁴², Cys⁹²⁶-Cys⁹⁹³, Cys⁹⁵⁷-Cys⁹⁷², Cys⁹⁸³-Cys¹⁰¹¹, а также межъединичной дисульфидной связи Cys⁷⁸⁸-Cys⁹¹² [15]. О локализации остальных, внутренних дисульфидных связей тяжелой цепи, ничего не известно, однако разделение с помощью гель-фильтрации продукта автолиза (466-1035) и нативной молекулы энтеропептидазы (118-1035) [5-7] свидетельствует, по крайней мере, об отсутствии дисульфидной связи между N- и C-концевыми половинами тяжелой цепи фермента.

C-концевая половина тяжелой цепи (492-800) содержит всего два, а легкая цепь (801-1035) - шесть потенциальных центров гидролиза. В этих областях молекулы энтеропептидазы, по нашим данным, автолиз не происходит [5-7].

ГИДРОЛИЗ ЭНТЕРОПЕПТИДАЗОЙ МОДЕЛЬНЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

Очевидно, что гидролиз в таких местах белковой молекулы может происходить лишь в случае доступности их активному центру энтеропептидазы. Часто химерные белки, даже содержащие полную линкерную последовательность, не гидролизуются этим ферментом или же гидролизуются очень медленно [18]. Доступность соответствующих сайтов для гидролиза определяется укладкой белковой глобулы. Вероятно, обнаруженный нами автолиз после остатков лизина-360 и 465, а также аргинина -384 и 422 становится возможным из-за разрыхления белковой глобулы после удаления из нее ионов кальция. По-видимому, в нативном состоянии даже при удалении кальция в остальных потенциальных центрах автолиз не происходит.

Физиологическая роль кальций-зависимого автолиза трипсина и тяжелой цепи энтеропептидазы. Таким образом, мы показали, что энтеропептидаза обладает свойством специфически (и в некоторых случаях даже эффективно) гидролизовать *in vitro* наряду со своим уникальным природным субстратом трипсиногеном некоторые биологически активные пептиды, а также (при определенных условиях) собственную тяжелую цепь.

Имеет ли обнаруженный нами гидролиз таких субстратов физиологическое значение? Мы предполагаем, что обнаруженный нами Ca^{2+} -зависимый автолиз тяжелой цепи энтеропептидазы по аналогии с аналогичным механизмом инактивации трипсина является важной составной частью природного защитного механизма от преждевременной активации ферментов поджелудочной железы. Несмотря на то, что кальций-зависимый автолиз трипсина давно известен и хорошо изучен, его физиологическая роль была выяснена лишь в последние годы после обнаружения его участия в патогенезе панкреатита.

В молекуле трипсина быка были обнаружены три основных центра автолиза: $\text{Lys}^{61}\text{-Ser}^{62}$, $\text{Arg}^{117}\text{-Val}^{118}$ и $\text{Lys}^{145}\text{-Ser}^{146}$ [19] после удаления иона кальция, координированного остатками т.н. кальций-связывающей петли ($\text{Glu}^{70}\text{-Glu}^{80}$) [20]. Последний из этих автолизных центров отсутствует как в катионном трипсине человека, так и в анионном трипсине крысы, который обычно используют в качестве модельного трипсина дикого типа для генетической инженерии. В работе Pal и др. [21] с помощью мутантных трипсинов крысы K61N, R117N и K61N/R117N было показано, что пептидный сегмент из 57 аминокислотных остатков между Lys^{61} и Arg^{117} , расположенный на поверхности белковой молекулы трипсина и соединяющий два глобулярных домена, является своеобразной мишенью для автолиза - "саморазрушающимся пептидным сегментом" (рис.А). При этом основная часть остатков лизина и аргинина всей молекулы, которые могут служить центрами трипсинового протеолиза (десять из тринадцати), сконцентрирована в этом сегменте. Пока его концы интактны возможные центры гидролиза в середине защищены от автолиза. Ca^{2+} -связывающая петля также расположена внутри этого сегмента; ион кальция стабилизирует устойчивую к автолизу конформацию двух его концов: Lys^{61} и Arg^{117} . Как только Ca^{2+} удаляется, начинается автолиз; на первой стадии - на концах сегмента, что, в свою очередь, ведет к интенсивной деградации всего фрагмента 61-117 (рис. А). Так как один аминокислотный остаток, входящий в каталитическую триаду (Asp^{102}), расположен внутри этого сегмента, а другой (His^{57}) - в непосредственной близости от одного из концов, процесс автолиза сопровождается полной инактивацией трипсина. Особый интерес представляет это исследование в связи с обнаруженными мутациями R117H [22] и R117C [23] в гене катионного трипсина человека у пациентов с наследственным панкреатитом. Предполагается, что такие мутации приводят к панкреатиту, делая невозможной инактивацию преждевременно образовавшегося в поджелудочной железе трипсина. Следовательно, деградация трипсина и трипсиногена путем автолиза является защитным механизмом от преждевременной активации ферментов, хранящихся в неактивном виде в поджелудочной железе, что было затем подтверждено с помощью мутантных анионных трипсинов крысы R117H [24] и катионных трипсинов человека R117H

[25] и R117C [23]. Интересно, что регулирующая роль кальция по отношению к активации трипсиногена двояка: последний содержит второй Ca^{2+} -связывающий центр в области четырех остатков Asp активационного пептида [20] и трипсинолиз связи Lys^{15} - Ile^{16} (автоактивация) в противоположность гидролизу связи Arg^{117} - Val^{118} (автолиз) промотируется ионами Ca^{2+} . Ведущая к панкреатиту патологическая генерация трипсина внутри ацинарных клеток поджелудочной железы происходит при низком внутриклеточном содержании Ca^{2+} и деградация зимогена/трипсина предотвращает далеко зашедшую автоактивацию. В противоположность этому активация трипсиногена энтеропептидазой (и автоактивация) в норме происходит в двенадцатиперстной кишке в условиях высокого содержания Ca^{2+} , способствующего активации и препятствующего автолизу [24]. Таким образом автолиз трипсина в среде с низким содержанием Ca^{2+} служит природным защитным механизмом от развития панкреатита.

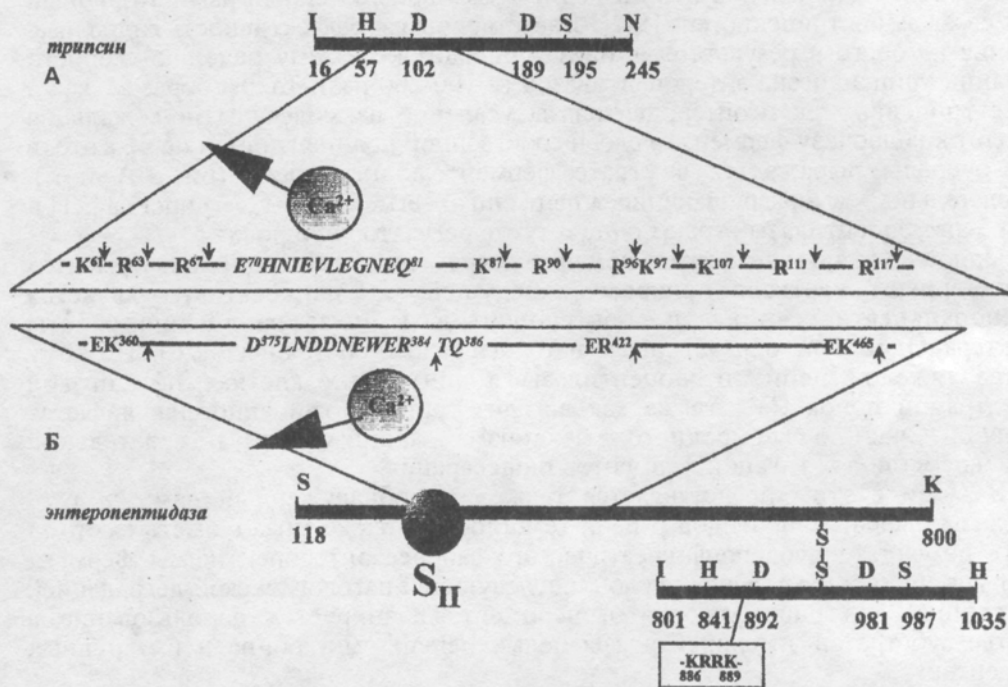


Рисунок.

Схема "саморазрушающегося пептидного сегмента" анионного трипсина крысы и катионного трипсина человека 61-117 по [21] (А) и тяжелой цепи энтеропептидазы 360-445 (Б). Стрелками отмечены места автолиза; курсивом - Ca^{2+} -связывающие центры трипсина [20] и энтеропептидазы (предполагаемый).

Если обратиться к обнаруженному нами Ca^{2+} -зависимому автолизу энтеропептидазы, то сразу бросаются в глаза два обстоятельства. Во-первых, легкая цепь энтеропептидазы обладает высоким уровнем гомологии с трипсином (особенно вблизи аминокислотных остатков, входящих в состав активного центра [14]). Однако фрагмент сериновых протеиназ 61-117 не является консервативным, более того, именно здесь расположена уникальная последовательность энтеропептидазы -K⁸⁸⁶R⁸⁸⁷R⁸⁸⁸K⁸⁸⁹- (фрагмент 96-99 в химотрипсиновой номенклатуре), содержащая вторичный субстрат-связывающий центр, обеспечивающий специфичность энтеропептидазы. Гомология между трипсином и легкой цепью энтеропептидазы в этой области отсутствует. Это касается как кальций-связывающего центра (легкая цепь его не имеет), так и потенциальных центров трипсинового гидролиза. Кроме того, для энтеропептидазного автолиза требуется, как минимум, один остаток Asp или Glu в положении P₂ - P₅ по

ГИДРОЛИЗ ЭНТЕРОПЕПТИДАЗОЙ МОДЕЛЬНЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

отношению к Lys или Arg в P₁, однако, хотя три таких потенциальных центра расположены на фрагменте легкой цепи энтеропептидазы, соответствующем фрагменту 61-117 трипсина, какого-либо автолиза легкой цепи ни при удалении ионов Ca²⁺, ни в более жестких условиях (обработка SDS, восстановление дисульфидных связей) [5-7] мы не наблюдали.

Во-вторых, обнаруженный нами Ca²⁺-зависимый автолиз тяжелой цепи энтеропептидазы при отсутствии какой-либо структурной гомологии с участком автолиза трипсина по своим особенностям практически аналогичен последнему. Здесь и концентрация соответствующих центров на фрагменте 360-465 N-концевой части цепи, и наличие в этой области потенциальных Ca²⁺-связывающих центров (рис., Б). Следует также подчеркнуть высокий уровень видовой гомологии соответствующего фрагмента тяжелой цепи энтеропептидазы (он практически одинаков для ферментов человека, крысы, быка, свиньи и мыши [15]). В N-концевой половине тяжелой цепи находится S₁ - обнаруженный нами вторичный центр связывания трипсиногена [5-7], ответственный за эффективность гидролиза, удаление которого в результате автолиза приводит к резкому падению скорости активации трипсиногена энтеропептидазой (в 100-200 раз). Таким образом, как в случае трипсина, так и энтеропептидазы удаление из молекулы иона кальция приводит к гидролизу ферментом своей собственной полипептидной цепи, а это, в свою очередь, выражается в утрате ферментом активности (рис., А и Б). Следовательно, "саморазрушающийся пептидный сегмент" 61-117 трипсина [21] и 360-465 энтеропептидазы играют одну и ту же регуляторную роль.

Одной из причин нежелательной преждевременной активации проферментов в ацинарных клетках поджелудочной железы, ведущей к панкреатиту, является дуоденопанкреатический заброс энтеропептидазы из-за нарушения работы сфинктера Одди при определенных патологических состояниях [26]. Поэтому автолиз тяжелой цепи энтеропептидазы в ацинарных клетках при низкой концентрации ионов Ca²⁺, также как автолиз трипсина/трипсиногена, является составной частью природного механизма защиты от нежелательной преждевременной активации ферментов пищеварения.

В связи с этим представляется также, что обнаруженный нами *in vitro* гидролиз модельных пептидов β-цепи гемоглобина также может иметь место *in vivo* (в результате дуоденопанкреатического заброса энтеропептидазы фермент может проникнуть в кровяное русло с последующей патологической деградацией гемоглобина). Для продолжения эксперимента планируется использование в качестве субстратов энтеропептидазы целых цепей гемоглобина и их крупных фрагментов.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 02-04-48553).

ЛИТЕРАТУРА

1. Kunitz M. (1939) J. Gen. Physiol., **22**, 429-446.
2. Guy O., Bartelt D.C., Amic J., Colomb E., Figarella C. (1976) FEBS Lett., **62**, 150-153.
3. Добрынин В.Н., Болдырева Е.Ф., Филиппов С.А., Чувтило С.А., Коробко В.Г., Воротынцева Т.И., Михайлова А.Г., Бессмертная Л.Я., Америк А.Ю., Антонов В.К. (1987) Биоорг. химия, **13**, 119-121.
4. Михайлова А.Г., Шибанова Е.Д., Руми Л.Д., Антонов В.К. (1994) Биоорг. химия, **20**, 883-893.
5. Михайлова А.Г., Руми Л.Д. (1998) Биоорг. химия, **24**, 282-287.
6. Mikhailova A.G., Rumsh L.D. (1999) FEBS Lett., **442**, 226-230.
7. Mikhailova A.G., Rumsh L.D. (2000) Appl. Biochem. Biotechnol., **88**, 159-174.
8. Mutt V., Tatemoto K., Carlquist M., Light A. (1981) Bioscience Rep., **1**, 651-659.
9. Sharma A., Khoury-Christianson A.M., White S.P., Dhanjal N.K., Huang W., Paulhiac C., Friedman E.J., Manjula B.N., Kumar R. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA., **91**, 9337-9341.

10. Uegaki K., Nemoto N., Shimizu M., Wada T., Kyogoku Y., Kobayashi Y. (1996) FEBS Lett., **379**, 47-50.
11. Safi W., Maiorano J.N., Davidson W.S. (2001) J. Lipid Res., **42**, 864-872.
12. Agnihotri R., Crawford H.C., Haro H., Matrisian L.M., Havrda M.C., Liaw L. (2001) J. Biol. Chem., **276**, 28261-28267.
13. Eisenthal R., Cornish-Bowden A. (1974) Biochem. J., **139**, 715-720.
14. Kitamoto Y., Yuan X., Wu Q., McCourt D.W., Sadler J.E. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **91**, 7588-7592.
15. Yuan X., Zheng X., Lu D., Rubin D., C., Pung C. Y.M., Sadler J. E. (1998) Am. J. Physiol. **37**, G342-G349.
16. Lu D., Futterer K., Korolev S., Zheng X., Tan K., Waksman G., Sadler J.E. (1999) J. Mol. Biol., **292**, 361-373.
17. Austen B.M., Cliffe S., Grant D. (1986) Hermon-Taylor J. US Patent. **4**, 593,018, 3 Jun.
18. Шибанова Е. Д., Михайлова А. Г., Александров С. Л., Руми Л. Д. (2000) Биоорган. химия, **26**, 522-529.
19. Maroux S., Desmuelle P. (1969) Biochim. Biophys. Acta, **181**, 59-72.
20. Bode W., Schwager P. (1975) J. Mol. Biol., **98**, 693-717.
21. Varallyay E., Pal G., Patty A., Szilagyi L., Graf L. (1998) Biochem. Biophys. Res. Com. **243**, 56-60.
22. Whitcomb D.C. (1999) Pancreas, **18**, 1-12.
23. Simon P., Weiss F.U., Sahin-Toth M., Parry M., Nayler O., Lenfers B., Schnekenburger J., Mayerle J., Domschke W., Lerch M.M. (2002) J. Biol. Chem., **277**, 5404-5410.
24. Sahin-Toth M., Graf L., Toth M. (1999) Biochem. Biophys. Res. Com., **264**, 505-508.
25. Sahin-Toth M., Toth M. (2000) Biochem. Biophys. Res. Com., **278**, 286-289.
26. McCutcheon A.D. (2000) Arch. Surg., **135**, 278-285

Поступила 17.07.2002.

NON-SPECIFIC (MODEL) PEPTIDE HYDROLYSIS BY ENTEROPEPTIDASE AND ITS POSSIBLE PHYSIOLOGICAL ROLE.

V. V. Likhareva, A. G. Mikhailova, L. D. Rumsh

Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,
ul. Miklukho-Maklaya 16/10, GSP-7, Moscow, 117997 Russia;
tel.: +7(095) 3354244; e-mail: anna@enzyme.siobc.ras.ru; fax: +7(095)3357103

Enteropeptidase (enterokinase) (EC 3.4.21.9), a highly specific processing protease, initiating a cascade of reactions activating the digestion enzymes. Catalyzing trypsinogen activation enteropeptidase exhibits unique properties for high efficiency hydrolysis of the polypeptide chain after lysine-15 residue in the -DDDDK15- sequence. In 1998 we found an unusual calcium-dependent autolysis of the enteropeptidase heavy chain leading to the drastic loss of its activity towards trypsinogen: after lysine-360 (-NNYEK₃₆₀-INCN-), -, arginine-384 (-NEWER₃₈₄-TQGS-), arginine-422 (-GRRER₄₂₂-VGLL-) and lysine-465 (-QNMEK₄₆₅-TIFQ-) residues. We used hepta-nona-peptides as the model substrates for autolysis: human angiotensin II - DRVYIHPF and cattle hemoglobin b-chain fragments: LTAEKKA and MLTAEKKA. Kinetic parameters of enteropeptidase hydrolysis for these substrates were determined. Recent study demonstrates the ability of enteropeptidase to hydrolyze peptide bonds formed by carboxyl groups of Lys or Arg residues if less than four but at least one negative charged amino acid residue is in any of substrate P₂ - P₅ positions. Ca²⁺-dependent autolysis of enteropeptidase heavy chain and of trypsin were compared; the second one serves as the natural defense mechanism against the undesirable premature proenzymes activation in pancreas leading to pancreatitis. The corresponding enteropeptidase inactivation in low Ca²⁺ environment ought to be the component of the same protective mechanism.

Key words: enteropeptidase, autolysis, trypsin, trypsinogen, peptide substrates, fusion proteins, pancreatitis.