



УДК 577.152:543.51

## ПРОТЕИНАЗА ЕСР 32: ХАРАКТЕРИСТИКА ФЕРМЕНТА, ИССЛЕДОВАНИЕ СПЕЦИФИЧНОСТИ

© 1995 г. Г. А. Казанина, Е. П. Миргородская, О. А. Миргородская, С. Ю. Хайтлина

*Институт цитологии РАН, 194064, Санкт-Петербург, Тихорецкий просп., 4*

Поступила в редакцию 14.12.94 г.

С использованием офВЭЖХ и масс-спектрометрии с электрогидродинамическим способом ионизации исследовано действие актиндеградирующей протеиназы ЕСР 32 *E. coli* на С-пептид из рекомбинантного проинсулина человека, инсулин свиньи и мелиттин. Показано, что протеиназа гидролизует только мелиттин с расщеплением связей Ala<sup>15</sup>-Leu<sup>16</sup> или Leu<sup>16</sup>-Ile<sup>17</sup>. ( $K_m$   $2.4 \times 10^{-6}$  М). Изучено влияние рН и состава буфера на скорость ферментативной реакции. рН-Оптimum гидролиза мелиттина ~7. Отмечено ингибирующее действие фосфат-ионов и активирующее действие АТР на ферментативный гидролиз мелиттина. Предложено использовать мелиттин для определения активности протеиназы ЕСР 32.

*Ключевые слова:* протеиназа *E. coli* актиндеградирующая, АТР-стимулируемая протеиназа, мелиттин, масс-спектрометрия.

В работе [1] показано, что бактериальный штамм *E. coli* А2 продуцирует протеиназу ЕСР 32, обладающую способностью к ограниченному протеолизу нативного актина по пептидной связи Gly<sup>42</sup>-Val<sup>43</sup>, локализованной в той части молекулы белка, которая непосредственно вовлечена в контакт между мономерами в полимере актина и участвует во взаимодействии с ДНКазой 1 [2]. Расщепленный протеиназой ЕСР 32 актин, сохраняя нативную структуру [1], качественно изменяет функциональные свойства [3, 4], что делает модифицированный белок уникальной моделью для изучения механизмов полимеризации актина и его взаимодействия с актинсвязывающими белками.

Значимость новой протеиназы для структурных исследований актина стимулировала работы по изучению ее субстратной специфичности [5, 6]. В качестве субстратов был испытан ряд произвольно взятых белков (более 20), включая инактивированную и денатурированную формы актина. Было показано, что в инактивированном актине (нагрев или обработка EDTA) кроме связи Gly<sup>42</sup>-Val<sup>43</sup> гидролизуются также связи Ala<sup>29</sup>-Val<sup>30</sup> и Ser<sup>33</sup>-Ile<sup>34</sup>. Для денатурированной формы актина были обнаружены дополнительные разрывы пептидных связей, образованных карбоксильными группами основных аминокислот. Помимо актина протеиназа ЕСР 32 гидролизует гистоны и гистоноподобный белок бактерий HU [5, 6]. Хотя типы разрываемых связей для гистонов и гисто-

ноподобного белка не были определены, можно полагать, что их гидролиз протеиназой обусловлен повышенным содержанием основных аминокислот.

Выявленная способность к гидролизу различных типов пептидных связей делает актуальным продолжение исследований, направленных на определение специфичности ЕСР 32 протеиназы с использованием модельных субстратов с известной аминокислотной последовательностью. В настоящей работе для этих целей были использованы рекомбинантный С-пептид из проинсулина человека, инсулин свиньи и мелиттин, в которых представлены все возможные типы аминокислот-кислые, основные и алифатические.

Одной из задач работы был также поиск пептидного субстрата, пригодного для тестирования активности протеиназы ЕСР 32 и изучения ее каталитических свойств. Сопоставление свойств фермента в отношении этого субстрата и актина позволило бы разграничить влияние различных факторов как на собственно фермент, так и на актин. Отметим, что нативный актин – сложно организованный белок, свойства которого, включая способность к полимеризации и денатурации, несомненно, зависят от характеристик среды [7].

Для тестирования продуктов гидролиза нами использованы офВЭЖХ и масс-спектрометрия с электрогидродинамическим способом ионизации (ESI MS), эффективное сочетание которых продемонстрировано в работах [8, 9]. Это позволило с помощью масс-спектрометрического анализа как суммарного гидролизата, так и отдельных

Сокращения: TFA – трифторуксусная кислота; офВЭЖХ – обращенно-фазовая ВЭЖХ; Qn – C<sup>α</sup>-амид глутамина.

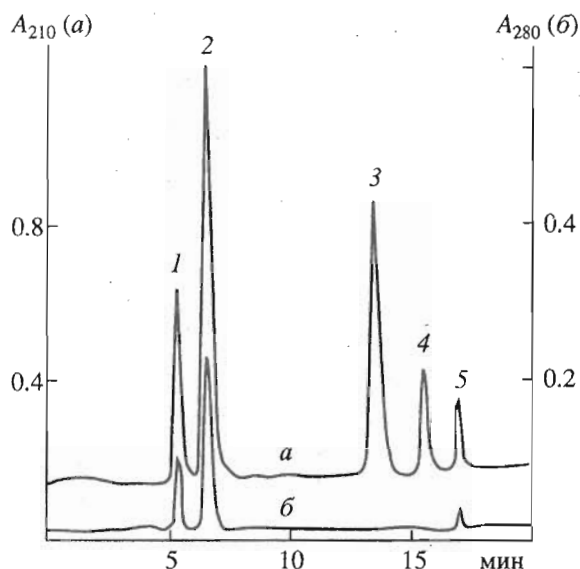
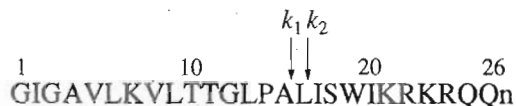


Рис. 1. ВЭЖХ-анализ продуктов 2-часового гидролиза мелиттина протеиназой ЕСР 32. Условия гидролиза: 0.1 М трис-НСI-буфер, рН 7.4; [мелиттин]/[Е<sub>1</sub>] (w/w) = 100 : 1.

хроматографических пиков идентифицировать образующиеся пептиды. Кроме того, по площадям хроматографических пиков с учетом коэффициентов оптического поглощения для идентифицированных пептидов, рассчитанных по аддитивной схеме [10], были оценены концентрации исходного субстрата и продуктов его гидролиза, что позволило количественно оценить скорости протеолиза.

Эксперименты были начаты с изучения действия протеиназы ЕСР 32 на мелиттин



Как видно из рис. 1 и табл. 1, исследуемая протеиназа эффективно гидролизует мелиттин, рас-

щепляя его за 2 ч на четыре фрагмента (1 - 4), два из которых являются триптофансодержащими (пик 5 соответствует исходному мелиттину). Таким образом, при рН 7.4 фермент гидролизует в мелиттине только две пептидные связи, образованные алифатическими аминокислотными остатками: либо Ala<sup>15</sup>-Leu<sup>16</sup> ( $k_1$ ), либо Leu<sup>16</sup>-Ile<sup>17</sup> ( $k_2$ ). При этом не гидролизуются связи, образованные другими алифатическими аминокислотами. Скорость гидролиза связи Ala<sup>15</sup>-Leu<sup>16</sup> приблизительно в 4 раза превышает таковую для Leu<sup>16</sup>-Ile<sup>17</sup>, т.е. отношение "индексов специфичности" ( $k_1/K'_m$ )/( $k_2/K''_m$ ) близко к 4. Идентичные разрывы наблюдаются при снижении рН реакционной среды до 4.5, однако указанное отношение в этих условиях приближается к 1. Можно отметить, что степень очистки протеиназы ЕСР 32 (препараты Е<sub>1</sub> или Е<sub>2</sub>, см. "Экспер. часть") не влияет на характер гидролиза мелиттина. Увеличение времени инкубации обоих препаратов фермента с мелиттином до 22 - 24 ч ведет к образованию новых пептидных фрагментов (рис. 2а, 2б, табл. 2), появление которых вызвано гидролизом связей, образованных карбоксильными группами основных аминокислот: Lys<sup>7</sup>, Arg<sup>22</sup>, Arg<sup>24</sup>. Установлено, что при хранении разбавленных растворов препаратов фермента (0.01 мг белка/мл, 0.02 М трис-НСI-буфер, рН 7.4, 8°C) они по крайней мере в течение 2 нед полностью сохраняют свою актиндеградирующую активность и скорость гидролиза по алифатически аминокислотным остаткам в мелиттине, что указывает на их высокую стабильность. В то же время они в значительной мере теряют способность к последующему гидролизу связей, образованных основными аминокислотами (рис. 2б, табл. 3). Это дает основание предположить, что проявление подобной специфичности скорее всего следует отнести к присутствию в ферментных препаратах примесной протеиназы. Поскольку при выделении фермента для тестирования активности использовался нативный актин, присутствие другой протеиназы

Таблица 1. Масс-спектрометрический анализ хроматографических пиков гидролизата мелиттина (рис. 1)

Номер пика	Масс-спектрометрические данные			M, Да		Продукт (положение в цепи)
	m/z	I, %	z	экспер.	расчет.	
1	448.2	100	+3	1341.4	1341.6	(17 - 26)
	671.6	30	+2			
2	485.8	100	+3	1454.5	1454.8	(16 - 26)
	728.3	10	+2			
3	705.9	100	+2	1409.8	1409.7	(1 - 15)
	1410.8	11	+1			
4	762.4	100	+2	1522.8	1522.9	(1 - 16)
5	712.9	100	+4	2847.7	2846.5	(1 - 26)
	949.9	21	+3			

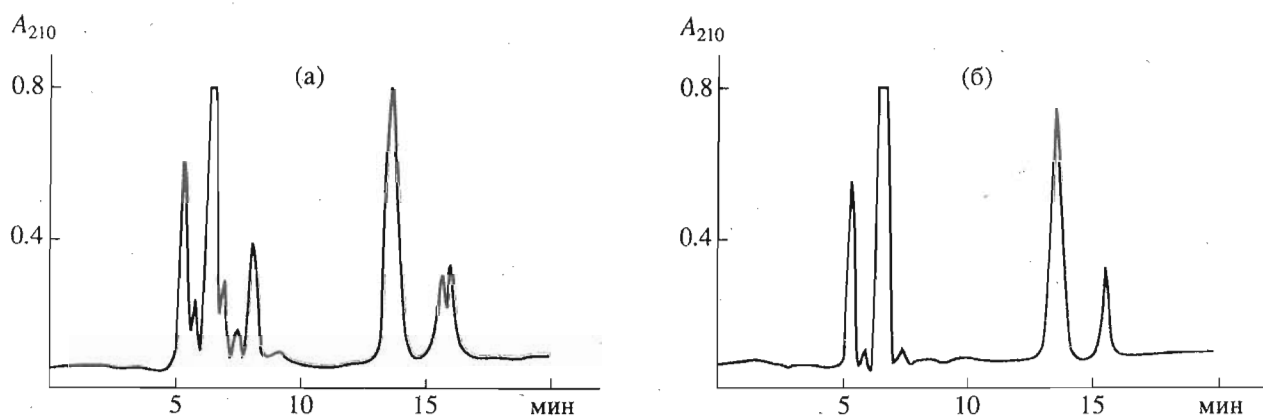


Рис. 2. ВЭЖХ-анализ продуктов 24-часового гидролиза мелиттина препаратами протеиназы ЕСР 32: Е<sub>1</sub> (а) и Е<sub>2</sub>, предварительно инкубированным 2 нед при 8°С (б). Условия гидролиза см. в подписи к рис. 1.

не проявлялось, однако можно полагать, что именно действием примесной протеиназы обусловлено появление дополнительных разрывов при протеолизе денатурированного актина.

Таким образом, полученные результаты позволяют считать, что гидролиз мелиттина протеиназой ЕСР 32 (так же, как было ранее показано для актина [1]) носит характер ограниченного протеолиза.

В то же время протеолиз мелиттина, по-видимому, не определяется структурными особенностями строения пептида, поскольку идентичные разрывы наблюдались при гидролизе протеиназой ЕСР 32 его триптического фрагмента VLTTGLPALISWIK (данные не приводятся).

Оценка действия протеиназы ЕСР 32 на два других пептидных субстрата показала, что в от-

личие от мелиттина ни С-пептид, ни инсулин (при тех же условиях и при более длительном времени инкубации) не гидролизуются ферментом (данные не приводятся).

Необходимо отметить, что оба негидролизуемых субстрата содержат пептидные связи (Ala-Val), аналогичные связям, расщепляемым протеиназой ЕСР 32 в мелиттине. Наличие не расщепляемых этим ферментом Ala-Val-связей отмечается и в других испытанных ранее в качестве субстратов нативных и денатурированных белках [5, 6]. Возможно, что этот факт связан с вторичной специфичностью изучаемого фермента. Однако для понимания причин, обуславливающих выявленную специфичность и ограниченный характер протеолиза в отношении актина и мелиттина, нужны дополнительные исследования, включающие поиск новых субстратов, в том числе

Таблица 2. Масс-спектрометрический анализ гидролизата мелиттина (рис. 2а)

номер иона	Масс-спектрометрические данные			M, Да		Продукт (положение в цепи)
	m/z	I, %	z	экспер.	расчет.	
1	336.7	2	+2	671.4	671.9	(8 - 16)
2	401.8	4	+2	801.6	802.0	(17 - 22)
3	458.3	3	+2	915.6	915.1	(16 - 22)
4	486.1	100	+3	1455.3	1454.8	(16 - 26)
5	488.0	15	+2	974.0	973.2	(18 - 24)
6	544.5	11	+2	1087.0	1086.4	(17 - 24)
7	657.5	8	+1	656.5	656.8	(1 - 7)
8	705.7	97	+2	1409.4	1409.7	(1 - 15)
9	716.6*	5	+2	1432.3	1409.7	(1 - 15)
10	725.1**	2	+2	1448.2	1409.7	(1 - 15)
11	762.2	23	+2	1522.4	1522.9	(1 - 16)
12	771.8	3	+1	770.8	770.9	(8 - 15)

\* Квазимолекулярный ион [M + H + Na]<sup>2+</sup>.

\*\* Квазимолекулярный ион [M + H + K]<sup>2+</sup>.



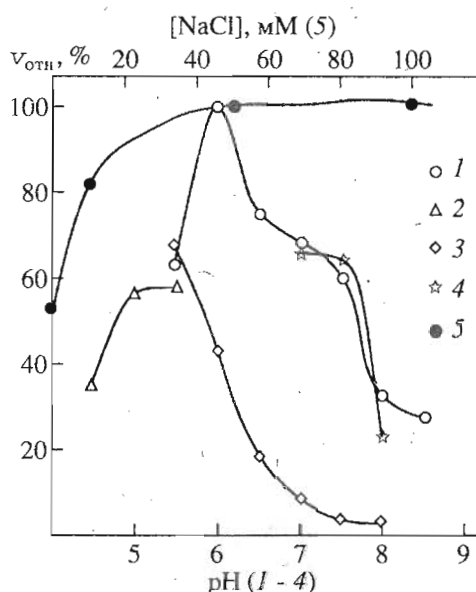


Рис. 3. Зависимость скорости гидролиза мелиттина протеиназой ЕСР 32 от рН (1 - 4) и от величины ионной силы (5). Буферные растворы: 0.1 М трис-малеатный (1); 0.1 М натрий-ацетатный (2); 0.1 М натрий-фосфатный (3); 0.1 М трис-НСI (4); 0.01 М трис-НСI, рН 7.4 (5).  $v_{отн} = v/V \times 100\%$ .

“физиологических”, а также изучение структуры самого фермента.

С использованием мелиттина в качестве субстрата были исследованы некоторые свойства протеиназы ЕСР 32. Скорость протеолиза контролировали по образованию триптофансодержащих продуктов.

Как было показано ранее [5], рН-оптимум актиндеградирующей активности протеиназы ЕСР 32 находится при 7.5. При этом следует отметить, что проверить активность фермента при

значениях рН ниже 6.5 с использованием актина как субстрата не удается из-за его способности к полимеризации в этой области рН.

Протеиназа ЕСР 32 активна в отношении мелиттина в широком диапазоне рН: от 4.5 до 8.0 (рис. 3, 1 - 4), однако существенное значение для проявления активности имеет природа буферного раствора. Поскольку по данным ингибиторного анализа протеиназа ЕСР 32 отнесена к металлоферментам [5, 6], можно полагать, что на активность фермента влияет способность анионов, входящих в состав буферных смесей, связывать ионы металлов.

Заметное влияние на скорость гидролиза мелиттина оказывает величина ионной силы реакционной среды (рис. 3, 5). Увеличение концентрации NaCl в 0.01 М трис-НСI-буфере (рН 7.4) приводит к возрастанию активности, которая не превышает при этом активности, наблюдаемой в 0.1 М трис-НСI-буфере (рис. 3, 1).

В связи с этим дальнейшее исследование гидролиза мелиттина проводили в 0.1 М трис-НСI-буфере при рН 7.4, выбранном ранее для измерения актиндеградирующей активности.

Соотношение начальных скоростей образования продуктов гидролиза мелиттина протеиназой ЕСР 32 (рис. 1) не зависит от начальной концентрации субстрата и близко к 4. Вместе с тем из зависимости начальной скорости гидролиза мелиттина от его концентрации, представленной на рис. 4 в координатах Лайнуивера-Берка, следует, что кинетика реакции подчиняется уравнению Михаэлиса-Ментен. Рассчитанное на основании данных по суммарной скорости гидролиза мелиттина значение  $K_{m(эфф)}$  соответствует  $2.4 \times 10^{-6}$  М. Постоянство соотношения скоростей гидролиза по обеим расщепляемым связям позволяет отнести найденное значение  $K_m$  к гидролизу каждой из них.

Таблица 3. Масс-спектрометрический анализ гидролизата мелиттина (рис. 26)

номер иона	Масс-спектрометрические данные			М, Да		Продукт (положение в цепи)
	$m/z$	$I, \%$	$z$	экспер.	расчет.	
1	336.7	2	+2	671.4	671.9	(8 - 16)
2	448.1	15	+3	1341.3	1341.6	(17 - 26)
3	486.1	90	+3	1455.3	1454.8	(16 - 26)
4	657.5	8	+1	656.5	656.8	(1 - 7)
5	672.1	3	+2	1342.1	1341.6	(17 - 26)
6	705.7	100	+2	1409.4	1409.7	(1 - 15)
7	716.6*	10	+2	1432.3	1409.7	(1 - 15)
8	725.1**	8	+2	1448.2	1409.7	(1 - 15)
9	762.2	26	+2	1522.4	1522.9	(1 - 16)
10	771.8	1	+1	770.8	770.9	(8 - 15)

\* Квазимолекулярный ион  $[M + H + Na]^{2+}$ .

\*\* Квазимолекулярный ион  $[M + H + K]^{2+}$ .

При концентрации мелиттина  $3.4 \times 10^{-5}$  М, значительно превышающей величину  $K_m$ , была изучена зависимость скорости гидролиза от содержания фермента в реакционной смеси. Показано, что в выбранных условиях скорость постоянна во времени (вплоть до 80 - 90% степени гидролиза субстрата) и линейно зависит от концентрации фермента. Таким образом, по величине скорости гидролиза мелиттина можно судить об активности протеиназы ЕСР 32.

Отметим, что гидролиз актина протеиназой ЕСР 32 осуществлялся в присутствии 0.5 мМ АТР для поддержания актина в нативном состоянии [5]. Известно [11], что для ряда протеиназ как животного, так и микробного происхождения АТР может играть роль активатора протеолиза. Для некоторых протеиназ присутствие АТР в реакционной среде необходимо – например, для протеиназы La из *E. coli* [12]. При этом для нее показано, что при эквимоллярных концентрациях субстрата и АТР (3 мМ) одновременно с гидролизом каждой пептидной связи осуществляется гидролиз АТР до АДФ. Хотя гидролиз мелиттина ферментом ЕСР 32 не требует присутствия АТР, его введение в реакционную среду, как показали результаты экспериментов (табл. 4), приводит к ускорению реакции. Максимальное увеличение скорости гидролиза наблюдается при концентрациях АТР около 10 мМ. При этом специальными опытами показано, что при эквимоллярных концентрациях мелиттина и АТР (3 мМ) гидролиз мелиттина не сопровождается изменением концентрации активатора и появлением АДФ (по крайней мере с сопоставимыми скоростями). Аналогичные результаты были получены при тех же условиях и при увеличении концентрации АТР в реакционной среде. Таким образом, протеиназу ЕСР 32 следует отнести к АТР-стимулируемым ферментам.

Результаты проведенной работы позволяют предложить мелиттин в качестве субстрата для количественной оценки содержания протеиназы ЕСР 32 в препаратах фермента в процессе его выделения и для выявления присутствия протеиназ с иной специфичностью.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали инсулин свиньи, мелиттин, трис, АТР, АДФ, малеиновую кислоту (Serva); С-пептид рекомбинантного проинсулина человека, полученный в ИБХ РАН. Остальные реактивы отечественного производства имели квалификацию х. ч.

В исследованиях использовали два препарата протеиназы ЕСР 32, различающиеся по степени очистки:  $E_1$  – препарат, полученный по методу, описанному в работе [6], и содержащий, по данным электрофореза, не менее 85% активного

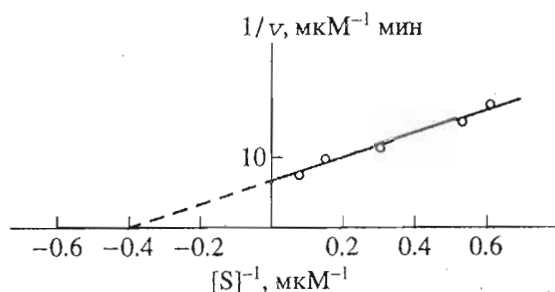


Рис. 4. Зависимость скорости ферментативной реакции от концентрации мелиттина в координатах Лайнувера-Берка.

белка;  $E_2$  – более гетерогенный препарат, полученный по методу [5].

**Гидролиз мелиттина.** Инкубировали раствор пептида в соответствующем буфере с аликвотой фермента (общий объем 20 мкл) при комнатной температуре. Через определенные промежутки времени из реакционной смеси отбирали пробы объемом 3 мкл, вносили для остановки реакции в 20 мкл 5%  $CH_3COOH$  и полученные подкисленные растворы использовали для ВЭЖХ. В опытах с АТР раствор натриевой соли нуклеотида перед добавлением в реакционную смесь титровали до pH 7.4 гидроокисью натрия.

**Фракционирование гидролизатов** осуществляли на хроматографе "Милихром" на колонках ( $2 \times 62$  мм), упакованных Nucleosil 5  $C_{18}$  (Macherey Nagel). Элюцию вели в линейном градиенте (v/v) ацетонитрила (Merck) от 5 до 45% в 0.05% TFA. Детекцию проводили при 210 и 280 нм. Степень гидролиза мелиттина и баланс между убылью мелиттина и накоплением продуктов контролировали по поглощению при 280 нм, принимая молярные коэффициенты оптического поглощения ( $\epsilon$ ) для них равными величине  $\epsilon$  триптофана –  $5600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  [13].

**Контроль за содержанием АТР и АДФ** в реакционных смесях осуществляли методом ион-парной

Таблица 4. Влияние АТР на скорость гидролиза мелиттина протеиназой ЕСР 32\*

[АТР], мМ	Относительная скорость гидролиза, $v_{\text{АТР}}/v_0$
0.0	1.0
0.7	1.2
1.0	1.4
3.0	1.8
4.0	2.0
5.0	2.3
8.0	2.8
15.0	2.0

\* Условия определения: 0.1 М трис-НСl-буфер (pH 7.4); 10 мМ  $MgCl_2$ ;  $[S] 3.4 \times 10^{-5}$  М;  $[E_2] 10$  мкг/мл.

хроматографии на приборе и колонках, описанных выше для фракционирования пептидных гидролизатов; элюенты вели в присутствии 25 мМ фосфата трет-бутиламина в линейном градиенте (v/v) ацетонитрила от 9 до 28% в водном растворе 25 мМ  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ . Детекцию проводили при 260 нм. При расчете концентраций АТР и АДР их молярные коэффициенты поглощения принимали равными  $15400 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  [13].

Масс-спектры снимали на времяпролетном масс-спектрометре с электрогидродинамическим источником ионов [9]. Для анализа суммарных гидролизатов реакционные смеси предварительно обессоливали с помощью офВЭЖХ, используя в качестве элюента 45% ацетонитрил в 0.05 % ТФА. Аликвоту, собранную вблизи вершины хроматографического пика, разбавляли ацетонитрилом в соотношении 1 : 1 и вводили в масс-спектрометр со скоростью 2 мкл/мин. Время одного эксперимента составляло 30 с.

Авторы выражают благодарность А.В. Морозовой, В.В. Матвееву (Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург) за предоставленные образцы ферментных препаратов протеиназы ЕСР 32, А.И. Мирошникову (ИБХ РАН, Москва) за любезно предоставленный образец С-пептида, В.И. Козловскому (филиал Института энергетических проблем химической физики РАН, пос. Черноголовка Московской обл.) за помощь при снятии масс-спектров.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант 94-04-13371, руководитель – д-р хим. наук О.А. Миргородская).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Khaitlina S.Yu., Collins J.H., Kuznetsova I.M., Pershina V.P., Synakevich I.G., Turoverov K.K., Usmanova A.M.* // FEBS Lett. 1991. V. 279. P. 49 - 51.
2. *Holmes K.C., Popp D., Gebhard W., Kabsch W.* // Nature. 1990. V. 347. P. 44 - 49.
3. *Khaitlina S.Yu., Smirnova T.D., Usmanova A.M.* // FEBS Lett. 1988. V. 228. P. 172 - 174.
4. *Khaitlina S.Yu., Moraczewska J., Strzelecka-Golaszewska H.* // Eur. J. Biochem. 1993. V. 218. P. 911 - 920.
5. *Усманова А.М., Хайтлина С.Ю.* // Биохимия. 1989. Т. 54. С. 1308 - 1314.
6. *Matveyev V.V., Usmanova A.M., Morosova A.B., Khaitlina S.Yu.* // Biochim. and Biophys. Acta (submitted for publication).
7. *Hamly B.D., Barden Y.A., Miki M., Remedios C.G.* // BioEssays. 1987. V. 4. P. 124 - 128.
8. *Mirgorodskaya O.A., Shevchenko A.A.* // FEBS Lett. 1992. V. 307. P. 263 - 266.
9. *Mirgorodskaya O.A., Shevchenko A.A., Dodonov A.F., Chernushevich I.V., Miroshnikov A.I.* // Anal. Chem. 1994. V. 66. P. 99 - 107.
10. *Yang C.-Y., Pownall H.J., Gotto A.M.* // Anal. Biochem. 1985. V. 145. P. 67 - 72.
11. *Goldberg A.L.* // Eur. J. Biochem. 1992. V. 203. P. 9 - 23.
12. *Larimore F.S., Waxman L., Goldberg A.L.* // J. Biol. Chem. 1982. V. 257. P. 4187 - 4195.
13. *Досон Р., Эллиот Д., Эллиот У., Джонс К.* Справочник биохимика. М.: Мир, 1991.

## Proteinase ECP 32: Properties and Specificity

G. A. Kazanina, E. P. Mirgorodskaya, O. A. Mirgorodskaya, and S. Yu. Khaitlina

*Institute of Cytology, Russian Academy of Sciences, Tikhoretskii pr. 4, St. Petersburg, 194064 Russia*

**Abstract** – Hydrolysis of the C-peptide from recombinant human proinsulin, porcine insulin, and melittin by the *E. coli* actin-degrading proteinase ECP 32 was studied by reverse phase high performance liquid chromatography and mass spectrometry with electrospray ion source. Proteinase ECP 32 hydrolyzed only melittin at the Ala<sup>15</sup>-Leu<sup>16</sup> or Leu<sup>16</sup>-Ile<sup>17</sup> bonds ( $K_M = 2.4 \times 10^{-6} \text{ M}$ ). The effects of pH and buffer composition on the rate of enzymatic hydrolysis were studied. The pH optimum of melittin hydrolysis was 7. Phosphates inhibited, whereas ATP stimulated the hydrolysis of melittin. Melittin was suggested as a substrate for determining the activity of proteinase ECP 32.

**Key words:** actin-degrading proteinase from *E. coli*, ATP-stimulated proteinase, melittin, mass-spectrometry.