



УДК 57.037:577.152.351*52.01

ПОЛУЧЕНИЕ СПЕЦИФИЧЕСКИХ СУБСТРАТОВ ГЛИКОПЕПТИДАМИДАЗЫ А И КИНЕТИКА ИХ ФЕРМЕНТАТИВНОГО ГИДРОЛИЗА

© 1995 г. Е. Н. Калиберда*, Л. Д. Румш

*Институт биоорганической химии им. И.И. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
Москва, 117871, В-437, ул. Миклухо-Маклая, 16/10*

Поступила в редакцию 22.12.93 г. После доработки 04.06.94 г.

Гликопептиды были получены последовательными пепсиновым (гликононапептид) и трипсиновым (гликогексапептид) гидролизами овальбумина. Описана методика (ВЭЖХ) определения активности гликопептидамидазы А с использованием флуоресцентно меченных (Dns) гликопептидов. Определены кинетические константы гидролиза специфических субстратов гликопептидамидазой А. Показано, что предпочтительным субстратом гликопептидамидазы А является гликогексапептид Dns-Tyr(Dns)-Asn(CHO)-Leu-Thr-Ser-Val.

Ключевые слова: гликононапептид, гликогексапептид из овальбумина, кинетика гидролиза, гликопептидамидаза А.

Гликопептидамидаза А из сладкого миндаля (КФ 3.5.1.52, пептид-N⁴-(N-ацетил-β-D-глюкозаминил)-L-аспарагин-амидаза) была выделена и охарактеризована в нашей лаборатории ранее [1]. Важным моментом ее тестирования и изучения кинетических параметров является получение ее специфических субстратов. В качестве источника потенциальных субстратов этого фермента был выбран овальбумин, который имеет одну N-олигосахаридную цепь. Сначала овальбумин подвергли обработке пепсином [2], затем полученный продукт гидролиза (рис. 1, отмеченный пик) расщепляли трипсином [3]. Необходимо отметить, что после гидролиза как пепсином, так и трипсином (см. ниже) первичное фракционирование реакционной смеси осуществляли на биогеле Р-4 для отделения протеиназ, балластных пептидов и солей перед ВЭЖХ. При этом фракции, содержащие гликопептиды, обнаруживали по их углеводной детерминанте модифицированным фенолсернокислотным методом [4]. Дальнейшее разделение гидролизатов на индивидуальные гликопептиды проводили методом ВЭЖХ в обращенной фазе (рис. 1 и 2, "Экспериментальная часть").

При разделении углеводсодержащей фракции пепсинового гидролизата овальбумина методом ВЭЖХ в обращенной фазе гликопептид элюируется в пике 1 (рис. 1) с временем удержания около 18 мин. Секвенированием определена структура пеп-

тидной части, Glu-Glu-Lys-Tyr-Xaa-Leu-Thr-Ser-Val, соответствующая аминокислотной последовательности 290 - 298 в овальбумине: Glu-Glu-Lys-Tyr-Asn(CHO)-Leu-Thr-Ser-Val [5]. Следовательно, неидентифицированная при секвенировании аминокислота является аспарагином, к которому присоединены гликаны. Гликопептид содержит Man и GlcNAc в соотношении 5.7 : 1.8, что позволяет отнести его углеводную цепь к олигоманнозидному типу [5]. Мы не изучали углеводную последовательность N-гликана, поскольку тестирование активности гликопептидамидазы А проходило по другому продукту ферментативной реакции – пептиду.

На следующем этапе работы часть выделенного гликононапептида (ГНП) обрабатывали трипсином с тем, чтобы отщепить N-концевой трипептид [3]. После гель-фильтрации на биогеле Р-4 трипсинового гидролизата углеводсодержащую фракцию хроматографировали на Ultrasphere C₈ и получили гликогексапептид (рис. 2, заштрихован) с аминокислотной последовательностью Tyr-Xaa-Leu-Thr-Ser-Val.

Для повышения чувствительности метода тестирования ферментативной активности выделенные гликопептиды (ГНП и ГГП) обрабатывали дансилхлоридом (Dns), чтобы ввести флуоресцентную метку. Необходимо подчеркнуть, что дансильрование проводили с использованием литий-карбонатного буфера (рН 9.5) и отношения ацетонитрил – вода 1 : 2 (обратного классическому), поскольку, как следует из работы [6], в этих условиях подавляются разложение глико-Dns-пептидов

Сокращения: CHO – олигосахаридная часть; Dns – 5-диметиламинонафталин-1-сульфонат; АМК – 7-амино-4-метилкумарин; ГНП – гликононапептид, ГГП – гликогексапептид.

*Автор для переписки.

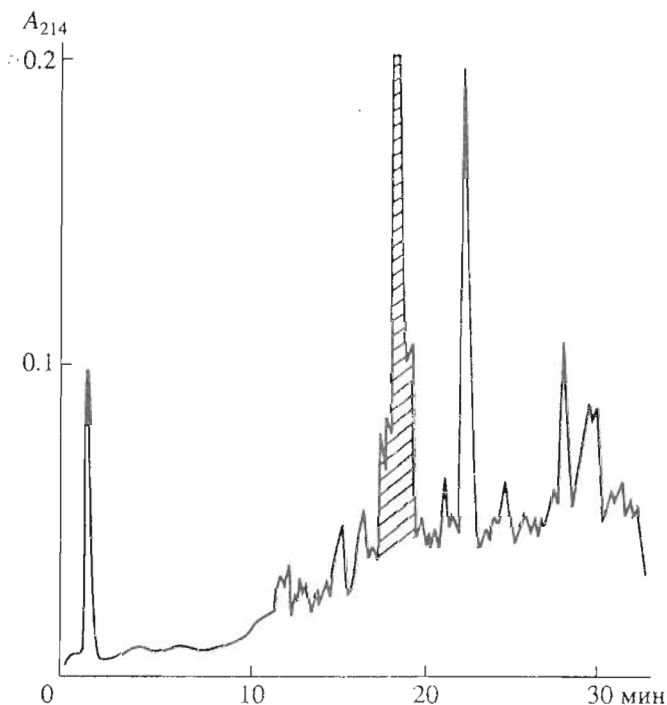


Рис. 1. Разделение продуктов пепсинового гидролиза овальбумина методом ВЭЖХ на колонке Ultrasphere C₈ (4.6 × 250 мм) в условиях градиента концентрации 0.1% TFA, 0% CH₃CN – 0.05% TFA, 75% CH₃CN (40 мин, скорость элюции 1.5 мл/мин). Отмечена выделяемая фракция.

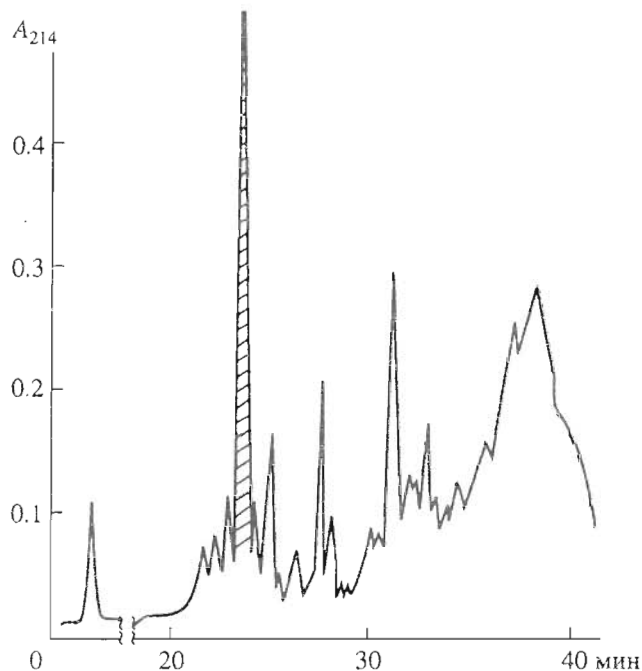


Рис. 2. Разделение продуктов трипсинового гидролиза гликопептида овальбумина (рис. 1, выделенный пик) методом ВЭЖХ на колонке Ultrasphere C₈ (4.6 × 250 мм) в 10 мМ фосфатном буфере (pH 2.0) в градиенте концентрации ацетонитрила 0–70% (40 мин, скорость элюции 1.5 мл/мин). Отмечена выделяемая фракция.

и образование Dns-NH₂. Поскольку 100-кратный избыток Dns-Cl не является обязательным условием полноты дансирования [6], был использован 5–10-кратный мольный избыток реагента в расчете на гликопептид. В указанных условиях дансирования ГНП содержал три дансильные группы: Dns-Glu-Glu-Lys(Dns)-Tyr(Dns)-Asn(CHO)-Leu-Thr-Ser-Val, а ГГП – две дансильные группы: Dns-Tyr(Dns)-Asn(CHO)-Leu-Thr-Ser-Val. После дансирования гликопептиды хорошо сохраняются в сухом виде в темном стекле при 4°C. Оценку количества полученных дансированных гликопептидов проводили методом ВЭЖХ в обращенной фазе сравнением с определенным количеством Dns₂-Lys для Dns₃-ГНП и с Dns₂-Tyr для Dns₂-ГГП. Подбор указанных дансированных аминокислот, взятых в качестве внутреннего стандарта при анализе ВЭЖХ реакционной смеси, был проведен эмпирически. Для этого мы добивались максимального совпадения количества флуоресценции 5 нмоль дансированного гликопептида, определенного по аминокислотному анализу, с таким же количеством дансированных аминокислот: Dns₂-Tyr, Dns₂-Lys и Dns-Glu. Соответствующие пары гликопептид–аминокислота отмечены выше.

Для определения ферментативной активности гликопептидамидазы А проводили инкубацию

10 нмоль Dns₃-ГНП с гликопептидамидазой А в течение 2 ч, а затем анализировали продукты реакции ВЭЖХ (рис. 3). Анализ продукта реакции (пик 2, рис. 3) показал отсутствие углеводов, в то же время аминокислотный состав пептида оставался прежним. Dns₃-нонапептид образовался в результате отщепления олигосахарида гликопептидамидазой А, а не был продуктом действия экзогликозидазных или протеолитических ферментов. Аналогично определяли активность фермента с Dns₂-ГГП. Удельная активность фермента составила с Dns₃-ГНП 52, с Dns₂-ГГП 130 нмоль/(мин мг).

При гидролизе обоих субстратов гликопептидамидазой А установили, что оптимальное соотношение E : S равно 1 : 200. При этом ферментативная реакция за 2 ч с Dns₂-ГГП проходила на 90, с Dns₃-ГНП на 60% (рис. 4), несмотря на то что стадия насыщения фермента субстратом в обоих случаях достигается уже через 1 ч. Отмечалось небольшое ингибирование гликопептидамидазы А Dns₃-ГНП: реакция в течение длительного времени инкубации (4–6 ч) проходит только на 60%. Однако при добавлении новой аликвоты такого же субстрата наблюдается его расщепление, что подтверждает сохранение активности гликопептидамидазы А. При уменьшении указанных соотношений (E : S = 1 : 50 (100)) реакция проходила за 2 ч на 50% с Dns₂-ГГП и на 20% с Dns₃-ГНП.

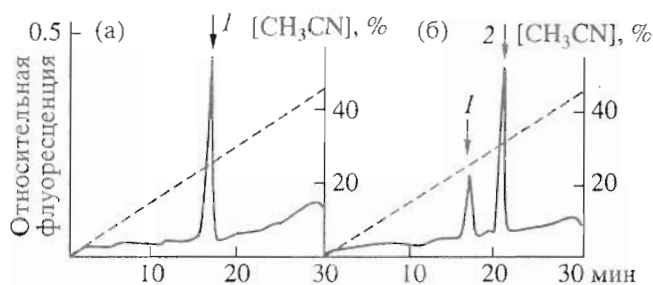


Рис. 3. Анализ методом ВЭЖХ (Ultrasphere C₁₈, 4,6 × × 250 мм) Dns₃-ГМП (а) и продуктов его гидролиза гликопептидамидазой А (б): 1 – Dns₃-ГМП, 2 – Dns₃-НП. Условия: 10% изопропанол–0.1% TFA в градиенте ацетонитрила 0 - 45% (30 мин).

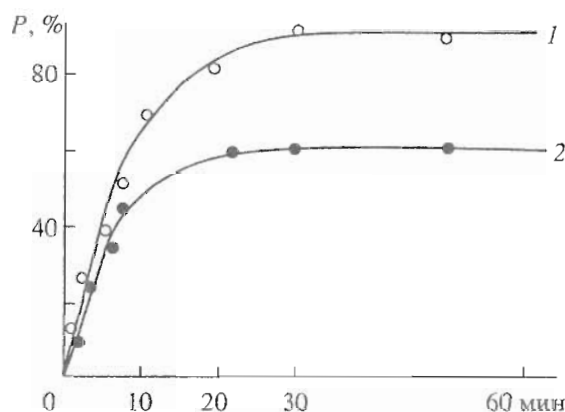


Рис. 4. Кинетика образования продуктов (P) гидролиза гликопептидамидазой А Dns₂-ГМП (1) и Dns₃-ГМП (2).

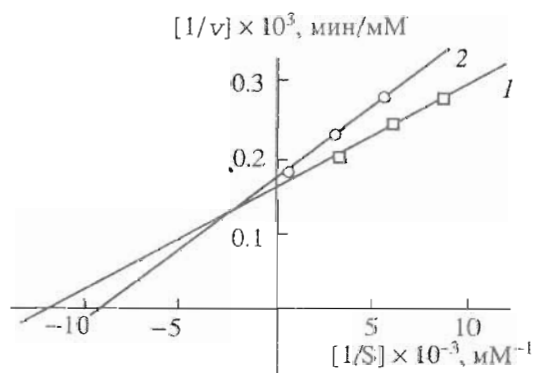


Рис. 5. Определение кинетических констант реакции гликопептидамидазы А с Dns₃-ГМП (1) и Dns₂-ГМП (2) по методу Лайнуивера–Берка.

При определении кинетических параметров гидролиза гликопептидов гликопептидамидазой А концентрации обоих субстратов и фермента изменяли, как указано в таблице. Необходимо также отметить, что при изучении кинетики ферментативного гидролиза субстратов методом ВЭЖХ были изменены условия анализа: градиент ацето-

нитрила 10 - 50% в течение 60 мин. Указанное изменение приводило к улучшению разделения и детекции продуктов ферментативной реакции при низких количествах (1.5 - 2 нмоль) исходного субстрата в пробе. Для указанного диапазона концентраций субстратов зависимость в координатах Лайнуивера–Берка для этого фермента была линейной и представлялось возможным определение K_m и V_{max} (рис. 5). K_m для Dns₃-ГМП (115 мкМ) оказалась несколько большей, чем K_m для Dns₂-ГМП (78 мкМ), что характеризует лучшее связывание гликопептидамидазы А с последним субстратом (см. таблицу). При анализе кинетических данных, полученных в этой работе, можно отметить, что k_{cat} для Dns₂-ГМП в 2 раза больше, чем k_{cat} для Dns₃-ГМП. Такое превышение k_{cat} при меньшей K_m для Dns₂-ГМП дает отношение k_{cat}/K_m выше в 3.4 раза по сравнению с таковым для Dns₃-ГМП, что характеризует большую специфичность фермента к Dns₂-ГМП.

При сравнении полученных нами результатов кинетических параметров ферментативного гидролиза глико-Dns-пептидов с аналогичными данными для радиоактивно меченного глико-(³HDns₂)-октапептида [7] из овальбумина следует отметить совпадение K_m 150 мкМ [7] с соответствующей величиной для Dns₃-ГМП (K_m 115 мкМ). Здесь необходимо оговорить, что приведенные в таблице k_{cat} и V_{max} из статьи [7] были нами рассчитаны из описанных в ней условий ферментативной реакции. Совпадение K_m для глико-(³HDns₂)-октапептида и Dns₃-ГМП подтверждает отсутствие влияния дансильных групп на связывающую способность фермента. Каталитическая константа гликопептидамидазы А в реакции гидролиза глико-Dns₂-октапептида, равная 102 мин⁻¹ [7], превышает наши данные k_{cat} для Dns₂-ГМП (в 12 раз) и для Dns₃-ГМП (в 30 раз, таблица). В работе [7] использовали гликопептид из овальбумина, полученный последовательными расщеплениями бромцианом и трипсином ²⁹³ Tyr-Asn(CHO)-Leu-Thr-Ser-Val-Leu-Hse. N-Гликаны у всех гликопептидов были олигоманнозидного типа. По-видимому, отсутствие дипептида Leu-Hse на С-конце Dns₂-ГМП (293 - 298) существенно для проявления каталитической активности гликопептидамидазы А. Надо отметить, что малочисленность исследований по кинетике гидролиза субстратов гликопептидамидазами и отсутствие соответствующих расчетов осложняют сравнение полученных в этой работе результатов с аналогичными данными других авторов.

На основании полученных данных можно заключить, что из двух исследованных субстратов Dns₂-ГМП более предпочтителен для тестирования гликопептидамидазы в ферментных препаратах и изучения ее каталитических функций.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Пепсиновый гидролиз овальбумина. 1 г овальбумина (23.2 мкмоль) растворяли в 50 мл 0.15 М цитратного буфера, подкисленного HCl (pH 1.4), денатурировали 15 - 20 мин при 82°C и охлаждали при 20°C. Гидролиз пепсином проводили в 70 мл того же буфера в течение 2 сут при 37°C (двукратное добавление фермента до конечной концентрации 7 мкМ с интервалом 24 ч) [2].

Обессоливание и очистку гликопептидов из овальбумина после пепсинового (трипсинового) гидролиза проводили гель-хроматографией на биоэле Р-4 (1.5 × 90 см) в 0.1 М Na-ацетатном буфере (pH 3.5). После ферментативного гидролиза реакционную смесь кипятили 5 - 7 мин, осадок отделяли центрифугированием, супернатант лиофилизовали. Лиофилизированный препарат растворяли в 5 мл буфера, использованного для элюции, и наносили на колонку. Детекцию хроматографируемого вещества проводили при 280 нм. Содержание углеводов во фракциях определяли фенол-сернокислотным методом [4]. Фракции, которые на хроматограмме давали пик при 280 нм и содержали углеводы, лиофилизовали.

Выделение гликоконапептида из гликопептидной фракции пепсинового гидролизата проводили методом ВЭЖХ на Ultrasphere C₈ (4.6 × 250 мм) в условиях градиента концентрации растворителей (рис. 1). Детекцию хроматографируемых веществ осуществляли при 214 нм. Углеводсодержащие фракции (на хроматограмме заштрихован пик с временем удержания 18.52) упаривали под вакуумом и полученный гликопептид секвенировали. Гликоконапептид был выделен в количестве 32 мг, что составило 50.1% в расчете на исходное количество этого гликопептида в 1 г овальбумина.

Трипсиновый гидролиз 15 мг (5.4 мкмоль) гликоконапептида осуществляли в 15 мл 0.04 М трис-HCl-буфера с 1 мМ CaCl₂ при концентрации фермента 3 мкМ [3] в течение 20 ч при 37°C.

Гликогексапептид из трипсинового гидролизата после предварительной очистки на биоэле Р-4 (как описано выше для пепсинового гидролизата) выделяли методом ВЭЖХ (рис. 2) на колонке, используемой для выделения ГНП. Детекцию хроматографируемого вещества осуществляли при 214 нм. Собирали фракции, содержащие гликопептид (время удерживания 24.38 мин, рис. 2). Получили 10 мг гликогексапептида, что составило 38% в расчете на исходное количество этого гликопептида в 0.5 г овальбумина.

Углеводный состав гликопептидов определяли после кислотного гидролиза 2 н. HCl - 2 н. TFA при 100°C в течение 10 ч с последующим восстановительным аминированием смесью аминотилкумарин-NaBH₃CN [8]. Полученные АМК-моносахариды анализировали методом ВЭЖХ обращенно-фазовой хроматографией на Ultrasphere

Кинетические параметры гликопептидамиидазы А

Субстрат	[S], мМ	K _m , мкМ	V _{max} , мкМ/мин	k _{cat} , мин ⁻¹	[E], мкМ
Dns ₂ -ГПП	0.11 - 0.25	78	6.2	8.6	0.72
Dns ₃ -ГНП	0.33 - 1.1	115	5.9	3.5	1.68
Данные работы [7]*	0.4 - 0.8	15	150	102	1.47

* Субстрат - ³HDns-Tyr(³HDns)-Asn(CHO)-Leu-Thr-Ser-Val-Leu-Hse.

C₁₈ с элюцией 12% ацетонитрилом в 0.1% TFA. Детекцию хроматографируемых веществ проводили на проточном флуориметре с фильтрами λ_{возб} 305 - 395 нм, λ_{исп} 430 - 470 нм. Получили Man-GlcNAc = 5.7 : 1.8 [8].

Дансирование гликоконапептида (ГНП) и гликогексапептида (ГПП). Флуоресцентное мечение 15 мг ГНП и 10 мг ГПП осуществляли введением дансильной (Dns) группировки по методу [9]. После реакции дансирования проводили обессоливание глико-Dns-пептидов на сефадексе LH-40 (1.5 × 45 см) в 30% ацетонитриле. Процесс разделения наблюдали визуально: желтовато-зеленый элюат, содержащий глико-Dns-пептиды, собирали и лиофилизовали. Затем глико-Dns-пептиды разделяли обращенно-фазовой хроматографией на Zorbax C₁₈ (6.2 × 250 мм) в системе 10% изопропанол-0.1% TFA, в градиенте концентрации ацетонитрила 0 - 40% (60 мин), скорость элюции 2.5 мл/мин. Детекцию осуществляли на проточном флуориметре с фильтрами λ_{возб} 305 - 395 нм и λ_{исп} 510 - 659 нм. В результате получили 12 мг Dns₃-ГНП с временем удерживания 33.45 мин и 7.5 мг Dns₂-ГПП с временем удерживания 43.54 мин.

Аликвоту, содержащую 5 нмоль глико-Dns-пептида (по аминокислотному составу), анализировали методом ВЭЖХ на Ultrasphere C₁₈ (4.6 × 250 мм) в системе 10% изопропанол-0.1% TFA в условиях градиента концентрации ацетонитрила 10 - 50% (60 мин). В данных условиях хроматографии Dns₂-ГПП имел время удерживания 28.1 мин, Dns₃-ГНП - 25.34 мин.

Для оценки количества Dns₂-ГПП в качестве внутреннего стандарта использовали 5 нмоль Dns₂-Tyr, для глико-Dns₃-ГНП - 5 нмоль Dns₂-Lys. Сравнение проводили по площади пиков соответствующих пар веществ, рассчитанных на интеграторе Shimadzu C-R3A. Площадь пика относительной флуоресценции 5 нмоль определенного глико-Dns-пептида (по аминокислотному анализу пептидной части) составляла 90 - 95% площади пика соответствующей ему дансированной аминокислоты.

Активность гликопептидамиидазы определяли при 37°C. В микропробирку помещали 95 мкл Dns₃-ГНП (10 - 15 нмоль) в 0.125 М Na-ацетатного

буфера, pH 5.1, содержащего 2 мМ PMSF, и 5 мкл раствора фермента [1], инкубировали 2 ч, затем упаривали в вакууме, растворяли в 150 мкл смеси метанол–1 М уксусная кислота (4 : 1) и аликвоты (100 мкл) анализировали методом ВЭЖХ (рис. 3). В этих условиях анализа реакционной смеси Dns₃-ГНП имел время удерживания 17.2 мин, а Dns₃-нонапептид – 20.84 мин. За единицу активности фермента принимали такое его количество, которое высвобождает 1 нмоль Dns₃-НП за 1 мин при указанных условиях.

Исследование кинетики ферментативной реакции. Состав проб: 0.125 М Na-ацетат (pH 5.1) с 2 мМ PMSF; концентрация фермента 0.72 - 1.68 мкМ; концентрация субстратов 0.1 - 3.3 мМ; объем пробы 25 мкл, 37°C. Реакционную смесь без субстрата термостатировали 5 мин, затем вносили субстрат. Временные интервалы реакции – 5, 10, 15 мин. Останавливали реакцию замораживанием при –70°C в течение 5 мин. Затем вносили 100 мкл раствора (0.1 М CH₃COOH–CH₃OH, 1 : 4). Аликвоту 100 мкл полученного раствора анализировали на колонке Ultrasphere C₁₈ (4.6 × 250 мм) в условиях, используемых при характеристике глико-Dns-пептидов после дансирования (см. выше) и аналогичной детекции: Dns₂-ГПП имел время удерживания 28.1, а Dns₂-ГП – 33.4 мин; Dns₃-ГНП – 25.24, а Dns₃-НП – 30.73 мин. По площадям пика субстрата и появляющимся пикам продукта мы оценивали расходование субстрата в реакции.

Кинетические параметры гидролиза субстрата рассчитывали методом наименьших квадратов. Ошибка не превышает 15%.

Авторы выражают благодарность Ю.В. Смирнову и В.В. Насонову за выполнение аминокислотного и углеводного анализов соответственно, а также К.С. Рубцову за секвенирование аминокислотной последовательности гликопептида.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (код проекта 93-04-6145).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Калиберда Е.Н., Шемякин В.В., Антонов В.К. // Биоорг. химия. 1990. Т. 16. № 6. С. 751 - 757.
2. Ishihara H., Takahashi N., Ito J., Takeuchi E. // Biochim. et biophys. acta. 1981. V. 669. P. 216 - 221.
3. Worthington: Enzyme and Related Biochemical. 1978. P. 196 - 197.
4. Rao P., Pattabiraman T.N. // Analyt. Biochem. 1989. V. 181. № 1. P. 18 - 22.
5. McReynolds L., O'Maley P.W., Nisbet A.D. et al. // Nature. 1978. V. 279. № 5665. P. 723 - 728.
6. Левина Н.Б., Мурадов Х.Г., Назимов И.В. // Биоорг. химия. 1986. Т. 12. № 2. С. 165 - 170.
7. Tarentino A., Plummer T. // J. Biol. Chem. 1982. V. 257. № 18. P. 10776 - 10780.
8. Хорлин А.Я., Шиян С.Д., Маркин В.А., Насонов В.В., Мирзаянова М.Н. // Биоорг. химия. 1986. Т. 12. № 9. С. 1203 - 1212.
9. Tapuchi Y., Miller N., Karger L. // J. Chromatogr. 1981. V. 205. № 1. P. 325 - 337.

Preparation of Specific Substrates of Glycopeptidamidase A and Kinetics of Their Enzymatic Hydrolysis

E. N. Kaliberda* and L. D. Rumsh

Shemyakyn-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow

Abstract – Glycopeptides were obtained by the pepsin (glycononapeptide) and trypsin (glycohexapeptide) hydrolysis of ovalbumin. A method (HPLC) of the glycopeptidamidase activity determination with a fluorescent-labelled (Dns) glycopeptides is described, and kinetic constants of hydrolysis of specific substrates by glycopeptidamidase A are determined. Dns(O-Dns)Tyr-Asn(CHO)-Leu-Thr-Ser-Val is shown to be a specific substrate of the glycopeptidamidase A.

Key words: glycononapeptide, glycohexapeptide from ovalbumin, kinetic of hydrolysis, glycopeptidamidase A.

* To whom correspondence should be addressed.