



УДК 577.152.342*19'135

© 1994 А. Г. Михайлова, Е. Д. Шибанова, Л. Д. Румш,
В. К. АнтоновЭНТЕРОПЕПТИДАЗА И ЕЕ ПРИМЕНЕНИЕ ДЛЯ РАСЩЕПЛЕНИЯ
ХИМЕРНЫХ БЕЛКОВИнститут биоорганической химии им. И. И. Шемякина и
Ю. А. Овчинникова РАН, Москва

Ключевые слова: энтеропептидаза (энтерокиназа), химерные белки, специфичность, протеолиз.

Исследовано расщепление высокоочищенной энтеропептидазой (КФ 3. 4. 21. 9) из слизистой двенадцатиперстной кишки быка по специфическому линкеру $(Asp)_4Lys$ разнообразных химерных белков, как образующихся в виде тел включения, так и секретирующихся в межклеточное пространство. Получены кинетические константы ферментативного гидролиза одного из химерных белков энтеропептидазой и показано, что связывание субстрата с ферментом определяется лишь средством его к линкерному пептиду $(Asp)_4Lys$. Сформулированы требования к рекомбинантным белкам для их успешного расщепления энтерокиназой.

Получение небольших белков и пептидов прямой экспрессией соответствующих генов в клетках *E. coli* малоэффективно из-за быстрого расщепления их бактериальными протеиназами. Кроме того, при прямом синтезе каких-либо белков в клетках *E. coli* иницирующий кодон приводит к образованию N-концевого метионина, что, в общем, не свойственно белкам млекопитающих.

Одно из возможных решений этой проблемы — конструирование гибридных генов и выделение рекомбинантных белков, состоящих из белка-носителя и целевого продукта. При этом дальнейшее решение задачи сводится к специфическому расщеплению соответствующего химерного белка. Эта задача может быть решена несколькими способами.

Первый способ заключается в специфическом химическом расщеплении пограничной для двух белков пептидной связи бромцианом (по метионину [1, 2]), 2-(2-нитрофенилсульфенил)-3-метил-3-броминдолем (по триптофану [3]), гидроксиламином (по связи $Asn-Gly$ [4]) или кислотным гидролизом (по связи $Asp-Pro$ [5]). Очевидны ограничения этого способа, заключающиеся в том, что конечный белок не должен содержать остатков аминокислот, по которым проводится специфическое химическое расщепление. Кроме того, деградация белка-носителя также не всегда желательна, так как это может затруднять его отделение от конечного продукта.

Другой способ заключается в использовании высокоспецифических протеиназ, расщепляющих определенную последовательность аминокислот. Ряд исследователей использовали для этих целей различные ферменты: коллагеназу (когда в качестве линкера выступает участок коллагена [6]); фактор Ха системы свертывания крови, расщепляющий полипептидную цепь после остатка аргинина в достаточно специфической последовательности Ile-Glu-Gly-Arg [7]; тромбин (гидролизует пептидную связь после второго остатка аргинина в последовательности Gly-Val-Arg-Gly-Pro-Arg [8]); ренин [9]; IgA-протеиназу, расщепляющую связь после последовательности Pro-Pro-Thr-Pro [10], протеиназу V8 [11]. Применение перечисленных выше ферментов также имеет определенные ограничения, связанные главным образом с их недостаточной высокой специфичностью.

Мы полагаем, что в настоящее время наиболее подходящим ферментом для расщепления гибридных белков является энтеропептидаза (энтерокиназа; КФ 3.4.21.9). Специфичность этого фермента уникальна. Он расщепляет пептидную связь после последовательности -Asp-Asp-Asp-Asp-Lys⁴. Энтеропептидаза играет ключевую роль в активации ферментов системы пищеварения, отщепляя от предшественника трипсина (трипсиногена) N-концевой пептид [12—14].

Процесс этот происходит в двенадцатиперстной кишке млекопитающих. Уникальная специфичность фермента, обуславливающая его физиологическую роль в организме, позволяет надеяться на применение энтеропептидазы в генной инженерии. В природе последовательность -Asp-Asp-Asp-Asp-Lys- встречается только в N-концевой части трипсиногенов. Последовательности, включающие 2 или 3 остатка аминокислотной кислоты перед остатком аргинина или лизина, также подвергаются гидролизу под действием энтеропептидазы, но с существенно меньшими скоростями [15].

Впервые энтеропептидаза была выделена Лайтом, который разработал классический метод очистки и охарактеризовал свойства фермента [13, 14]. Лайт также высказал предположение, что высокая специфичность энтеропептидазы может быть использована в генной инженерии для расщепления гибридных белков [15].

Следует отметить важность правильного выбора белка-носителя. В первых работах использовали собственные белки *E. coli*, в частности β-галактозидазу, связанную через метиониновый остаток с целевым белком. По мере развития генно-инженерных методов в качестве белков-носителей стали использовать и специально сконструированные рекомбинантные белки, обеспечивающие высокий уровень экспрессии, растворимость или способность образовывать тела включения, обладающие устойчивостью к действию бактериальных протеиназ. Для простоты выделения устойчивого белка можно использовать в качестве носителя белок, к которому легко могут быть получены антитела для последующей аффинной хроматографии [16, 17]. Можно ввести в химерный белок несколько гистидинов [9] и далее выделять такой белок на металлосодержащей колонке.

Цель нашей работы — создание универсального метода расщепления белков — продуктов экспрессии рекомбинантных генов с помощью энтеропептидазы.

Впервые энтеропептидаза была использована при получении гормонов роста человека и быка из рекомбинантных предшественников, несущих на N-конце последовательность Met-Phe-Pro-Leu-(Asp)₄-Lys- [18]. В данном случае энтеропептидаза отщепляла достаточно короткий N-концевой пептид. Использование энтеропептидазы было ограничено из-за отсутствия ее высокоочищенных коммерческих препаратов. Наличие примесей приводило к значительному протеолизу химерных белков [3]. Использование энтеропептидазы, очищенной по методу Лайта, может служить успешным примером расщепления химерных белков. Однако и в этих случаях наблюдалась незначительная их дегградация [16, 19].

Нами был получен рекомбинантный белок, состоящий из β-галактозидазы, энтеропептидазного линкера и [Leu⁵]энкефалина. Соответствующий ген был сконструирован в лаборатории химии генов [20]. При выделении химерного белка, выход которого составлял 20% от общего белка клетки, было показано,

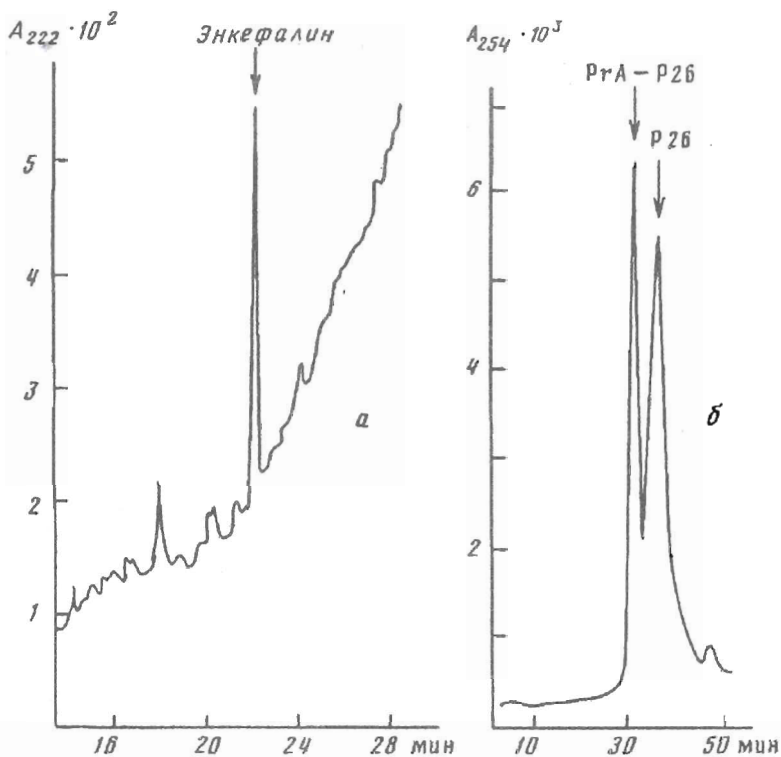


Рис. 1. ВЭЖХ-анализ продуктов расщепления энтерокиназой химерных белков GAL-ENK (а) и PrA-P26 (б). [S] $2 \cdot 10^{-5}$ М; [E] $6,5 \cdot 10^{-8}$ М (а) и $6,5 \cdot 10^{-9}$ М (б). Время гидролиза 30 мин (а) и 150 мин (б). Колонка Ultrasphere ODS (а) и Ultrapac TSK G 2000 SW (б)

что присутствие в нем даже следовых количеств протеиназ приводит к деградации химерного белка и к расщеплению энкефалина. Было выяснено, что примесные протеиназы являются металлоферментами и их активность может быть подавлена *o*-фенантролином. Не менее важна и чистота энтеропептидазы. Энтеропептидаза была получена нами из слизистой двенадцатиперстной кишки быка с достаточно высоким выходом и свободной от примесных протеиназ по видоизмененной методике*.

Для расщепления химерного белка его инкубировали с энтеропептидазой в молярном соотношении E : S 1 : 200—1 : 300 при pH 8,0. Концентрация химерного белка составляла 1—2 мг/мл. Продуктами реакции являлись только энкефалин и β -галактозидаза (см. рис. 1).

Учитывая тот факт, что при активации трипсиногена (природного субстрата энтеропептидазы) происходит отщепление достаточно короткого N-концевого пептида, получение энкефалина из химерного белка, состоящего из β -галактозидазы, линкера $-(Asp)_4-Lys-$ и энкефалина, с использованием энтерокиназы было пробным камнем по возможному применению ее для этой цели. В использованных нами конструкциях гибридных белков (табл. 1) в качестве белка-носителя применялся как собственный белок *E. coli* — β -галактозидаза, так и фрагменты некоторых других белков, обеспечивающие высокую экспрессию гибридного белка, а именно: фактор некроза опухоли, фрагмент γ -интерферона, фрагмент белка А.

Следующий из расщепленных нами химерных белков, так же как и в случае энкефалина, в качестве белка-носителя имел β -галактозидазу, к которой через энтеропептидазный линкер был присоединен фрагмент вазоактивного пептида

* Методика получения высокоочищенной энтеропептидазы будет опубликована отдельно.

Конструкции химерных белков*

Гибридный белок	Белок-носитель (M, кДа)	—Линкер—	Целевой полипептид (M, кДа)
GAL-ENK	β -Галактозидаза (116)	—(Asp) ₄ -Lys—	[Leu ⁵]энкефалин (0,556)
GAL-VIP	β -Галактозидаза (116)	—(Asp) ₄ -Lys—	фрагмент (17—28) вазоактивного кишечного пептида (1,35)
TNF-P	Фактор некроза опухоли (16,8)	—(Asp) ₄ -Lys—	аналоги вещества P (1,40)
IFN-HAV	Фрагмент γ -интерферона (12)	—(Asp) ₄ -Lys—	антигенная детерминанта вируса гепатита А (40)
IFN-HIV	Фрагмент γ -интерферона (12)	—(Asp) ₄ -Lys—	Arg-(протеиназа HIV I) (11)
PrA-P26	Фрагмент белка А (12)	—(Asp) ₄ -Lys—	рековерин (26)
PrA-GKN	Фрагмент белка А (12)	—(Asp) ₄ -Lys—	гуанилаткиназа (22)

* Рекомбинантные гены сконструированы: 1—3 — в лаб. химии генов [20]; 4 — в лаб. химии протеолитических ферментов Е. Д. Шибановой; 5 — в лаб. химии протеолитических ферментов А. Ю. Америком и Н. И. Остроумовой; 6—7 — в лаб. белков светочувствительных систем [22, 23]. Все гибридные белки продуцировались в *E. coli*.

(12 аминокислотных остатков). Так же как и в первом случае, химерный белок обладал β -галактозидазной активностью и был растворим.

Очевидно, что создание гибридных белков с последующим их расщеплением для получения целевых продуктов более перспективно, когда молекулярная масса целевого продукта соизмерима с молекулярной массой белка-носителя или превышает его. В противном случае выход целевого пептида невысок: из 2 мг химерных белков GAL-ENK и GAL-VIP (табл. 1) теоретически может быть получено 10 мкг энкефалина и 20 мкг вазоактивного кишечного пептида.

Поэтому логично было заняться созданием конструкций, содержащих более короткие белки-носители. Однако оказалось, что экспрессия чужеродных белков в *E. coli*, особенно в больших количествах, приводит к образованию нерастворимых тел включения [21]. Их образование позволяет довольно просто выделить гибридный белок в чистом состоянии. Один из примеров таких конструкций — химерный белок TNF-P, который после разрушения клеток является единственным нерастворимым белком.

Еще два химерных белка были сконструированы в нашей лаборатории. В качестве белка-носителя использовали фрагмент γ -интерферона, к которому через линкер -(Asp)₄-Lys- была присоединена антигенная детерминанта вируса гепатита А в одном случае и протеиназа вируса иммунодефицита (HIV I) — в другом. В этих конструкциях белок-носитель имел молекулярную массу 12 кДа, а целевые продукты — 40 и 11 кДа соответственно. Учитывая возможные трудности с расщеплением связи Lys-Pro в химерном белке IFN-HIV, мы присоединили к N-концевой части белка HIV I остаток аргинина. Химерные белки IFN-HAV и IFN-HIV синтезировались с высоким выходом и образовывали тела включения, как и в случае с химерным белком TNF-P.

Для расщепления гибридного белка энтеропептидазой его требуется перевести в растворимое состояние, причем в достаточно высокой концентрации (до 10 мг/мл). Для растворения тел включения последние обрабатывают 8 М раствором мочевины

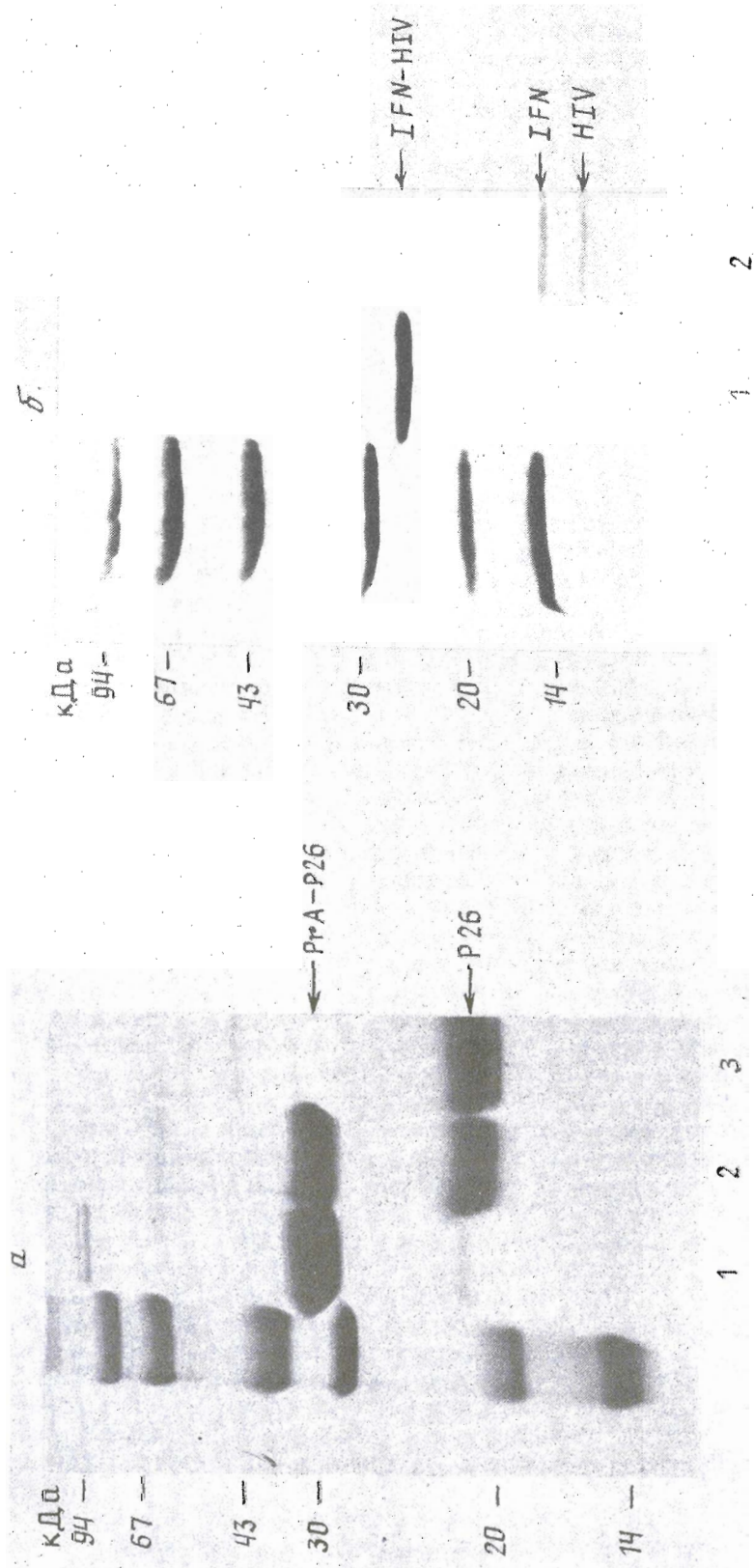


Рис. 2. SDS-электрофорез продуктов расщепления энтеропептидазой химерных белков PrA-P26 ($2 \cdot 10^{-4}$ М) и IFN-HIV ($1 \cdot 10^{-5}$ М) (а). а — 15% ПААГ, [E] $6,5 \cdot 10^{-9}$ М, время гидролиза 2,5 ч (2) и 17 ч (3); 1 — контроль 17 ч без фермента; б — 10–20% градиентный ПААГ, [E] $3 \cdot 10^{-8}$ М, время гидролиза 5 ч. 1 — контроль, 2 — опыт

или 6 М гуанидингидрохлоридом с последующим диализом до полного их удаления, так как энтерокиназа теряет свою активность даже в 0,01 М растворе мочевины. Тем не менее достигнуть высокой концентрации гибридного белка после растворения тел включения удается далеко не всегда. Так, растворимость химерного белка TNF-P была менее 0,2 мг/мл. Столь низкая концентрация гибридного белка требовала длительной (до суток) инкубации его с энтеропептидазой. В течение длительной инкубации начинают проявлять свою активность примесные протеиназы, попавшие в тела включения, которые расщепляют не только гибридный белок, но и саму энтеропептидазу. Все это позволило провести расщепление химерных белков TNF-P, IFN-HAV и IFN-HIV лишь в аналитических количествах.

В следующей конструкции в качестве белка-носителя использован фрагмент белка А, содержащий IgG-связывающий центр, а также сигнальную последовательность, обеспечивающую секрецию гибридного белка. К фрагменту белка А через линкер $-(Asp)_4-Lys-$ присоединен кальцийсвязывающий белок Р26 из сетчатки быка (рековерин) [22]. Следует отметить, что данная конструкция наиболее удачна. Благодаря сигнальной последовательности химерный белок секретируется в межклеточное пространство и легко отделяется от клеточной массы центрифугированием. Внутри клеток остается не более 5—10% химерного белка. Наличие IgG-связывающего участка позволяет проводить очистку гибридного белка с помощью аффинной хроматографии на IgG-сефарозе. Полученный в чистом виде химерный белок обладает высокой растворимостью (5—10 мг/мл), и обработка его энтеропептидазой в концентрации 2 мкг/мл в течение 2 ч приводит к образованию чистого рековерина. Контроль за образованием продуктов проводили с помощью ВЭЖХ и SDS-электрофореза (см. рис. 2).

Аналогичным образом был получен химерный белок, состоящий из фрагмента белка А, последовательности $-(Asp)_4-Lys-$ и гуанилаткиназы из сетчатки быка [23]. Этот химерный белок, как и предыдущий, обладал всеми достоинствами, связанными с простотой его выделения, очистки и расщепления энтеропептидазой.

Конструкция PrA-P26 (табл. 1) позволяет получать экспрессируемый белок в высоких количествах и применять его в качестве субстрата для изучения механизма действия энтерокиназы вместо ее природного субстрата трипсиногена, использование которого сопряжено с рядом трудностей.

В табл. 2 представлены полученные нами кинетические параметры расщепления энтеропептидазой гибридного белка, синтетического субстрата и трипсиногена [13]. Как видно, значения величин K_m для химерного белка и синтетического субстрата близки и достаточно велики по сравнению с K_m для трипсиногена, т. е. имеет место слабое связывание субстратов с ферментом. По-видимому, основной вклад в связывание субстрата с ферментом вносит последовательность $-(Asp)_4-Lys-$. Скорость расщепления других химерных белков, рассчитанная с использованием значений этих констант, практически совпадает с данными эксперимента. Высокое значение K_m указывает на то, что для успешного расщепления требуется достаточно высокая концентрация субстрата. Молекулярная масса химерного белка TNF-P около 20 кДа. При растворимости его менее 0,2 мг/мл концентрация белка-субстрата в растворе будет менее $1 \cdot 10^{-5}$ М, что на порядок меньше величины K_m . Именно этим и объясняется исключительно низкая эффективность расщепления плохо растворимых химерных белков энтеропептидазой. Растворимость химерных белков PrA-P26 и PrA-GKN составляет около 10 мг/мл ($0,3 \cdot 10^{-3}$ М); при такой концентрации значительная часть субстрата при его гидролизе энтеропептидазой будет находиться в связанном с ферментом состоянии, что и обеспечивает высокую эффективность катализа. В то же время высокое значение k_{cat} дает возможность использовать небольшие концентрации фермента. В настоящее время проводится изучение действия различных реагентов (в том числе ингибиторов) на энтеропептидазу, где в качестве субстрата используется гибридный белок (PrA-P26).

Суммируя полученные результаты, можно заключить, что энтеропептидаза обладает способностью гидролизовать с высокой специфичностью разнообразные

Кинетические параметры гидролиза энтерокиназой различных субстратов

Субстрат	$K_m \cdot 10^4$, М	k_{cat} , мин ⁻¹	$k_{cat}/K_m \cdot 10^{-6}$, М ⁻¹ мин ⁻¹
PgA-P26	1,25	157	1,25
HGly-(Asp) ₄ -Lys-Nfa *	2,0	2000	10,0
Трипсиноген (рН 6,0) [13]	0,17	380	22

* Nfa — β-нафтиламид.

гибридные белки, содержащие линкер -(Asp)₄-Lys-, не только отщепляя от N-концевой части молекулы короткие пептидные фрагменты (показано другими авторами [16, 19]), но и расщепляя полипептидную цепь практически в любом заданном линкером месте. Эффективность расщепления определяется, по-видимому, лишь сродством фермента к линкерному пептиду -(Asp)₄-Lys-, о чем свидетельствуют одинаковые значения K_m для гидролиза синтетического пептида и химерного белка. Высокое значение k_{cat} химерного белка, совпадающее с таковым для трипсиногена (см. табл. 2), позволяет использовать малые концентрации энтеропептидазы. Однако высокое значение K_m этого процесса требует в свою очередь высоких концентраций субстратов (1—10 мг/мл). Отсюда следует, что для эффективного расщепления гибридных белков энтеропептидазой необходимо создание конструкций, синтезирующих химерные белки, которые обладают хорошей растворимостью.

Несмотря на то что высокий уровень синтеза белков и простота их выделения достигается при образовании гибридными белками тел включения, такой способ создания белков-субстратов энтеропептидазы вряд ли найдет широкое применение из-за их низкой растворимости. Из созданных конструкций рекомбинантных генов наиболее подходящей на сегодняшний день является конструкция, продуцирующая гибридный белок, который имеет сигнальную последовательность для секретирования его в межклеточное пространство, а также структуру, позволяющую проводить простую аффинную очистку. В нашем случае оптимальным вариантом является использование в качестве белка-носителя фрагмента белка А [17].

Экспериментальная часть

В работе использовали акриламид, N,N'-метиленбисакриламид, N, N, N', N'-тетраметилэтилендиамин, персульфат аммония, реактив Protein Assay (Bio-Rad, США); ацетонитрил (артикул 30), трис(гидроксиэтил)аминометан (трис) (Merck, США); глицин, мочевины, β-галактозидазу *E. coli*, β-меркаптоэтанол, додецилсульфат натрия (SDS), кумасси G-250, β-нафтиламид глицилтетра-L-аспартил-L-лизина (Seriva, ФРГ); дитиотреит, кумасси R-250 (Sigma, США); трифтороуксусную кислоту (Pierce, США); белковые стандарты для электрофореза в полиакриламидном геле (Pharmacia, Швеция), иммобилон (Millipore, США); Toyopearl HW-50 и DEAF-Toyopearl 650M (TOSOH, Япония). Все остальные реагенты — отечественного производства квалификации ос.ч. или х.ч. Электрофорез проводили согласно методу Леммли [24] в 15% полиакриламидном геле (толщина пластин 1 мм, концентрирующий гель 4%). Электроблоттинг белковых зон, полученных в результате электрофореза, проводили 10 ч (40 В) в 0,025 М трис-глициновом буфере (рН 8,5), содержащем 10% MeOH, 0,1% SDS, 0,5 мМ дитиотреит, на аппаратуре фирмы Bio-Rad (США) с переносом на иммобилон для секвенирования N-концевых аминокислотных последовательностей.

Очистка рекомбинантной β -галактозидазы из 3,5 г влажных клеток *E. coli*

Стадии очистки	Белок, мг	Уд. акт. β -галактозидазы, ед/мг	Выход по белку, %
Разрушение клеток ультразвуком	642	57 257	100
Центрифугирование (20000 об/мин, су-пернатант)	410	66 565	63
Фракционирование (37,5% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, осадок)	237	103 377	37
Гель-фильтрация на сефадексе G-25	207	106 695	30
Хроматография на DEAE-Тоуорепарл 656 M	168	150 000	26
Гель-фильтрация на сефадексе G-25 в H_2O , лиофилизация	127	0	20

Аминокислотные последовательности анализировали на газофазном секвенаторе Applied Biosystems 477A. Аминокислотный состав пептидов определяли на аминокислотном анализаторе Durrum D-500.

Определение белка осуществляли по методу Бредфорд [25].

Химерные белки расщепляли энтеропептидазой в 0,01 М трис-НСI-буфере, рН 8, при 37° С.

При определении кинетических параметров гидролиза субстратов (K_m и k_{cat}) расчет проводили по методу двойных обратных величин в координатах Лайнуивера—Берка.

Очистку химерных белков GAL-ENK и GAL-VIP с помощью ионообменной хроматографии на DEAE-Тоуорепарл 650M проводили согласно методике, приведенной нами в работе [20]. После разрушения клеток ультразвуком оба белка находились в растворимой фракции, составляя 30% суммарного белка клетки, и сохраняли β -галактозидазную активность (табл. 3). Выход химерного белка — 50 мг на 1 л культуры, или 30 мг на 1 г влажных клеток *E. coli*. После обработки этих химерных белков энтеропептидазой реакционную смесь анализировали методом ВЭЖХ на колонке Ultrasphere ODS (0,46 × 25 см, хроматограф Beckman) в градиенте ацетонитрила [20] (рис. 1).

Идентичность продуктов гидролиза и целевых пептидов — [Leu]энкефалина и фрагмента 17—28 пептида VIP — доказана аминокислотным анализом, а также (в случае энкефалина) радиорецепторным анализом на синаптических мембранах мозга крыс [26].

При инкубации соответствующих контрольных систем, содержащих либо химерные белки без энтеропептидазы, либо обычную β -галактозидазу с энтеропептидазой, расщепления этих белков обнаружено не было.

Концентрация химерных белков обычно составляла $(1-2) \cdot 10^{-5}$ М, а фермента — $(3,5-6,5) \cdot 10^{-8}$ М. Инкубация химерного белка GAL-FNK при соотношении фермент — субстрат 1 : 200—1 : 300 приводила к 70—80% выходу энкефалина от теоретического за 30 мин. Выход из 1 л культуры — 210—230 мкг, или из 1 г влажных клеток 120—130 мкг энкефалина. Теоретический выход составляет 10 мкг энкефалина из 2 мг химерного белка.

Клонирование гена и синтез соответствующего химерного белка TNF-P осуществлены в лаборатории химии гена ИБХ им. М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН. Носитель — фактор некроза опухоли, а целевые пептиды — два аналога вещества P, один из которых является соответствующей кислотой,

а не амидом, другой содержит дополнительный остаток глицина на С-конце. Химерный белок после разрушения клеток находился в телах включения, являясь практически единственным их компонентом. После фракционного растворения тел включения 4 и 8 М мочевиной, содержащей 50 мМ дитиотреит, проводили хроматографию на колонке с Toyopearl HW-50 в 8 М мочеvine. Анализ химерного белка с помощью SDS-электрофореза после диализа в 0,01 М трис-HCl-буфере при pH 8,0 подтвердил его гомогенность. Концентрация белка не превышала $1 \cdot 10^{-5}$ М (0,2 мг/мл). Инкубация с $5 \cdot 10^{-8}$ — 10^{-7} М энтеропептидазой в течение 20 ч при 37° С приводила, по данным электрофореза, к образованию нужных продуктов в аналитических количествах.

Химерный белок IFN-HAV. Конструкция гена была создана на основе вектора pBR 322, содержащего фрагмент ДНК γ -интерферона человека (предоставлена лабораторией Е. Д. Свердлова). После расщепления рестриктазой *Asu*II провели лигирование фрагмента *Bam*HI/*Eco*RI из плазмиды pEK1. В полученную таким образом плазмиду по сайту *Kpn*I был клонирован фрагмент кДНК вируса гепатита А, кодирующий структурные белки области *Vp*I вируса. Этот фрагмент был получен рестрикцией плазмиды pBR 322, содержащей искомым фрагмент кДНК, по сайтам *Bgl*II/*Pvu*II. Правильность ориентации фрагментов и рамки считывания в каждом случае проверялась рестриктным анализом и секвенированием по методу Максама—Гилберта.

Химерный белок, находящийся в телах включения, после разрушения клеток ультразвуком растворяли в 8 М мочеvine. Аффинная хроматография на протеин-А-сефарозе с ковалентно связанными антителами к антигенной детерминанте вируса гепатита привела к получению гомогенного белка в концентрации $(2-4) \cdot 10^{-6}$ М (0,1—0,2 мг/мл). Расщепление энтеропептидазой проводили в указанных выше условиях. Образование целевого продукта подтверждали электрофорезом и секвенированием после переноса на иммобилон.

С тем же белком-носителем получен химерный белок IFN-HIV, содержащий в качестве целевого продукта модифицированную протеиназу вируса иммунодефицита человека. Данные о клонировании соответствующего гена, экспрессии и очистке будут опубликованы отдельно. Белок также находился в телах включения. Его инкубация в концентрации $1 \cdot 10^{-5}$ М с энтеропептидазой в указанных выше условиях приводила к образованию модифицированной протеиназы HIV I, что было подтверждено секвенированием N-концевой последовательности после переноса на иммобилон.

Экспрессия и очистка химерного белка PrA-P26 приведены в работе [22]. Расщепление химерного белка энтеропептидазой проводили в течение 4—20 ч при концентрации субстрата $(1-3) \cdot 10^{-4}$ М и фермента 13—30 нМ. За ходом реакции следили с помощью электрофореза и высокоэффективной гель-фильтрации на колонке Ultropac TSK G 2000 SW (7,5 × 600 мм) (рис. 1 и 2). Секвенирование N-концевой последовательности после переноса белка на иммобилон свидетельствовало об идентичности структуры экспрессированного P26 природному кальцийсвязывающему белку (за исключением N-концевого аланина, дополнительный кодон которого был введен сразу после энтеропептидазного линкера для сохранения рамки считывания). Экспрессированный P26 после расщепления был очищен аффинной хроматографией на той же колонке с IgG-сефарозой. Выход чистого P26 — 25 мг из 1 л супернатанта. Экспрессированный P26 обладает свойствами, аналогичными нативному реверерину [22], и получен в препаративных количествах.

Получение и расщепление химерного белка PrA-GKN описано в работе [23].

Константы гидролиза химерного белка PrA-P26 энтеропептидазой определяли при инкубировании 0,13—0,026 мМ субстрата с 14 нМ ферментом в общем объеме инкубационной смеси 100—250 мкл. В определенные интервалы времени, соответствующие не более 20% превращения субстрата, отбирали аликвоты 15—20 мкл инкубационной смеси и анализировали на колонке Ultropac TSK G 2000 SW

(7,5 × 600 мм; LKB, Швеция), хроматограф Beckman с детектором 165 Variable Wavelength и интегратором Chromatorac C-R3A (Shimadzu, Япония). Хроматографию проводили в 25 мМ Na-фосфатном буфере (pH 6,57) с 0,2 М NaCl со скоростью 0,5 мл/мин. Начальную скорость гидролиза субстрата определяли по уменьшению площади его пика.

Для определения констант гидролиза Gly-(Asp)₄Lys-Nfa энтеропептидазой следили за возрастанием интенсивности флуоресценции при образовании β-нафтола на флуориметре Hitachi MPF-4 при длине волны возбуждения 330 нм и эмиссии 410 нм. Реакцию проводили в 0,05 М вероналовом буфере (pH 8,4) с 20 мМ CaCl₂ при 37° С. В кювету, содержащую 1 мл раствора субстрата, вносили 10 мкл раствора энтерокиназы. Концентрация субстрата составляла 0,1—1 мМ, фермента — 1,4 нМ. Полученные значения каталитических констант (табл. 2) практически совпадают с соответствующими кинетическими параметрами гидролиза этого же субстрата энтеропептидазой человека [27].

Авторы выражают благодарность И. В. Назимову за анализ аминокислотных последовательностей и Ю. В. Смирнову за определение аминокислотного состава пептидов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Itakura K., Hirose T., Crea R., Riggs A. D., Heineker H. L., Bolivar F., Boyer H. W.//Science. 1977. V. 198. P. 1056—1063.
2. Franken P. A., Van den Berg L., Huang J., Gunyazla P., Lugtigheid R. B., Verheij H. M.//Eur. J. Biochem. 1992. V. 203. P. 89—98.
3. Dykes C. W., Bookless A. B., Coomber B. A., Noble S. A., Humber D. C., Hobden A. N.//Eur. J. Biochem. 1988. V. 174. P. 411—416.
4. Waldenstrom M., Holmgren E., Attersand A., Kulderen C., Lovénadler B., Pohl G.//Gene. 1991. V. 99. P. 243—248.
5. Nilsson B., Holmgren E., Josephson S., Gatenbeck S., Philipson L., Uhlen M.//Nucl. Acids Res. 1985. V. 13. P. 1151—1162.
6. Tajima M., Iida T., Kamimura T., Yanagi M., Fukushima S. J.//Ferment. Bioeng. 1991. V. 72. P. 362—367.
7. He M., Jin L., Austen B.//J. Protein Chem. 1993. V. 12. P. 1—5.
8. Menendez-Arias L., Young M., Oroszlan S.//J. Biol. Chem. 1992. V. 267. P. 24134—24139.
9. Evans D. B., Tarpley W. C., Sharma S. K.//Protein Expr. Purif. 1991. V. 2. P. 205—213.
10. Pohlner J., Kramer J., Meyer T. F.//Gene. 1993. V. 130. P. 121—126.
11. Ishizaki J., Tamaki M., Shin M., Tsuzuki H., Yoshikawa K., Teraoka H.//Appl. Microbiol. Biotechnol. 1992. V. 36. P. 483—486.
12. Kunitz M.//J. Gen. Physiol. 1939. V. 22. P. 429—446.
13. Liepnieks J. J., Light A.//J. Biol. Chem. 1979. V. 254. P. 1677—1683.
14. Fonseca P., Light A.//J. Biol. Chem. 1983. V. 258. P. 14516—14520.
15. Light A., Savoitri H. S., Liepnieks J. J.//Anal. Biochem. 1980. V. 106. P. 199—206.
16. Hopp Th. P., Prickett K. S., Price V. L., Libby R. T., March C. J., Cerretti D. P., Urdal D. L., Conlon P. J.//Bio/Technology. 1988. V. 6. P. 1204—1210.
17. Ефимов В. А., Бурякова А. А., Полушин Н. Н., Пашикова И. Н., Дмитракова Е. В., Чахмахчева О. Г.//Биооргани. химия. 1989. Т. 15. С. 499—507.
18. Belagaje R. M., Mayne N. G., Van Frank R. M., Rutter W. J.//DNA. 1984. V. 3. P. 120.
19. Su X., Prestwood A. K., McGraw R. A.//Biotechniques. 1992. V. 13. P. 756—762.
20. Добрынин В. Н., Болдырева Е. Ф., Филиппов С. А., Чувпило С. А., Коробка В. Г., Воротынцева Т. И., Бессмертная Л. Я., Михайлова А. Г., Америк А. Ю., Антонов В. К.//Биооргани. химия. 1987. Т. 13. С. 119—121.
21. Mittraki A., King J.//Bio/Technology. 1989. V. 7. P. 690—697.
22. Кутузов М. А., Шмуклер Б. Е., Суслов О. Н., Заргаров А. А., Абдулаев Н. Г.//Биооргани. химия. 1992. Т. 18. С. 119—121.

23. Гаїдаров И. О., Суслов О. Н., Овчинникова Т. В., Абдулаев Н. Г.//Биоорган. химия. 1994. Т. 20. С. 367—381.
24. Laemmli U. K.//Nature. 1970. V. 227. P. 680—685.
25. Bradford M.//Anal. Biochem. 1976. V. 72. P. 248—254.
26. Пороженко Н. В., Зайцев С. Е., Варфоломеев С. Д.//Биоорган. химия. 1984. Т. 10. С. 902—911.
27. Grant D. A. W., Hermon-Taylor J.//Biochim. et biophys. acta. 1979. V. 567. P. 207—215.

Поступила в редакцию
22.III.1994

A. G. Mikhailova, E. D. Shibanova, L. D. Rumsh, V. K. Antonov

ENTEROPEPTIDASE AND ITS APPLICATION FOR CLEAVAGE OF CHIMERIC PROTEINS

*M. M. Shemyakin and Yu. A. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry,
Russian Academy of Sciences, Moscow, 117871, ul. Miklukho-Maklaya, 10/16,
Russia*

Key words: enteropeptidase (enterokinase), recombinant proteins, specificity, proteolysis.

Cleavage of different chimeric proteins after specific linker (Asp)₄Lys by the highly purified enteropeptidase was investigated, proteins being were accumulated in inclusion bodies or secreted from the cell. Kinetic constants for enzymatic hydrolysis were obtained, indicating that the substrate binding depended mainly on the affinity to the linker peptide (Asp)₄Lys. Conditions for the efficient cleavage of recombinant proteins with enteropeptidase are formulated.