



УДК 547.963.3:577.113.6

СТРУКТУРНЫЕ ФАКТОРЫ, ОБЕСПЕЧИВАЮЩИЕ ВЫСОКУЮ СПЕЦИФИЧНОСТЬ ЭНТЕРОПЕПТИДАЗЫ

© 1998 г. А. Г. Михайлова[#], Л. Д. РумшИнститут биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
117871, Москва, ГСП-7, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

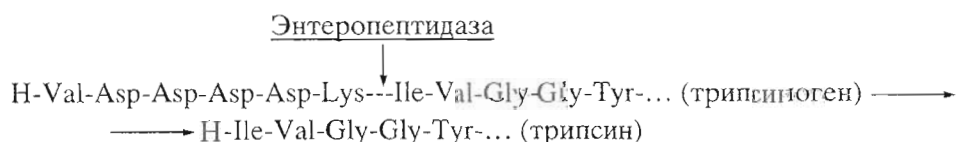
Поступила в редакцию 31.07.97 г. Принята к печати 22.12.97 г.

Исследовано влияние модификации структуры энтеропептидазы на ее специфичность. Показано, что изменение уникальной специфичности происходит в результате автолиза, вызываемого потерей ферментом ионов кальция. Определены места расщепления энтеропептидазы в процессе автолиза. Показано, что конечным продуктом является укороченная форма фермента, состоящая из С-концевого фрагмента тяжелой цепи (466–800) и неизменной легкой цепи. Определены кинетические параметры гидролиза обеими формами энтеропептидазы трипсиногена, химерного белка и пептидного субстрата. Найдены условия, позволяющие регулировать переход фермента из нативной формы в укороченную. Высказана гипотеза об автоактивационном характере процессинга проэнтеропептидазы.

Ключевые слова: энтеропептидаза (энтерокиназа), процессинг, специфичность, химерные белки, автолиз, ингибиторы.

Малоизученная проблема тонкой регуляции действия ферментов с помощью вторичных взаимодействий приобретает особое значение в связи с важной ролью высокоспецифических протеиназ в организме. В настоящей работе сделана попытка (на примере энтеропептидазы) выяснить особенности возникновения, а затем постепенной утраты ферментом высокой специфичности при изменениях его молекулы, как происходящих *in vivo*, так и вызванных искусственно.

Энтеропептидаза (энтерокиназа) (КФ 3.4.21.9) – высокоспецифическая протеиназа процессинга – находится в начале каскада реакций активации ферментов пищеварения [1]. Первой реакцией этого каскада является превращение трипсиногена в трипсин. При активации трипсиногена энтеропептидаза проявляет свои уникальные свойства, катализируя с высокой эффективностью гидролиз полипептидной цепи после N-концевой последовательности тетрааспартил-лизин (схема).



Последовательность Asp-Asp-Asp-Asp-Lys консервативна и обнаружена только в N-концевых активационных пептидах различных трипсиногенов [2].

Нами был разработан метод получения препаративных количеств высокоочищенной энтеропептидазы быка. Активность полученных препаратов на порядок превышает активность известных по литературе, в частности очищенных по методу Лайта [3]. Эти разработки позволили нам

впервые успешно использовать энтеропептидазу для расщепления разнообразных химерных белков, содержащих последовательность тетрааспартил-лизин в произвольном месте полипептидной цепи [4, 5].

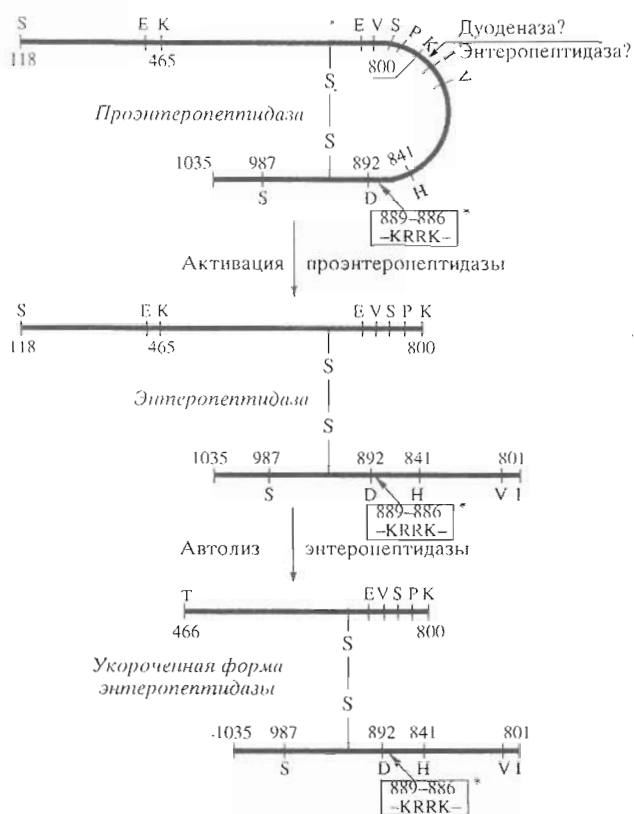
Один из таких химерных белков, содержащий в качестве носителя модифицированный белок А, а в качестве целевого продукта – рековерин (P1A-(Asp)₄Lys-P26), оказался хорошим субстратом [5], что позволило применить его для изучения ферментативной активности энтеропептидазы. За гидролизом удобно следить с помощью высокоэффективной гель-фильтрации.

[#]Автор для переписки.

Следует отметить, что ранее из-за отсутствия достаточно большого числа разнообразных субстратов фермента исследование кинетики его действия было сильно затруднено. Активность энтеропептидазы определяли по скорости активации ею трипсиногена, причем для уменьшения риска автоактивации трипсином (происходящей при pH 8) эту реакцию обычно проводили не при оптимальных значениях pH (7–8), а при pH 5–6 [3–6]. Использование химерных белков, содержащих последовательность $(\text{Asp})_4\text{Lys}$, позволило значительно расширить экспериментальную базу для изучения свойств этого высокоспецифического фермента и впервые определить каталитические константы реакции гидролиза химерного белка энтеропептидазой. Таким образом, был исследован систематический ряд субстратов: трипсиноген – природный субстрат, химерные белки, содержащие линкерную последовательность в различных местах химерной молекулы, и β -нафтиламид пептида $(\text{Asp})_4\text{Lys}$ [5]. В данной работе нам впервые удалось определить кинетические параметры активации трипсиногена не только при pH 5.0, но и в оптимуме pH (8.0) для более корректного сравнения параметров гидролиза различных субстратов (табл. 1).

Как видно из приведенных в табл. 1 данных, константы Михаэлиса для химерного белка и пептидного субстрата близки и выше на два порядка, чем эта величина для трипсиногена. На основании полученных результатов можно сделать вывод, что пептидные и белковые субстраты связываются с ферментом за счет линкерной $(\text{Asp-Asp-Asp-Asp-Lys})$ последовательности. Существенно более эффективный гидролиз природного субстрата – трипсиногена свидетельствует о значительном вкладе в продуктивное связывание и других участков, как субстрата, так и фермента.

Молекула энтеропептидазы содержит 35% углеводных остатков и состоит из двух цепей – тяжелой и легкой, соединенных дисульфидной связью [3, 6, 7] (рис. 1). Полная аминокислотная последовательность проэнтерокиназы была определена по кДНК для быка [7], свиньи [8], человека [9] и крысы [10]. В ходе изучения посттрансляционного процессинга энтеропептидазы быка нами было впервые проведено N-концевое секвенирование (15 аминокислотных остатков) тяжелой цепи этого фермента. Обнаружено, что началом тяжелой цепи активного фермента является серин-118 предшественника*. Ранее отщепление последовательности 1–117 от проэнтеропептидазы при процессинге было обнаружено лишь для фермента свиньи [8]. Во всех остальных случаях



*Участок связывания специфической последовательности (–DDDD–) субстрата

Рис. 1. Схема строения проэнтеропептидазы, ее активации (образование зрелого фермента) и автолиза энтеропептидазы (образование укороченной формы фермента).

остается неизвестным истинное начало тяжелой цепи зрелого активного фермента.

Легкая цепь является трипсиноподобным сериновым ферментом и содержит весь набор аминокислотных остатков (рис. 1), необходимых для создания как каталитического центра (Ser987,

Таблица 1. Кинетические параметры гидролиза энтеропептидазой различных субстратов

Субстрат	pH	$K_m \times 10^4, M$	$k_{cat}, \text{мин}^{-1}$	$k_{cat}/K_m \times 10^{-6}, M^{-1} \text{мин}^{-1}$
Gly-(Asp) ₄ Lys-Nfa*	8.4**	2.0	1000	5.0
PrA-(Asp) ₄ Lys-P26	8.0	1.25	157	1.26
Трипсиноген	8.0	0.024	700	290
	5.0	0.018	435	240
	5.6 [3]	0.17	380	22

* Nfa – нафтиламид.

** Уточненные данные по сравнению с [5].

*Замолдчикова Т.С., Воротынцева Т.И., Михайлова А.Г. Неопубликованные результаты.

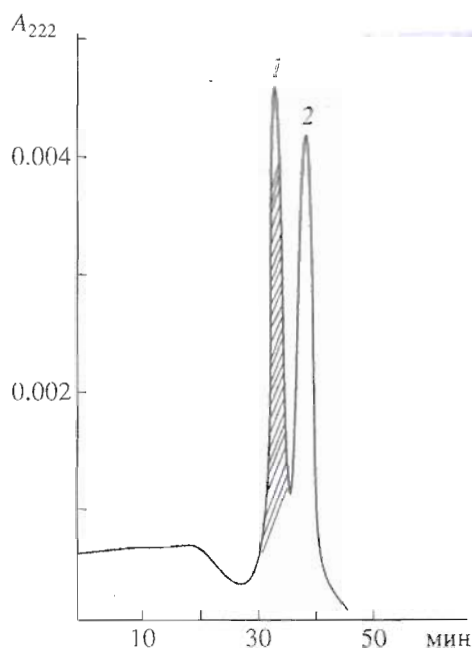


Рис. 2. Высокоэффективная гель-фильтрация бескальциевого образца энтеропептидазы после длительного хранения при -20°C : 1 – полноразмерный фермент, 2 – укороченная форма. Колонка Ultrorask TSK G 4000 SW (7.5×600 мм; ЛКВ, Швеция); 25 мМ Na-фосфатный буфер (pH 6.57), 0.2 М NaCl; скорость элюции 0.5 мл/мин.

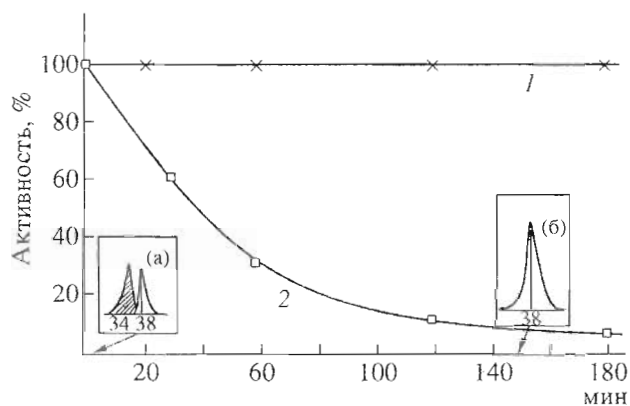


Рис. 3. Изменение активности энтеропептидазы по отношению к различным субстратам после обработки ее EDTA. Субстраты: химерный белок (PrAP26) и пептид (1) и трипсиноген (2). Во врезках приведены результаты высокоэффективной гель-фильтрации энтеропептидазы в условиях рис. 2 без предынкубации с EDTA (а) и через 150 мин инкубации с EDTA (б); заштрихован пик, соответствующий нативной энтеропептидазе.

His841, Asp892), так и участка для связывания линкерной последовательности субстрата (Lys-Arg-Arg-Lys, 886–889) [7]. Однако легкая цепь, полученная в индивидуальном виде путем частичного восстановления и алкилирования дисуль-

фидных связей целого фермента, при сохранении специфичности энтерокиназы, по своим свойствам все же значительно отличается от нативного фермента по отношению к некоторым ингибиторам и скорости активации трипсиногена [6].

Кроме того, недавно в культурах различных клеток (*E. coli*, дрожжи и клетки млекопитающих) была экспрессирована кДНК, кодирующая одну каталитическую цепь энтеропептидазы быка [11–13]. Секретируемый белок обладает энтеропептидазной активностью и по своим свойствам близок к изолированной легкой цепи энтеропептидазы, полученной Лайтом [6]. Во всех случаях при сохранении специфичности фермента и эффективности по отношению к низкомолекулярным и химерным субстратам легкая цепь значительно утрачивает активность (вплоть до нескольких процентов) в отношении трипсиногена по сравнению с нативным ферментом.

Таким образом, можно сделать вывод, что наличие активного центра фермента, а также участка, связывающего линкерную последовательность, оказывается недостаточным для полного проявления природных свойств энтеропептидазы. Для эффективного гидролиза трипсиногена необходимо наличие тяжелой цепи, в то время как пептидные и искусственно созданные белковые субстраты связываются с ферментом лишь за счет последовательности тетрааспартил-лизин, что, по-видимому, происходит только в области каталитической (легкой) цепи.

Какова же роль тяжелой цепи энтеропептидазы? Существует мнение, что она служит лишь мембранным якорем [3, 11]. Однако необычная структура этой субъединицы (наличие доменов, гомологичных различным рецепторам, белкам системы комплемента, металлоферментам, липопротеинам) свидетельствует о ее более важной роли, чем просто мембранный якорь [7].

Ответ на вопрос о роли тяжелой цепи энтеропептидазы может, по нашему мнению, быть отчасти получен в результате проведенной нами работы*. Было обнаружено, что в очищенных препаратах энтеропептидазы при длительном хранении (несколько месяцев) наряду с нативной формой фермента появляется вторая, обладающая меньшей подвижностью при высокоэффективной гель-фильтрации (рис. 2). Измерение протеолитической активности показало, что эта модифицированная энтерокиназа обладает всего несколькими процентами исходной активности по отношению к трипсиногену, но в то же время полностью сохраняется активность к химерным белкам и низкомолекулярному субстрату, а так-

*Обсуждаемый ниже эксперимент будет опубликован позднее.

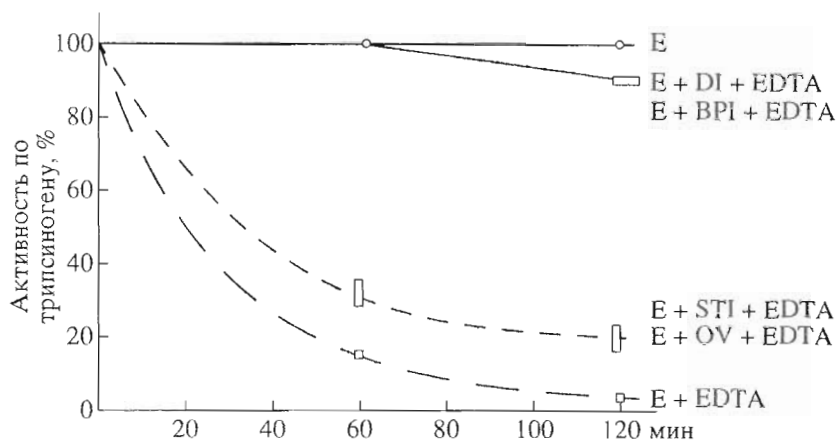


Рис. 4. Изменение активности энтеропептидазы в присутствии EDTA (1×10^{-3} М) и различных ингибиторов в 0.01 М трис-НСl, рН 8.0, при 20°C. E – энтеропептидаза (1×10^{-7} М), BPI – бычий протеиназный ингибитор (2×10^{-6} М), DI – ингибитор энтеропептидазы из дуоденума быка (2×10^{-6} М), OV – овомукоид (5×10^{-6} М), STI – соевый ингибитор трипсина (5×10^{-6} М). Контроль – инкубация E без EDTA и ингибиторов.

же число активных центров фермента (определено титрованием 4-метил-1-умбеллиферил-*n*-гуанидинобензоатом по [3]). Увеличение времени удерживания этого белка при гель-фильтрации (рис. 2) указывает на кажущееся уменьшение молекулярной массы по сравнению с нативным белком.

Далее было обнаружено, что такой переход значительно ускоряется (до нескольких часов) в присутствии комплексона EDTA (рис. 3), но не фенантролина. Полученные результаты позволяют предположить, что причиной такого феномена является потеря белком ионов кальция. Процесс происходит при рН 8 и останавливается добавлением ионов кальция и магния. Важная роль кальция была подтверждена нами проведением выделения и очистки энтеропептидазы с самой первой стадии в присутствии ионов кальция (в отличие от ранее известных методик). В этом случае нами была получена лишь одна высокомолекулярная форма фермента, которая не переходила в другую форму даже при длительной инкубации с EDTA. При этом наблюдается полное сохранение активности по трипсиногену и отсутствие низкомолекулярной формы фермента. Мы полагаем, что различия в величинах кинетических констант гидролиза второго порядка для трипсиногена (рН ~ 5) между нашими и литературными данными (табл. 1) обусловлены тем, что в получаемых ранее препаратах энтеропептидазы содержалась примесь второй, малоактивной по трипсиногену, формы. На рис. 3 показана зависимость активности фермента по отношению к трем различным субстратам от времени его прединкубации с EDTA, а также гель-фильтрационные хроматограммы фермента в начальный момент времени и через 150 мин инкубации с EDTA.

В настоящее время нами найдены условия, позволяющие регулировать процесс перехода энтеропептидазы во вторую форму добавлением различных ингибиторов (рис. 4). В присутствии основного панкреатического ингибитора быка (BPI) и выделенного нами нового ингибитора энтеропептидазы (DI) [14] при добавлении EDTA полностью сохраняется активность фермента при активации трипсиногена (рис. 4) и не обнаруживается перехода ко второй форме. Кроме того, даже в присутствии таких ингибиторов трипсина (не действующих на энтеропептидазу), как соевый ингибитор (STI), а также овомукоид (OV) (рис. 4), этот процесс несколько замедляется. Таким образом, можно сделать вполне обоснованное предположение, что наблюдаемый процесс – следствие автолиза, в результате которого образуется вторая форма фермента, являющаяся переходной от нативной двухцепочечной структуры к изолированной каталитической цепи и состоящая из части тяжелой цепи, которая связана дисульфидным мостиком с каталитической (легкой) цепью. Эта низкомолекулярная форма фермента не делает различия между природным субстратом – трипсиногеном, химерными белками и пептидным субстратом, расщепляя их практически с одинаковой скоростью.

Следует отметить, что, как правило, удаление ионов кальция из белков, обычно содержащих его, делает их структуру более развернутой, снижая тем самым стабильность по отношению к различным денатурирующим агентам [15]. Более жесткая и компактная структура кальцийнасыщенных белков способствует их защите от автолиза. Примером такого фермента может являться трипсин, связывающий один ион кальция на молекулу белка [16]. Сам кальций в трипсиновом катализе участия не принимает, однако эффектив-

Таблица 2. Нетипичные аминокислотные последовательности, расщепляемые в белках энтеропептидазой

№	Название белка	Расщепляемая пептидная связь	Ссылка
1	АСТН 1-24	-EHFR---W-	[18]
2	Холецистокинин 33-ССК и 39-ССК	-DPSHR---ISDR--D-	[19]
3	Прококоназа	-DDGGK---I-	[19]
4	Белок А в составе химерного белка	-NEEQR---N-	*

* Липкин А.В., Михайлова А.Г. Неопубликованные результаты.

но препятствует автолизу. В трипсиногене имеется еще один кальцийсвязывающий центр, расположенный в N-концевом активационном гексапептиде. При этом процесс активации трипсиногена с образованием активного фермента происходит лишь в присутствии ионов кальция [17].

Следующей задачей была локализация места расщепления тяжелой цепи энтеропептидазы. Следует заметить, что тяжелая цепь не содержит специфической последовательности для атаки энтеропептидазой [7]. Очевидно, имеет место частичная потеря специфичности фермента после удаления ионов кальция. После электрофореза в ПААГ в восстанавливающих условиях и последующего электроблоттинга фрагментов тяжелой цепи на иммобилон было проведено N-концевое секвенирование продуктов автолиза. Если при инкубации энтеропептидазы с EDTA при низких концентрациях фермента был обнаружен всего один продукт автолиза (рис. 2 и 3), то при повторении этих экспериментов с белком в 20–30-кратных концентрациях оказалось (гель-электрофорез в ПААГ), что кроме фрагмента, соответствующего примерно половине тяжелой цепи, присутствует кластер более коротких фрагментов. Секвенирование высокомолекулярной белковой полосы позволило локализовать место расщепления тяжелой цепи – по пептидной связи, образованной карбоксильной группой остатка лизина-465. При этом в положении 464 находится остаток глутаминовой кислоты [7]. Таким образом, обнаруженная нами вторая форма энтеропептидазы содержит связанную дисульфидной связью с легкой цепью C-концевую половину тяжелой цепи, начинающуюся с треонина-466 (рис. 1). Секвенирование более коротких фрагментов показало, что они начинаются с серина-118 и, скорее всего, являются продуктами автолиза N-концевой половины тяжелой цепи по карбоксильным группам остатков лизина-360 и -384 и аргинина-422, которым так же, как и лизину-465, предшествуют остатки глутаминовой кислоты [7].

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 (наши данные и [13]). Доступность соответствующих сайтов для гидролиза определяется укладкой белковой глобулы. Вероятно, обнаруженный нами автолиз становится возможным из-за разрыхления белковой глобулы после удаления из нее ионов кальция.

Поиск в структуре тяжелой цепи энтеропептидазы [7] последовательностей, содержащих остатки лизина или аргинина и в любом из четырех предшествующих положений – аспарагиновой или глутаминовой кислоты, показывает, что основная часть подобных последовательностей находится в ее N-концевой половине. Один из этих фрагментов (199–240) является богатым цистеином доменом, гомологичным различным белкам системы комплемента и рецепторам липопротеинов низкой плотности. Семь цистеиновых остатков расположены в этой области. Такой же богатый цистеинами домен расположен в C-концевой половине тяжелой цепи: фрагмент 659–800 содержит 10 таких остатков; из них Cys788 участвует в образовании дисульфидной связи с Cys912 легкой цепи. 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. Средняя часть тяжелой цепи (359–465), наиболее подверженная автолизу, содержит всего три остатка цистеина.

Следует отметить, что в литературе также имеются сведения о расщеплении энтеропептидазой в некоторых случаях подобных нетипичных последовательностей (табл. 2).

Вышеизложенное позволяет заключить, что энтеропептидаза в отдельных случаях может расщеплять пептидные связи после положительно заряженных аминокислотных остатков (лизин, аргинин) в случаях нахождения в любом из четырех предшествующих положений остатков отрицательно заряженных аминокислот (аспарагиновая или глутаминовая).

В связи с этим наибольший интерес представляет последовательность в области аминокислотных остатков 796–802 EVSPK↓IV молекулы проэнтеропептидазы (рис. 1). Это место является сайтом разделения тяжелой и легкой цепи при активации профермента. Анализ полученных нами данных и приведенных в литературе (см. табл. 2) позволяет выдвинуть предположение об автоактивации проэнтеропептидазы, которая сопровождается расщеплением пептидной связи между остатками лизина-800 и изолейцина-801. Другим кандидатом на участие в активации проэнтеропептидазы является дуоденаза [20]. Такое предположение было сделано на основании исследова-

ния специфичности дуоденазы при гидролизе ряда пептидных субстратов.

Таким образом, нами исследован процесс потери энтеропептидазой ее уникальной специфичности. Показано, что этот процесс – следствие автолиза, вызываемого потерей ферментом ионов кальция. В результате автолиза образуется укороченная форма фермента, которая полностью сохраняет активность в отношении гидролиза пептидного субстрата и химерных белков. Однако скорость активации трипсиногена таким модифицированным ферментом уменьшается на два порядка. Сделано предположение о механизме активации проэнтеропептидазы.

В настоящее время нами проводятся эксперименты по сравнению энзиматических свойств нативного фермента, его формы, укороченной путем автолиза, и изолированной легкой цепи. Предполагается, что таким образом может быть выяснена роль тяжелой цепи в обеспечении высокой специфичности и эффективности энтеропептидазного катализа.

Авторы приносят благодарность Н.А. Потапенко и Ю.Ф. Леоновой за анализ аминокислотных последовательностей.

Настоящая работа выполнена при поддержке грантов № 96-04-48765 РФФИ и 03.0003Н-335 ГНТПР “Новейшие методы биоинженерии”.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kunitz M. // *J. Gen. Physiol.* 1939. V. 22. P. 429–446.
2. Guy O., Bartelt D.C., Amic J., Colomb E., Figarella C. // *FEBS Lett.* 1976. V. 62. P. 150–153.
3. Liepnieks J.J., Light A. // *J. Biol. Chem.* 1979. V. 254. P. 1677–1683.
4. Добрынин В.Н., Болдырева Е.Ф., Филиппов С.А., Чувило С.А., Коробко В.Г., Воротынцева Т.И., Михайлова А.Г., Бессмертная Л.Я., Америк А.Ю., Антонов В.К. // *Биоорганическая химия.* 1987. Т. 13. С. 119–121.
5. Михайлова А.Г., Шибанова Е.Д., Румш Л.Д., Антонов В.К. // *Биоорганическая химия.* 1994. Т. 20. С. 883–893.
6. Light A., Fonseca P. // *J. Biol. Chem.* 1984. V. 259. P. 13195–13198.
7. Kitamoto Y., Yuan X., Wu Q., McCourt D.W., Sadler J.E. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1994. V. 91. P. 7588–7592.
8. Matsushima M., Ichinose M., Yahagi N., Kakei N., Tsukada S., Miki K., Kurokawa K., Tashiro K., Shiokawa K., Shinomiya K., Umeiyama H., Inoue H., Takahashi T., Takahashi K. // *J. Biol. Chem.* 1994. V. 269. P. 19976–19982.
9. Kitamoto Y., Veile R.A., Donis-Keller H., Sadler J.E. // *Biochemistry.* 1995. V. 34. P. 4562–4568.
10. Yahagi N., Ichinose M., Matsushima M., Matsubara Y., Miki K., Kurokawa K., Fukamachi H., Tashiro K., Shiokawa K., Kageyama T., Takahashi T., Inoue H., Takahashi K. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1996. V. 219. P. 806–812.
11. La Vallie E.R., Rehemtulla A., Racie L.A., DiBlasio E.A., Ferenz C., Grant K.L., Light A., McCoy J.M. // *J. Biol. Chem.* 1993. V. 268. P. 23311–23316.
12. Collins-Racie L.A., McColgan J.M., Grant K.L., DiBlasio-Smith E.A., McCoy J.M., LaVallie E.R. // *Bio/Technology.* 1995. V. 13. P. 982–987.
13. Voza L.A., Wittwer L., Higgins D.R., Purcell T.J., Bergseid M., Collins-Racie L.A., LaVallie E.R., Hoeffler J.P. // *Bio/Technology.* 1996. V. 14. P. 77–81.
14. Михайлова А.Г., Евтюкова Н.Г., Румш Л.Д. // IV Симпозиум “Химия протеолитических ферментов”. Тезисы докладов и стендовых сообщений. М., 1997. С. 83.
15. Пермяков Е.А. Кальцийсвязывающие белки. М.: Наука, 1993. С. 15–27.
16. Epstein M., Levitzki A., Reuben J. // *Biochemistry.* 1974. V. 13. P. 1777–1782.
17. Delaage M., Abita J.P., Lazdunski M. // *Eur. J. Biochem.* 1986. V. 5. P. 285–293.
18. Uegaki K., Nemoto N., Shimizu M., Wada T., Kyogoku Y., Kobayashi Y. // *FEBS Lett.* 1996. V. 379. P. 47–50.
19. Mutt V., Tatemoto K., Carlquist M., Light A. // *Biosci. Rep.* 1981. V. 1. P. 651–659.
20. Морозов И.А., Воротынцева Т.И., Замолодчикова Т.С. // *Физиол. журн. им. И.М. Сеченова.* 1996. Т. 82. С. 114–120.

Structural Factors Providing for the High Specificity of Enteropeptidase

A. G. Mikhailova and L. D. Rumsh

*Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,
ul. Miklukho-Maklaya 16/10, GSP-7 Moscow, 117871 Russia*

The effects of structural modification upon the specificity of enteropeptidase were studied. A variation in the unique specificity of the enzyme was shown to be the result of an autolysis caused by the enzyme's loss of calcium ions. The cleavage sites of the autolysis were determined. A truncated enzyme containing the C-terminal fragment of its heavy chain (466–800 residues) and the intact light chain were shown to be the products of autolysis. The kinetic parameters of the hydrolysis of trypsinogen, a recombinant protein, and a peptide substrate with both forms of enteropeptidase were determined. Conditions were found that can help regulate the transition of the native enzyme into the truncated form. A hypothesis was proposed concerning the autoactivational character of proenteropeptidase processing.

Key words: enteropeptidase (enterokinase), processing, specificity, recombinant proteins, autolysis, inhibitors