



УДК 577.152.34'104.2 : 547.96.02

АМИНОКИСЛОТНАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ В РАЙОНЕ
РЕАКТИВНОГО ЦЕНТРА КИСЛОТОСТАБИЛЬНОГО
ИНГИБИТОРА ТРИПСИНА, ХИМОТРИПСИНА
И ВНУТРИКЛЕТОЧНЫХ ПРОТЕИНАЗ ИЗ СЫВОРОТКИ
КРОВИ КРОЛИКА

Оглоблина О. Г., Варченко Н. В., Пасхина Т. С.

*Институт биологической и медицинской химии
Академии медицинских наук СССР, Москва*

Ходова О. М., Баратова Л. А.

*Межфакультетская проблемная научно-исследовательская лаборатория
молекулярной биологии и биоорганической химии им. А. Н. Белозерского
Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова*

Из трипсинового гидролизата термо- и кислотостабильного ингибитора трипсина, химотрипсина и внутриклеточных протеиназ (ТКС-ингибитора) сыворотки крови кролика выделен и очищен до гомогенного состояния трипсинсвязывающий домен, эффективно ингибирующий трипсин и не ингибирующий химотрипсин. Установлен аминокислотный состав домена (общее число аминокислот равно 59, $M_r \approx 6200$). Автоматическим методом Эдмана впервые установлена N-концевая аминокислотная последовательность трипсинсвязывающего домена ТКС-ингибитора кролика: Thr-Val-Ala-

Ala-(Cys)-Asx-Leu-Pro-Ile-Val-Pro-Gly-Pro-X-(Arg)-Gly-Ile-Phe-X-Leu-X-Ala-Phe - X - Ala-Val-X-Gly. Выявлен факт высокой степени гомологии данной последовательности с известными последовательностями аминокислот в районе реактивного центра ТКС-ингибиторов плазмы крови человека и быка.

Среди термо- и кислотостабильных ингибиторов трипсина, химотрипсина и внутриклеточных протеиназ (ТКС-ингибиторов) плазменного происхождения хорошо изучен ТКС-ингибитор сыворотки крови кролика, являющийся гликопротеидом (M_r 23 000) с высоким содержанием углеводов (~20% по весу) [1]. Изучена природа полиморфизма этого ингибитора [2], кинетика его взаимодействия с трипсином и химотрипсином, а также с внутриклеточными протеиназами (катепсином D органов и тканей, протеиназами гранулоцитов) [3, 4].

Подобно ТКС-ингибитору плазмы крови человека и быка [5–7] ТКС-ингибитор сыворотки крови кролика, по-видимому, образуется в процессе ограниченного протеолиза белка-предшественника — интер- α -ингибитора трипсина плазмы крови. Косвенным доказательством этого предположения могло бы послужить установление первичных структур функционально важных участков молекулы данного ингибитора и сравнение их с недавно установленными структурами ТКС-ингибиторов плазмы крови человека и быка [6, 7]. Выявление высокой степени гомологии аминокислотных последовательностей плазменных ингибиторов кролика и человека также могло бы явиться подтверждением наших представлений о том, что ТКС-ингибитор кролика является хорошей моделью для изучения свойств и физиологических функций плазменного кислотостабильного ингибитора человека.

В настоящей работе описано получение и очистка до гомогенного состояния трипсинсвязывающего домена ТКС-ингибитора сыворотки крови кролика, установлена его N-концевая аминокислотная последовательность (28 аминокислотных остатков), в которую (подобно известной структуре плазменного ТКС-ингибитора человека) входит реактивный центр для связывания трипсина.

Получение и выделение трипсинсвязывающего фрагмента ТКС-ингибитора кролика

Этап	Белок, ОЕ ₂₅₀	Антитриптическая активность, ИЕ/ОЕ ₂₅₀	Выход по активности, %
Исходный препарат ТКС-ингибитора	(40) *	25	100
1. Обработка трипсином и экстракция фрагментов ТКС-ингибитора 3% HClO ₄	116	6,7	78
2. Извлечение трипсинсвязывающего фрагмента ТКС-ингибитора на трипсин-ультрогеле АСА-34 (элюция 0,2 М KCl, pH 1,5)	11,2	50	56
3. Концентрирование ультрафильтрацией	10	50	50
4. Гель-хроматография на G-100	7,5	50	37,5
5. Рехроматография на G-100	7,3	50	36,5
6. Концентрирование и лиофилизация	(4,2)	50	21

* В скобках количество белка выражено в мг.

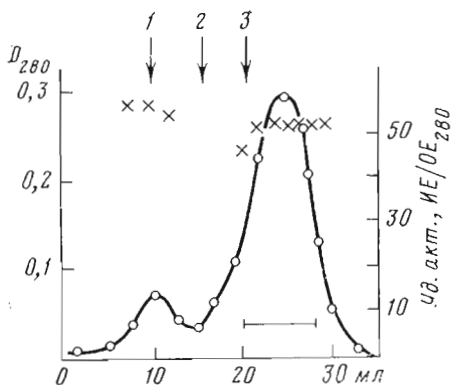
Ранее было показано [5], что обработка ТКС-ингибитора плазмы крови человека (M_r 30 000) трипсином приводит к образованию низкомолекулярного фрагмента ($M_r \approx 8000$), сохраняющего антитриптическую активность и представляющего собой второй (считая от N-конца) домен исходной молекулы, предназначенный для связывания трипсина [5]. Точное воспроизведение условий выделения описанного выше фрагмента ТКС-ингибитора человека в случае ТКС-ингибитора кролика привело нас к низким выходам трипсинсвязывающего фрагмента последнего. В связи с этим мы получали С-концевой трипсинсвязывающий домен ТКС-ингибитора кролика модифицированным методом, основные этапы которого представлены в табл. 1. Исходный препарат ТКС-ингибитора инкубировали с избытком трипсина (см. «Экспериментальную часть»), что приводило к превращению 80% нативного ТКС-ингибитора в низкомолекулярный фрагмент (по измерению антитриптической активности во фракциях после гель-фильтрации реакционной смеси через сефадекс G-100).

Полученные фрагменты и примеси исходного ТКС-ингибитора отделяли от лабильных в кислой среде белков экстракцией 3% HClO₄. Экстракт хроматографировали на трипсин-ультрогеле АСА-34, на котором избирательно сорбировались нативный ТКС-ингибитор и его фрагменты, обладающие антитриптической активностью. Выделенные таким образом трипсинсвязывающий фрагмент ($M_r \approx 8000$) и нативный ТКС-ингибитор (M_r 23 000) далее разделяли двукратной гель-фильтрацией на сефадексе G-100 (рисунок).

Таким образом, предложенная нами модификация метода получения трипсинсвязывающего фрагмента ТКС-ингибитора крови [5], включающая более длительную обработку нативного ингибитора избытком трипсина, позволила нам получить трипсинсвязывающий фрагмент ТКС-ингибитора кролика с высоким выходом (см. табл. 1).

Для выделенного трипсинсвязывающего фрагмента ТКС-ингибитора кролика, хроматографированного на сефадексе G-100 (белок выходил с колонки в виде одного пика), определяли аминокислотный состав. Данные по аминокислотному составу фрагмента ТКС-ингибитора кролика представлены в табл. 2, в которой для сравнения приведен аминокислотный состав соответствующего С-концевого фрагмента ТКС-ингибитора плазмы крови и мочи человека [6].

Молекулярная масса трипсинсвязывающего фрагмента, рассчитанная из аминокислотного состава (59 аминокислот), равна 6136; остаток триптофана не учитывали, хотя наличие его в этом фрагменте можно предположить по аналогии с соответствующим фрагментом ТКС-ингибитора человека [7]. В целом аминокислотные составы фрагментов плазменных ТКС-ингибиторов кролика и человека сходны. Существенными, с нашей точки зрения, являются два отличия: 1) во фрагменте трипсинсвязывающего домена ТКС-ингибитора кролика имеется лишь один остаток аргинина, по-видимому входящий в реактивный центр ингибитора, так как с



Гель-фильтрация ТКС-ингибитора кролика и его трипсинсвязывающего фрагмента на колонке (1×32 см) с сефадексом G-100 в воде. Скорость элюции 8 мл/ч, объем фракций 1,6 мл. Стрелками указаны объемы выхода с колонки голубого декстрана (1), овальбумина (M_r 43 000) (2) и лизоцима (M_r 14 000) (3). Контроль по поглощению (·) и антириптической активности (×). Отмечена фракция, подвергшаяся повторной гель-фильтрации

помощью химической модификации нами установлено, что в трипсинсвязывающем реактивном центре молекулы ТКС-ингибитора кролика расположен аргинин [1]; 2) во фрагменте ТКС-ингибитора кролика имеются четыре, а не шесть, как в аналогичном фрагменте ТКС-ингибитора человека, остатков цистеина [7]. По-видимому, третичная структура трипсинсвязывающего домена ТКС-ингибитора кролика стабилизируется двумя дисульфидными мостиками, а не тремя, как в ТКС-ингибиторе человека.

N-Концевая последовательность С-концевого трипсинсвязывающего домена ТКС-ингибитора кролика была установлена автоматическим методом Эдмана. При фрагментации интактного трипсинсвязывающего домена ТКС-ингибитора кролика были идентифицированы первые четыре N-концевые аминокислоты с хорошим выходом. Начиная с пятого цикла отщепление прекратилось. По гомологии с плазменным ТКС-ингибитором человека предположили, что в пятом положении в структуре исследуемого белка расположен цистин. Хорошее отщепление аминокислот после пятого цикла в предварительно окисленном трипсинсвязывающем домене ТКС-ингибитора кролика подтвердило справедливость этого предположения.

При фрагментации предварительно окисленного трипсинсвязывающего домена ТКС-ингибитора было сделано 30 циклов отщепления и идентифицировано 23 аминокислотных остатка (схема). При идентификации N-концевой аминокислоты в домене ТКС-ингибитора кролика (интактном и окисленном) не было обнаружено никаких других аминокислотных остат-

Таблица 2

Аминокислотный состав трипсинсвязывающих фрагментов ТКС-ингибиторов кролика и человека (моль/моль белка) *

Аминокислоты	Фрагмент ТКС-ингибитора		Аминокислоты	Фрагмент ТКС-ингибитора	
	кролика	человека [6]		кролика	человека [6]
Lys	4,2 (4)	4	Cys	3,7 ** (4)	6
Arg	1,4 (1)	3	Val	2,9 (3)	5
Asx	6,0 (6)	6	Ile	1,7 (2)	2
Thr	1,2 (1)	1	Leu	3,6 (4)	5
Ser	3,75 (4)	1	Tyr	2,2 (2)	3
Glx	6,8 (7)	8	Phe	3,3 (3)	4
Pro	5,0 (5)	4	Trp	Не опр.	1
Gly	9,3 (9)	8			
Ala	4,0 (4)	5	Всего	59	66

* Приведенные величины являются средними арифметическими для результатов анализа не менее трех гидролизатов фрагмента ТКС-ингибитора кролика; в скобках даны округленные значения числа аминокислотных остатков, входящих в одну молекулу фрагмента; оксиаминокислоты определяли экстраполяцией данных для 24- и 48-ч гидролизатаз к «0»-времени гидролиза.

** Определяли в виде цистеиновой кислоты.

ТКС-ингибитор человека (домен 2)	<u>Thr-Val-Ala-Ala-Cys-Asn-Leu-Pro-Val-Ile-Arg-Gly-Pro-Cys-Arg*-Ala-</u> 10
ТКС-ингибитор кролика (домен 2)	<u>Thr-Val-Ala-Ala-(Cys)-Asx-Leu-Pro-Ile-Val-Pro-Gly-Pro-X-(Arg)*-Gly-</u> 10
ТКС-ингибитор быка (домен 2)	<u>Thr-Val-Glu-Ala-Cys-Asn-Leu-Pro-Ile-Val-Glu-Gly-Pro-Cys-Arg*-X-</u> 10
БПТИ	<u>Arg-Pro-Asp-Phe-Cys-Leu-Glu-Pro-Pro-Tyr-Thr-Gly-Pro-Cys-Lys*-Ala-</u> 10
ТКС-ингибитор человека (домен 2)	<u>Phe-Ile-Gln-Leu-Trp-Ala-Phe-Asp-Ala-Val-Lys-Cly-</u> 20
ТКС-ингибитор кролика (домен 2)	<u>Ile-Phe-X-Leu-X-Ala-Phe-X-Ala-Val-X-Gly-</u> 20
ТКС-ингибитор быка (домен 2)	<u>X-X-X-X-X-X-X-X-X-X-X-X-X-X-Gly-</u>
БПТИ	<u>Arg-Ile-Ile-Arg-Tyr-Phe-Tyr-Asp-Ala-Lys-Ala-Gly-</u> 20

Слешной линией подчеркнуты полностью гомологичные ТКС-ингибиторы человека аминокислотные последовательности, пунктиром — замены типа перестановок соседних аминокислот. Звездочками обозначены аминокислотные остатки в реактивных центрах ингибиторов. Аминокислотные остатки, взятые в скобки, не идентифицированы.

жов, кроме греонина, что указывало на высокую степень очистки анализируемого препарата фрагмента ТКС-ингибитора. На схеме представлена аминокислотная последовательность N-концевой части трипсинсвязывающего домена плазменного ТКС-ингибитора кролика и первичные структуры сходных фрагментов трипсинсвязывающих доменов плазменных ТКС-ингибиторов человека [6] и быка [7], а также основного ингибитора трипсина и калликрина типа Кунитца из органов крупного рогатого скота (БПТИ) [8].

В структуре трипсинсвязывающего домена ТКС-ингибитора кролика остатки 5, 14 и 15 не идентифицированы. Тем не менее хорошее отщепление аминокислот после пятого цикла в окисленном белке и полная остановка фрагментации на пятом цикле в нативном домене ТКС-ингибитора кролика свидетельствуют в пользу нашего предположения о наличии в 5-м положении цистина (см. схему). В 15-м положении в структуре фрагмента ТКС-ингибитора кролика по аналогии с другими ТКС-ингибиторами мы поместили аргинин (схема), так как наличие аргинина в реактивном центре ТКС-ингибитора кролика было доказано ранее [1].

Идентификация аминокислот в положениях 19, 21, 24 и 27 требует дополнительных исследований.

Как видно из схемы, степень гомологии N-концевых последовательностей трипсинсвязывающих доменов плазменных ТКС-ингибиторов кролика, человека и быка очень велика и приближается к 80%. Сходство этих первичных структур со структурой БПТИ менее выражено (~20%), хотя кислотостабильные ингибиторы, образующиеся из интер- α -ингибитора трипсина плазмы крови относятся к структурному семейству БПТИ по классификации Ласковского и Като [9]. Правда, большее сходство со структурой БПТИ обнаружено для аминокислотных последовательностей N-концевых доменов плазменных ТКС-ингибиторов человека и быка [7].

Сходство первичной структуры большого фрагмента плазменного ТКС-ингибитора кролика со структурами плазменных ТКС-ингибиторов человека и быка позволяет предположить, что ТКС-ингибитор кролика принадлежит к семейству плазменных кислотостабильных ингибиторов человека и млекопитающих, образующихся при протеолизе интер- α -ингибитора трипсина плазмы крови. Высокая степень гомологии протяженных участков первичных структур плазменных ТКС-ингибиторов кролика и человека в функционально важном районе структур ингибиторов позволяет рассматривать ТКС-ингибитор кролика как близкую модель при изучении его аналога из плазмы крови человека.

Экспериментальная часть

В работе использовали трипсин (Spofa, Чехословакия), ультрогель АСА-34 (LKB Producter, Швеция), сефадекс G-100 (Pharmacia, Швеция), этиловый эфир N-бензил-L-аргинина (Bz-Arg-OEt) (Serva, ФРГ), муравьиную кислоту (Veb Laborchemie, ГДР), стандарты фенилтиогидантоинов аминокислот и все реагенты, используемые в секвенаторе (Beckman, США), силикагель DC-alufolien Kieselgel-60 (Merck, ФРГ), остальные реактивы квалификации ч.д.а. отечественного производства.

ТКС-ингибитор кролика (55% чистоты) выделяли по методу [1].

Трипсин-ультрогель АСА-34 (уд. акт.— 6 мкмоль гидролизованного Bz-Arg-OEt за 1 мин при 25°С на 1 мл отжатой на стеклянном фильтре суспензии) синтезировали согласно работе [1].

Концентрирование и обессоливание белковых фракций проводили ультрафильтрацией через мембрану UM-05 (Amicon, Голландия).

Получение трипсинсвязывающего фрагмента ТКС-ингибитора. К раствору 40 мг ТКС-ингибитора в 16 мл 0,2 М буфера триэтаноламин-HCl, pH 7,8, прибавляли 112 мг трипсина; инкубацию вели при 37°С. Через 24 ч к смеси прибавляли 40 мг трипсина, инкубацию продолжали еще 16 ч и вновь прибавляли 40 мг трипсина. Через 8 ч инкубации к смеси в третий раз прибавляли 40 мг трипсина и по истечении 16 ч — 0,8 мл конц.

HClO_4 (конечная концентрация HClO_4 — 3%). Смесь выдерживали 4 ч при 0°C и центрифугировали (10000 об/мин, 15 мин). К образовавшемуся осадку прибавляли 5 мл 3% HClO_4 , смесь перемешивали и через 4 ч центрифугировали (операцию повторяли 3 раза). Супернатанты объединяли, нейтрализовали 0,5 М КОН; образовавшийся осадок отделяли центрифугированием (10000 об/мин, 15 мин). Супернатант наносили на колонку ($2,5 \times 37$ см) с трипсин-ультрогелем АСА-34 при 4°C со скоростью 40 мл/ч. Колонку в течение 16 ч промывали 0,2 М буфером триэтанолламин-НСI, рН 7,8, содержащим 0,2 М КСI (16 ч), далее 200 мл дистиллированной воды и 200 мл 0,2 М КСI, рН 1,5 (скорость элюции 20 мл/ч). Фракции последнего элюата, содержащие белок, объединяли, нейтрализовали 0,05 М КОН, после чего обессоливали и концентрировали до объема 0,5—1 мл. Концентрированную белковую фракцию наносили на колонку (1×32 см) с сефадексом G-100, уравновешенным водой (рисунок). Фракцию, содержащую трипсинсвязывающий фрагмент ($M_r \approx 8000$), концентрировали и рехроматографировали на сефадексе G-100, после чего концентрировали и лиофилизировали (см. табл. 1).

Антитриптическую активность измеряли, как описано в работе [1], и выражали в ингибиторных единицах (ИЕ). 1 ИЕ соответствует количеству ингибитора или его домена, тормозящему расщепление 1 мкмоль Вz-Arg-OEt трипсином за 1 мин при 25°C в стандартных условиях.

Окисление фрагмента ТКС-ингибитора надмуравьиной кислотой. К 3,6 мл 95% HCOOH , перегнанной над безводным CuSO_4 (т. кип. 105°C), прибавляли 0,4 мл 30% H_2O_2 , смесь выдерживали 1 ч при 18°C , затем охлаждали до 0°C и добавляли к 4,1 мг фрагмента ТКС-ингибитора кролика. Через 4 ч инкубации при 0°C к смеси добавляли 0,6 мл HBr , после чего ее упаривали на роторном испарителе досуха. При окислении фрагмента ТКС-ингибитора для определения числа остатков цистеина бради: 90—150 мкг белка и 0,5 мл надмуравьиной кислоты.

Аминокислотный анализ. Нативный или окисленный надмуравьиной кислотой фрагмент ТКС-ингибитора (100—150 мкг) гидролизуют 0,4 мл 6 М HCl в течение 24 или 48 ч при 115°C . Гидролизаты упаривали досуха, несколько раз повторяя отгонку остатков кислоты с бидистиллированной водой. Анализ аминокислотного состава проводили в анализаторе фирмы Durrum 500, США.

N-Концевую последовательность определяли в секвенаторе модели 890 С фирмы Beckman (США). Отщепление проводили по стандартной белковой программе 122974 с использованием нелетучего «квадрольного» 1 М буфера, рН 9,0. Реагент S_2 (*n*-хлорбутан), используемый для экстракции тиазолинонов из реакционной ячейки, содержал $1 \cdot 10^{-4}$ М дитиотреит [10]. Изомеризацию тиазолинонов в фенилтиогидантоины аминокислот проводили по стандартной методике [11]. Идентификацию фенилтиогидантоинов аминокислот в каждом цикле отщепления проводили методом микротонкослойной одномерной хроматографии на пластинках (5×5 см) с силикагелем. Разделение фенилтиогидантоинов аминокислот достигали последовательным использованием трех систем растворителей: хлороформ, содержащий 1,5% этилового спирта (3 раза), хлороформ — метанол (9:0,5) и хлороформ — ледяная уксусная кислота (8:2). Для количественной оценки интенсивности пятен фенилтиогидантоинов аминокислот проводили денситометрирование на спектрофотометре фирмы Opton (ФРГ) при 265 нм. Автоматическую фрагментацию трипсинсвязывающего домена ТКС-ингибитора кролика проводили дважды. В первом случае навеска нативного белка составляла 1,6 мг (проведено 8 циклов отщепления). Во втором опыте домен ТКС-ингибитора кролика был предварительно окислен надмуравьиной кислотой и затем подвергнут автоматической деградации; навеска белка — 3,9 мг, проведено 30 циклов отщепления.

Авторы благодарят Е. А. Тимохицу (ВНИИ генетики и селекции промысловых микроорганизмов) за установление аминокислотного состава кислотных гидролизатов фрагмента ТКС-ингибитора кролика.

ЛИТЕРАТУРА

1. Оглоблина О. Г., Якубовская Р. И., Платонова Л. В., Пасхина Т. С. Биорган. химия, 1975, т. 1, № 8, с. 1176–1187.
2. Оглоблина О. Г., Якубовская Р. И., Платонова Л. В., Стронгин А. Я., Пасхина Т. С. Биорган. химия, 1976, т. 2, № 11, с. 1568–1579.
3. Оглоблина О. Г., Платонова Л. В., Пасхина Т. С. Биохимия, 1979, т. 44, № 4, с. 672–682.
4. Оглоблина О. Г., Руанет В. В., Казакова О. В., Пасхина Т. С. Биохимия, 1981, т. 46, № 4, с. 667–673.
5. Hochstrasser K., Bretzel G., Feuth H., Hilla W., Lempart K. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 1976, B. 357, № 2, S. 153–162.
6. Wachter E., Hochstrasser K. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 1979, B. 360, № 9, S. 1305–1311.
7. Wachter E., Deppner K., Hochstrasser K., Lempart K., Geiger R. FEBS Letters, 1980, v. 119, № 1, p. 58–62.
8. Tschesche H. Angew. Chem. Internat. Edit., 1977, v. 13, № 1, p. 10–28.
9. Laskowski M., Jr., Kato I. Am. Rev. Biochem., 1980, v. 49, p. 593–626.
10. Hermodson M. A., Ericsson L. H., Titani K., Neurath H., Walsh K. A. Biochemistry, 1972, v. 11, № 24, p. 4493–4502.
11. Edman P., Begg G. Eur. J. Biochem., 1967, v. 1, № 1, p. 80–91.

Поступила в редакцию
13.VII.1982

AMINO ACID SEQUENCE IN THE REACTIVE SITE REGION
OF THE ACID-STABLE TRYPSIN, CHYMOTRYPSIN AND INTRACELLULAR
PROTEINASES INHIBITOR FROM RABBIT SERUM

OGLOBLINA O. G., VARCHENKO N. V., PASKHINA T. S.,
KHODOVA O. M., BARATOVA L. A.

*Institute of Biological and Medical Chemistry,
Academy of Medical Sciences of the USSR, Moscow
A. N. Belozersky Laboratory of Molecular Biology and Bioorganic Chemistry,
M. V. Lomonosov State University, Moscow*

The thermo- and acid-stable trypsin, chymotrypsin and intracellular proteinases inhibitor (TAS-inhibitor) from rabbit serum was digested by trypsin, and its domain (M_r 6200) with antitryptic activity was obtained in homogeneous state. The N-terminal amino acid sequence of this domain was established by automatic Edman degradation: Thr-Val-Ala-Ala-Cys-Asx-Leu-Pro-Ile-¹⁰Val-Pro-Gly-Pro-X-Arg-Gly-Ile-Phe-X-²⁰Leu-X-Ala-Phe-X-Ala-Val-X-Gly. A high degree of homology of the primary structures rabbit, human and bovine TAS-inhibitors was demonstrated.