

На правах рукописи

ВАСИЛЬЕВА
Ольга Сергеевна

**ХАРАКТЕРИСТИКА РЕКОМБИНАНТНЫХ
КАТЕПСИНОВ Н И S ЧЕЛОВЕКА**

03.00.13 – физиология

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Томск 2002

Работа выполнена в Сибирском государственном медицинском университете

Научный руководитель

доктор медицинских наук, профессор Серебров Владимир Юрьевич

Официальные оппоненты

доктор медицинских наук, профессор Барбараш Нина Алексеевна

доктор медицинских наук, профессор Капилевич Леонид Владимирович

Ведущая организация НИИ физиологии СО РАМН (г.Новосибирск)

Защита состоится « ____ » _____ 2002 г. в ____ часов на заседании диссертационного совета Д 208.096.01 при Сибирском государственном медицинском университете по адресу: 634050, г. Томск, Московский тракт, 2

С диссертацией можно ознакомиться в научно-медицинской библиотеке Сибирского государственного медицинского университета (634050, г. Томск, пр.Ленина, 107)

Автореферат разослан « ____ » _____ 2002 г.

Ученый секретарь диссертационного совета

Бражникова Н.А.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Катепсины Н (ЕС 3.4.22.16) и S (ЕС 3.4.22.27) принадлежат к группе цистеиновых лизосомальных протеиназ, необходимых для деградации белковых молекул, поступивших из интра- и экстраклеточного пространства и, следовательно, принимающих участие во множестве физиологических процессов организма, таких как регуляция внутриклеточного метаболизма протеинов, посттрансляционное изменение белков, клеточная дифференциация, процессы роста и старения, активация и инактивация гормонов и нейропептидов, процесс иммунного ответа и множество других [Turk B. et al., 2000]. Данный класс ферментов гидролизует пептидные связи белков с помощью каталитически активной аминокислоты – цистеина, таким образом принимая участие в необратимом процессе протеолиза, которым клетка регулирует функции и судьбы белков [Neurath H., Walsh K.A. 1976; Bond J. S., Butler P.E. 1987]. За счет вовлечения лизосомальных цистеиновых протеаз во множество физиологических процессов, важных для нормального существования и развития живых организмов, неконтролируемая деятельность катепсинов может являться причиной развития множества патологических процессов. В последние два десятилетия в результате многочисленных исследований было установлено, что цистеиновые протеазы принимают участие в регуляции апоптоза и в развитии таких заболеваний как рак, ревматоидный артрит, болезнь Альцгеймера, рассеянный склероз, панкреатит, заболевания печени, легких, диабет, мышечная дистрофия и другие [Mort J.S. et al., 1984; Mort J.S. et al., 1998; Baici A. et al., 1988; Baici A. et al., 1995; Cataldo A.M. and Nixon R.A. 1990; Bever C.T. et al., 1995; Takeda A. et al., 1992; Turk B. et al., 2000].

Участие протеиназ в широком спектре физиологических процессов организма определяется, прежде всего, полифункциональностью протеолитической системы, что, в свою очередь, обусловлено структурно-функциональными особенностями её компонентов [Nagler D.K. et al., 1999]. Так, например, отличительной особенностью **катепсина S** является высокая стабильность и активность в физиологических условиях при pH 7,0-7,5 [Kirschke H. et al., 1995]. Учитывая, что при большинстве заболеваний лизосомальные ферменты были обнаружены во внеклеточном/внелизосомальном пространстве [Turk B. et al., 2000], исследование процессов активации данного фермента при физиологических условиях является, несомненно, важной и малоизученной проблемой. Еще одним заслуживающим внимания лизосомальным ферментом, отличающимся от остальных лизосомальных цистеиновых протеиназ наличием дополнительного структурного фрагмента – октапептида (мини-цепь), является **катепсин Н**. Недавно выявленная пространственная структура свиного катепсина Н показала, что мини-цепь расположена вдоль активного центра катепсина, таким образом, предопределяя уникальную аминокатализаторную активность данного фермента [Gunčar G. et al., 1998]. Тем не менее ряд исследовательских групп обнаружили эндопептидазную активность нативных препаратов катепсина Н, полностью противоречащую данным кристаллографии [Локшина Л.А., и совт., 1985; Koga H. et al., 1992]. Таким образом, изучение свойств катепсина Н,

лишенного мини-цепи, явилось бы основой окончательного выяснения роли октапептида для функциональной специфичности данного фермента.

Учитывая огромное количество открытий, сделанных в 1990-х годах, в исследованиях лизосомальных цистеиновых протеиназ и их значение для понимания важнейших процессов в клетке, данная тема в настоящее время является одним из наиболее приоритетных направлений в изучении клеточных процессов метаболизма [Turk B. et al., 2000]. Следует отметить, что именно современные новейшие технологии, активно используемые в последнее десятилетие в области физиологии протеолитических ферментов, сделали возможным переход на новый уровень исследования структурно-функциональных особенностей и молекулярной биологии отдельных компонентов данной системы. Одним из наиболее часто используемых методов получения лизосомальных протеиназ, а в частности их проформ, является выделение **рекомбинантных катепсинов** с помощью использования различных экспрессионных систем [Серкина А.В. и соавт. 2000; Kopitar G. et al., 1996]. Главным преимуществом данного метода является более высокий выход белка, а также возможность получения предшественников ферментов, выделение которых из природного продуцента не представляется возможным из-за быстрого их процессинга в зрелую форму.

Таким образом, многообразие функций цистеиновых протеиназ, прямо или косвенно связанных с важнейшими клеточными процессами, определяет необходимость более подробного изучения структурно-функциональных особенностей ферментов данного класса, а в частности таких вопросов, как выяснение условий активации прокатепсинов в каталитически активные формы ферментов и изучение влияния их структурной организации на проявляемую ферментативную специфичность. Такие исследования, безусловно, внесут весомый вклад в развитие фундаментальных представлений о механизме процесса протеолиза в физиологических условиях и будут способствовать пониманию роли катепсинов в патогенезе многих заболеваний.

Цель исследования

Изучить структурные и функциональные особенности рекомбинантных катепсинов Н и S человека *in vitro*.

Для достижения данной цели были поставлены следующие **задачи**:

1. Выделить рекомбинантные прокатепсины Н и S здорового человека, экспрессированные в *Escherichia coli*.
2. Изучить особенности аутокаталитической активации прокатепсинов Н и S человека и исследовать влияние различных гликозаминогликанов на эффективность данного процесса.
3. Определить тип пептидазной активности рекомбинантного катепсина Н человека, лишенного мини-цепи, и нативного свиного катепсина Н в отношении трёх синтетических субстратов (Bz-Phe-Val-Arg-AMC, Z-Phe-Arg-AMC и H-Arg-AMC) и β -цепи инсулина.

4. Определить константы гидролиза синтетических субстратов (K_m , k_{cat} , k_{cat}/K_m) и константы ингибирования (K_i , k_{ass} , k_{diss}) для выделенного рекомбинантного катепсина Н человека, лишённого мини-цепи.

5. Исследовать процесс аутокаталитической активации рекомбинантного катепсина S человека в физиологических условиях и исследовать влияние ионной силы раствора и различных буферных систем на эффективность данного процесса.

Научная новизна

Впервые был получен рекомбинантный катепсин Н человека, что дало возможность провести исследование его структурно-функциональных особенностей. Убедительно показано, что профермент, экспрессированный в *Escherichia coli* с использованием T7 - экспрессионной системы, способен к аутокаталитическому процессингу в активную форму фермента, лишённую характерного лишь для катепсина Н структурного фрагмента – октапептида (мини-цепи). Впервые была выяснена субстратная специфичность данной формы фермента, определены константы гидролиза (K_m , k_{cat} , k_{cat}/K_m) и ингибирования (K_i , k_{ass} , k_{diss}), которые являются важнейшими параметрами кинетики взаимодействия фермента с различными синтетическими субстратами и специфичными ингибиторами. Установлено, что рекомбинантный катепсин Н человека, лишённый мини-цепи, в отличие от нативной формы фермента, отличается высокой эндопептидазной активностью. На основе полученных результатов была высказана оригинальная гипотеза, объясняющая разногласия литературных данных в отношении появления данного вида активности у нативных препаратов фермента.

Впервые исследован процесс аутокаталитической активации катепсинов Н и S в присутствии различных гликозаминогликанов и показана уникальная возможность процессинга катепсина S при физиологических значениях рН среды.

Научно-практическая значимость работы

Настоящая работа вносит весомый вклад в развитие фундаментальных представлений о механизме процесса активации предшественников цистеиновых протеиназ в каталитически активную форму. Использование новейших технологий получения рекомбинантных ферментов позволило выявить роль структурного фрагмента катепсина Н (мини-цепи) в аминокаталитической активности данного фермента, что расширяет представление о значении структурной организации фермента для проявляемой специфичности.

Выявленная уникальная способность прокатепсина S к аутопроцессингу в физиологических условиях позволяет заключить, что этот фермент может процессироваться в активную форму и вне лизосом, что привносит новый аспект рассмотрения возможности появления активных катепсинов за пределами лизосом, что позволяет глубже понять процессы, происходящие в клетке при ряде патологических состояний.

Основные положения работы могут быть использованы в качестве теоретической основы для современного представления о роли катепсинов Н и S в

патогенезе ряда заболеваний, включая опухолевый процесс, а также для проведения прикладных исследований в области создания новых фармакологических средств, влияющих на цикл секреции и активации лизосомальных протеиназ.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Рекомбинантные прокатепсины Н и S здорового человека, экспрессированные в *Escherichia coli* с использованием T7 - экспрессионной системы, способны к аутокаталитической активации (аутопроцессинг). В присутствии гликозаминогликанов скорость этого процесса увеличивается.

2. Прокатепсин S человека обладает отличительной способностью аутопроцессинга в физиологических условиях.

3. В условиях *in vitro* рекомбинантный прокатепсин Н человека аутокаталитически процессируется в активный фермент, но при этом теряет характерную лишь для данного фермента структуру – октапептид (мини-цепь).

4. В отличие от нативной формы катепсина Н рекомбинантный фермент, лишенный мини-цепи, характеризуется высокой эндопептидазной активностью в отношении синтетических субстратов и β -цепи инсулина.

5. Отсутствие октапептида в структуре катепсина Н, оказывающего влияние на специфичность фермента, проявляется в изменении уровня констант гидролиза синтетических субстратов и констант ингибирования.

Апробация работы

Основные результаты представлены на научных семинарах кафедры биохимии и молекулярной биологии Сибирского государственного медицинского университета, отдела биохимии и молекулярной биологии Института «Jožef Stefan» (Любляна, Словения), международных и российских конференциях: VIIth International Symposium on Proteinase Inhibitors and Biological Control (June 16 – 20, 2001, Brdo, Slovenia), 4th Meeting of the Slovenian Biochemical Society with international participation (September 13-15, Kranjska Gora, Slovenia), Международной конференции «Проблемы медицинской энзимологии» и Российского научного форума «Современные технологии лабораторной диагностики нового столетия» (Москва, 2001), 3rd International Conference on Cysteine Proteinases and their Inhibitors (September 14-18, 2002, Portorož, Slovenia).

По теме диссертации **опубликовано** 10 работ.

Объем и структура диссертации

Диссертация состоит из введения, четырех глав, выводов и списка цитируемой литературы. Работа изложена на 135 страницах, иллюстрирована 13 таблицами и 31 рисунком. Библиография включает 257 литературных источников, из которых 22 отечественных и 235 иностранных.

Автор выражает искреннюю признательность профессору Сереброву В.Ю. за огромное внимание и научное руководство. Турку Б., Долинар М. и Розман-Пунгерчар Е. выражает благодарность за ценные теоретические и методические

рекомендации, Штефе И. за предоставленный образец нативного свиного катепсина Н, Крижай И. и Леонарди А. за определение N-терминальной аминокислотной последовательности и Жеровник Е. за предоставленные образцы стефинов А и В. Особую признательность автор выражает профессору Турку В. за предоставленную возможность проведения ряда исследований на базе Института «Jozef Stefan» Словения, а также за полезные обсуждения полученных результатов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Материалом исследования являлись рекомбинантные прокатепсины Н и S здорового человека, экспрессированные в *Escherichia coli* с использованием T7 – экспрессионной системы. После выделения и очистки с помощью гель-фильтрации рекомбинантные прокатепсины Н и S человека были ренатурированы для формирования нативной пространственной структуры. Все этапы получения рекомбинантных прокатепсинов Н и S контролировались визуализацией белковых фракций фермента с помощью SDS-ПААГ электрофореза.

Конформационно свернутые молекулы прокатепсинов Н и S человека были подвергнуты аутокаталитической активации для получения зрелых форм ферментов. Механизм и условия протекания данного процесса были изучены с помощью использования современных методов измерения активности зрелых ферментов в отношении синтетических субстратов и визуализации белковых фракций фермента с помощью SDS-ПААГ электрофореза.

В связи с получением уникального препарата активного рекомбинантного катепсина Н человека, лишённого октапептида, нами было проведено изучение его структурно-функциональных параметров с помощью использования кинетических методов исследований, включающих определение констант гидролиза для различных синтетических субстратов, гидролиз β -цепи инсулина и определение констант ингибирования эндогенными ингибиторами.

Так как методы экспрессии и выделения рекомбинантного прокатепсина S были идентичны таковым для прокатепсина Н, то в соответствующих разделах, методы и результаты рассматриваются одновременно для обоих ферментов.

1. Методы молекулярной биологии

Рекомбинантные плазмиды pVMF2 и pKG2.1, содержащие ДНК кодирующие прокатепсин Н и S здорового человека соответственно, были ПЦР-амплифицированы на основе сДНК человеческого эндометрия матки (катепсин Н) и λ gt11 сДНК подвздошной кишки человека (катепсин S) и перенесены в вектор экспрессии pET3a [Dolar M. et al., 2000; Kopitar et al., 1996]. Нами было выполнено определение нуклеотидной последовательности данных плазмидных ДНК с использованием двух универсальных праймеров (T7-промотор и T7-терминатор) и одного внутреннего SEI и i-PCR-SA, для катепсинов Н и S соответственно. Для определения нуклеотидной последовательности плазмидные ДНК были выделены с помощью метода, основанного на использовании катионного детергента цетилтриметил-аммония бромида (СТАВ) [Del Sal G. et al., 1989], и очищены с помощью набора PCR Purification kit (Qiagen, Германия).

Далее нуклеотидная последовательность была определена с помощью капиллярного электрофореза на ABI 310 секвенаторе (Applied Biosystems, США) с использованием набора BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit (Qiagen, Германия).

2. Выделение и активация рекомбинантных прокатепсинов Н и S человека

Рекомбинантные плазмиды pBMF2 и pKG2.1 с проверенной нуклеотидной последовательностью были трансформированы с ДНК штамма *Escherichia coli* BL21[DE3]pLysS и экспрессированы. Выделение, очистка и ренатурация рекомбинантных ферментов были проведены, как описано [Dolinar M. et al., 1995; Kopitar G. et al., 1996]. Аутокаталитическую активацию рекомбинантных прокатепсинов проводили по методу Турка Б. [Rozman J. et al., 1999]. Процесс аутокаталитической активации прокатепсинов Н и S был визуализирован с помощью 12 % SDS-ПААГ вертикального акриламидного электрофореза.

3. Кинетические методы исследования

Концентрация прокатепсинов была определена на основе спектра абсорбции, снятого в пределах 240-340 нм с помощью UV/VIS Perkin Elmer λ -18 спектрометра (США), и молярного абсорбционного коэффициента, рассчитанного на основе аминокислотной последовательности [Pace 1995]. Кинетика аутокаталитической активации прокатепсинов Н и S, проявляющаяся в увеличении активности зрелого фермента, изучалась соответственно [Rozman J. et al., 1999] с помощью Perkin Elmer LS-50 спектрофлуориметра (США) с длиной волны возбуждения и эмиссии, равной 370 и 460 нм соответственно. Константы гидролиза синтетических субстратов (Bz-Phe-Val-Arg-AMC, Z-Phe-Arg-AMC и H-Arg-AMC) рекомбинантным катепсином Н человека были определены на основе модели Халдана [Stoka V. et al., 1998]. Кинетика взаимодействия катепсина Н с куриным цистатином, стефинами А и В непрерывно контролировалась в течение 30 мин и записывалась с помощью Perkin Elmer LS-50 спектрофлуориметра (USA). Константы ингибирования были определены, как описано [Turk B. et al., 1995].

4. Методы разделения белков и пептидов

Визуализацию белковых фракций исследуемых образцов проводили с помощью вертикального электрофореза в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия (SDS-ПААГ электрофорез), используя прибор для электрофореза Mini-PROTEAN II Electrophoretic Cell фирмы BIO-RAD (США) [Schagger H. and von Jagow G. 1987]. Разделение пептидов, полученных после гидролиза β -цепи инсулина катепсином Н, проводилось с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) на аппаратуре Milton Roy (США) с использованием колонки Vydac C18 (The Separations Group, США).

5. Статистическая обработка результатов

Статистическую обработку результатов исследования проводили на персональном компьютере с использованием пакета прикладных программ GRAFIT 3.0. Влияние различных факторов на скорость аутокаталитической активации прокатепсинов изучалось с помощью метода однофакторного дисперсионного анализа [Лакин Г.Ф., 1980]. Для каждого анализируемого показателя вычисляли среднее (\bar{X}), ошибку среднего (m), среднеквадратичное

отклонение. Статистически значимыми считались различия при $p < 0,05$. Результаты всех экспериментов приведены в таблицах в виде $X \pm m$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЯ

Выделение рекомбинантных прокатепсинов Н и S человека

Штамм бактерий *Escherichia coli* BL21[DE3]pLysS был трансформирован с рекомбинантной плазмидой pBMF2 [Dolinar M. et al., 2000] для синтеза прокатепсина Н и плазмидой pKG2.1 [Kopitar G. et al., 1996] для синтеза прокатепсина S. После индукции ИПТГ трансформированные бактерии вырабатывали большое количество рекомбинантных прокатепсинов, которые являлись преобладающим белком в клетках бактерий и были представлены главным образом в нерастворимой фракции бактериального лизата, составляя примерно 30% от общего количества бактериальных протеинов (рис. 1).

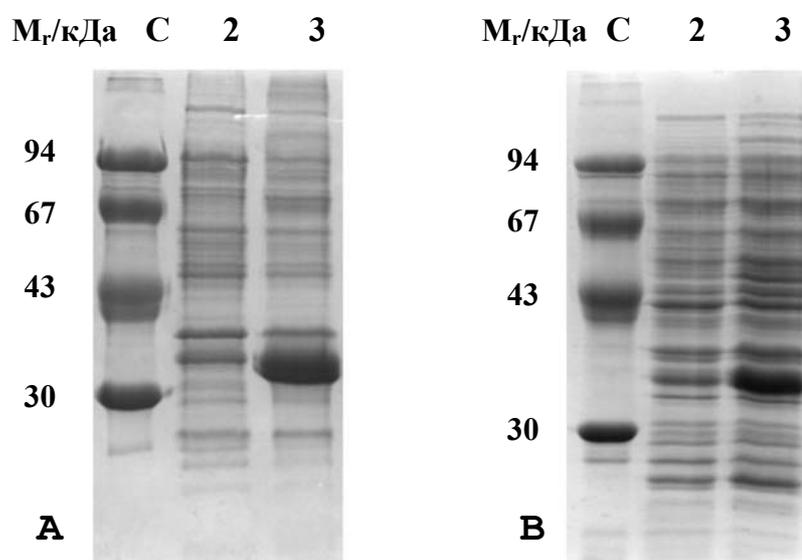


Рис. 1. Электрофореграммы бактериальных лизатов в процессе биосинтеза рекомбинантных прокатепсина Н (А) и прокатепсина S (В):

С – стандарт молекулярной массы; 2 – общий клеточный экстракт бактерий BL21[DE3]pLysS содержащих pBMF2 (А) и pKG2.1(В) плазмиды до индукции; 3 – общий клеточный экстракт бактерий 3,5 часа после добавления ИПТГ для индукции синтеза прокатепсинов Н (А) и S (В)

После промывки телец включения и очистки ферментов от примесей с помощью гель-фильтрации, белки фракций главных пиков, представленные прокатепсинами Н и S, были подвергнуты конформационному свертыванию путем быстрого разведения в буфере с последующим диализом и сконцентрированы. Конечный выход рекомбинантных ферментов составил ~10-12 мг на 4 л бактериальной культуры. Чистота конформационно свернутых рекомбинантных прокатепсинов Н и S была подтверждена с помощью SDS-ПААГ электрофореза.

Идентичность про- и активной форм катепсина Н была подтверждена определением N-терминальной аминокислотной последовательности протеинов, перенесенных на PVDF мембрану с помощью Western блотта. Тогда как первые

10 аминокислот прокатепсина Н были идентичны предложенной аминокислотной последовательности [Fuchs R., Gassen H.G. 1989], секвиенс активной молекулы выявил 4-аминокислотную экстенцию (GTGP) и отсутствие октапептида в сравнении с опубликованной аминокислотной последовательностью катепсина Н, выделенного из почечной ткани человека [Ritonja et al., 1988]. На основе данных рентгеноструктурного анализа катепсина Н мы предположили, что дополнительные аминокислоты на N-терминальном конце не будут ощутимо влиять ни на каталитическую активность фермента, ни на его взаимодействия с ингибиторами, тогда как отсутствие октапептида может быть решающим для субстратной специфичности. N-терминальная аминокислотная последовательность прокатепсина S полностью соответствовала опубликованной [Wiederanders B, et al., 1992].

Изучение аутокаталитической активации прокатепсина Н

Было показано, что при подкислении среды образца рекомбинантного прокатепсина Н человека до pH 5,0 электрофоретически наблюдалось снижение молекулярной массы с ~35000 до ~25000 Да, соответствующее отделению пропептида (~10 кДа), таким образом, указывая, что прокатепсин Н подвергается аутокаталитическому процессингу в зрелую форму фермента (рис. 2).

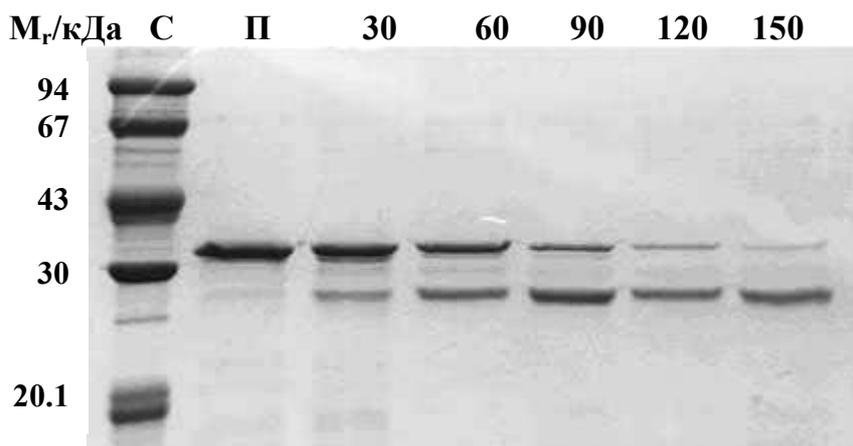


Рис. 2. Электрофореграмма фракций активационной смеси катепсина Н, взятых в серии каждые 30 минут инкубации профермента:

С – стандарт молекулярной массы; П – прокатепсин Н до активации; 30, 60, 90, 120 и 150 – инкубационное время прокатепсина Н, мин

Эффективность аутокаталитической активации прокатепсина Н была исследована в присутствии гликозаминогликанов, которые, как было описано в литературе, ускоряют этот процесс [Mason et al., 1992; Tankersley et al., 1984; Rozman et al., 1999]. Результаты исследования активности зрелого фермента после инкубации прокатепсина Н в течение 1 часа в отсутствии и в присутствии гликозаминогликанов подтвердили данное наблюдение, показывая значительное увеличение скорости процессинга в присутствии декстрансульфата, хондроитинсульфата В и гепарина. Полученные данные свидетельствуют о том, что декстрансульфат вносит наиболее существенный вклад в данный процесс с оптимальной концентрацией 25 мкг/мл.

Изучение процесса аутокаталитической активации с помощью прерывного метода исследования выявило сигмоидальное нарастание активности катепсина Н, процессированного в присутствии декстрансульфата, что, как было доказано ранее [Rozman J., et al., 1999], является свидетельством бимолекулярной природы данного процесса.

Сравнение скорости аутокаталитической активации при рН среды от 3,0 до 9,0 в присутствии и отсутствии декстрансульфата показало, что наиболее эффективной для аутопроцессинга является кислая среда: рН 5,0 в присутствии декстрансульфата и рН 4,0 – в отсутствие данного катализатора. Полученные результаты подтверждают данные литературы, основанные на предположении, что активация лизосомальных прокатепсинов происходит лишь внутри лизосом, рН содержимого которых составляет 3,5 – 5,0.

Изучение субстратной специфичности и определение K_m и k_{cat} для рекомбинантного катепсина Н человека

Вначале активность рекомбинантного катепсина Н была протестирована в отношении аминокатализируемого субстрата Н-Arg-AMC. Как и предполагалось, уровень его гидролиза рекомбинантным катепсином Н был значительно ниже в сравнении с нативным свиным катепсином Н, что свидетельствует о том, что рекомбинантный фермент не является аминокатализатором (рис. 3). При гидролизе данными ферментами двух эндопептидазных субстратов (Bz-Phe-Val-Arg-AMC и Z-Phe-Arg-AMC) для рекомбинантного катепсина Н была выявлена специфичность, прямо противоположная таковой для нативного фермента (рис. 3), указывающая на то, что рекомбинантный катепсин Н был обращен в эндопептидазу.

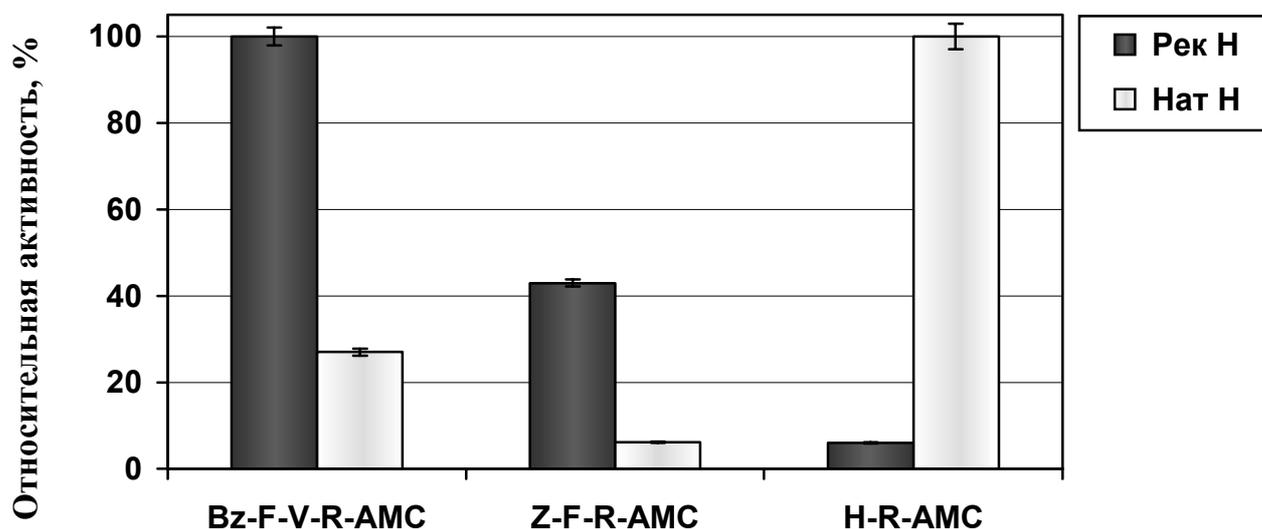
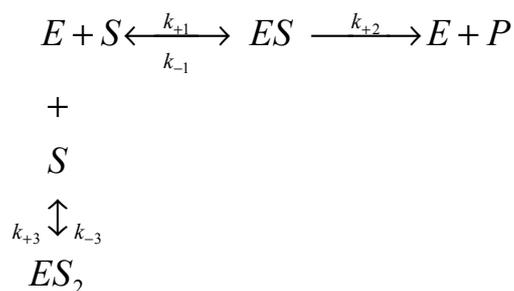


Рис. 3. Относительная активность рекомбинантного катепсина Н человека (Рек Н) и нативного свиного катепсина Н (Нат Н) в отношении трех синтетических субстратов.

Данные стандартизированы относительно максимальной активности для рекомбинантного и нативного ферментов, соответствующих активностям в отношении Bz-Phe-Val-Arg-AMC и H-Arg-AMC субстратов соответственно

Следующим этапом нашего исследования являлось определение кинетических параметров гидролиза субстратов рекомбинантным катепсином Н человека. Неожиданно кинетика субстратного гидролиза показала значительное снижение реакционного уровня при более высоких концентрациях обоих субстратов ($[S_o] \geq 30$ мкМ для Vz-Phe-Val-Arg-АМС и $[S_o] \geq 100$ мкМ для Z-Phe-Arg-АМС). Схожий эффект был ранее описан для крузипаина, родственного фермента из известного внутриклеточного паразита *Trypanosoma cruzi* (Stoka V. et al., 1998). Этот эффект может быть объяснен теорией субстратного ингибирования, которая заключается в формировании «неэффективных» комплексов двумя и более субстратными молекулами, сопряженными активными центрами, и характеризуется следующей моделью [Dixon et al., 1979]:



описываемой формулой Haldane:

$$v = \frac{V_{\max}}{1 + \frac{K_m}{[S]} + \frac{[S]}{K_{si}}} ,$$

где V_{\max} , K_m и $[S]$ – максимальная скорость, константа Михаэлиса-Ментона и концентрация субстрата соответственно, а K_{si} является равновесной константой субстратного ингибирования. Данное уравнение основывается на теории существования равновесного состояния для связывания с субстратом [Dixon et al., 1979] и точно описывает полученные данные для обоих субстратов, подтверждая правильность выбора данной модели. В контрольных экспериментах абсорбционный спектр 100 мкМ продукта реакции (АМС) и субстратов (Vz-Phe-Val-Arg-АМС и Z-Phe-Arg-АМС) был исследован в пределах 370 и 460 нм. Было установлено, что ни АМС, ни субстраты не абсорбировали в пределах использованных длин волн, таким образом, исключая возможность эффекта «внутреннего фильтра».

Значения K_m и k_{cat} для гидролиза использованных синтетических субстратов рекомбинантным катепсином Н человека, в сравнении с опубликованными данными, для нативного катепсина Н представлены в табл. 1. Для исследования достоверности используемой модели значения k_{cat}/K_m были также определены на основе линейной части кривой (табл. 1). Рассчитанные значения незначительно отличались от констант гидролиза синтетических субстратов, полученных на основе модели Haldane, таким образом подтверждая их достоверность.

Константы гидролиза синтетических субстратов для рекомбинантного (Рек Н) и нативного (Нат Н) катепсинов Н [Kirschke H. et al., 1995]

| Фермент | Субстрат | K_m (мкМ) | k_{cat} (с ⁻¹) | k_{cat} / K_m (мМ ⁻¹ с ⁻¹) | k_{cat} / K_m^* (мМ ⁻¹ с ⁻¹) |
|--------------------|--------------------|-------------|------------------------------|---|---|
| Рек Н | Bz-Phe-Val-Arg-AMC | 38 ± 7,7 | 110 ± 13 | 2900 | 1070 ± 36 |
| | Z-Phe-Arg-AMC | 82 ± 26 | 4,3 ± 1,0 | 52,5 | 37,5 ± 1,3 |
| | H-Arg-AMC | На | На | < 5 | На |
| Нат Н ¹ | Bz-Phe-Val-Arg-AMC | 25 | 1,6 | 64 | - |
| | Z-Phe-Arg-AMC | На | На | На | - |
| | H-Arg-AMC | 100 | 8,0 | 80 | - |

Примечание. ¹ – Kirschke H. et al., 1995; На – незначительная активность; * значения k_{cat} / K_m были дополнительно определены на основе линейной части кривой.

Уровень гидролиза аминокатапептидазного H-Arg-AMC субстрата рекомбинантным катепсином Н человека был крайне низок, что позволило определить лишь верхнюю границу значения k_{cat}/K_m . Значения k_{cat}/K_m величин для рекомбинантного и нативного катепсинов Н в отношении Bz-Phe-Val-Arg-AMC субстрата составляли 2900 и 64 мМ⁻¹ с⁻¹ соответственно, тогда как значения кинетических констант гидролиза H-Arg-AMC субстрата различались как минимум в ~20 раз. Таким образом, данные константы отражают различную специфичность нативного и рекомбинантного ферментов, а следовательно, являются следствием наличия или отсутствия мини-цепи в структуре исследованных катепсинов Н.

Гидролиз β-цепи инсулина рекомбинантным и нативным катепсинами Н

После гидролиза β-цепи инсулина рекомбинантным катепсином Н человека разделение пептидов проводилось с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Определение N-терминальной аминокислотной последовательности полученных продуктов показало наличие главного сайта гидролиза между Glu13-Ala14 и четырех дополнительных сайтов гидролиза (рис. 4), тогда как главным сайтом гидролиза для нативного свиного катепсина Н, протестированного параллельно, являлся Phe1-Val2. Вторичные сайты гидролиза свидетельствовали о последовательном расщеплении связей от N-терминального конца молекулы, характерном для аминокатапептидаз. Таким образом, данные результаты ясно свидетельствуют, что рекомбинантный катепсин Н деградирует β-цепи инсулина главным образом как эндопептидаза, тогда как для нативного свиного катепсина Н аминокислотная последовательность лишь одного пептида указывала на эндопептидазную активность, в то же время более восьми сайтов для аминокатапептидазной активности было обнаружено. Контроль гидролиза β-цепи инсулина рекомбинантным и нативным свиным катепсинами Н был проведен для временных отрезков 0, 15 и 30 минут и позволил нам выделить предпочтительные сайты гидролиза. Следует отметить, что наряду с высокой аминокатапептидазной активностью нативный свиной катепсин Н обладал эндопептидазной активностью, выражающейся в гидролизе связи Glu13-Ala14, являющейся

предпочтительной для рекомбинантного фермента. Данное наблюдение подтверждается результатами, опубликованными в работах Л.А. Локшиной (1985) и Н. Кoga (1992).

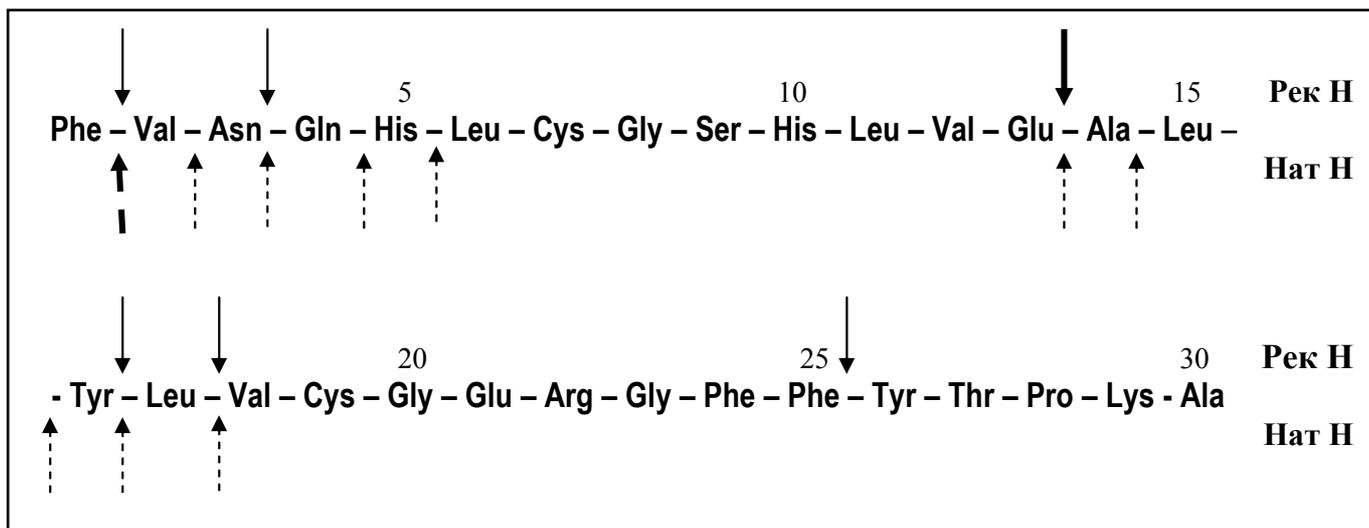
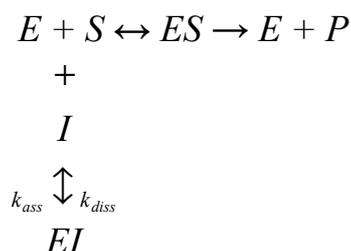


Рис. 4. Сайты гидролиза β -цепи инсулина рекомбинантным (**Рек Н**) и нативным свиным (**Нат Н**) катепсинами Н.

Пептидные связи β -цепи инсулина подвергающиеся гидролизу рекомбинантным и нативным катепсинами Н обозначены сплошной и штриховой стрелками соответственно, главные сайты гидролиза – полужирными.

Кинетика ингибирования рекомбинантного катепсина Н человека

Кинетика ингибирования рекомбинантного катепсина Н человека специфичными ингибиторами лизосомальных цистеиновых протеиназ, цистатинами представляет собой обратимое конкурентное ингибирование и описывается следующей моделью:



где k_{ass} и k_{diss} – константы ассоциации и диссоциации комплекса фермента с ингибитором. Взаимодействие рекомбинантного катепсина Н человека с куриным цистатином, стефином А и стефином В было изучено с помощью добавления фермента к смеси ингибитора и флюорогенного субстрата (Bz-Phe-Val-Arg-AMC) с последующей фиксацией выхода продукта [P] измерением флюоресценции. В результате нами были получены типичные двухфазные кривые, имеющие экспонентную форму, типичную для конкурентного ингибирования. В контрольном эксперименте – при отсутствии ингибитора – флюоресценция нарастала линейно, подтверждая стабильность фермента во время эксперимента.

Полученные данные были проанализированы с помощью нелинейного регрессионного анализа по Моррисону (1982):

$$[P] = v_s \cdot t + (v_o - v_s) \cdot (1 - e^{-kt}) / k ,$$

где v_s – скорость равновесного процесса, v_o – начальная скорость гидролиза и k – константа скорости кинетики первого порядка, описывающая начальную фазу реакции.

Значения констант ингибирования, рассчитанные по [Turk B. et al., 1993], в сравнении с литературными данными представлены в табл. 2.

Таблица 2

Константы ингибирования рекомбинантного катепсина Н человека цистатинами в сравнении с литературными данными [Pol E., Bjork J. 1999; Turk B. et al., 1995]

| Фермент | Ингибитор | k_{ass} ($M^{-1}c^{-1}$) ($\times 10^{-6}$) | K_i (пМ) | k_{diss} (c^{-1}) ($\times 10^4$) |
|------------------------------------|-----------------------------|---|-------------|---|
| Рекомбинантный катепсин Н человека | Стефин А человека | $4,0 \pm 0,4$ | 99 ± 14 | 3,9 |
| | Стефин В человека | $3,5 \pm 0,3$ | 74 ± 5 | 2,6 |
| | Куриный цистатин | $1,0 \pm 0,06$ | 45 ± 3 | 0,45 |
| Нативный катепсин Н | Бычий стефин А ¹ | 1,7 | 520 | 9,0 |
| | Бычий стефин В ² | 2,1 | 440 | 9,2 |

Примечание. ¹ Pol E. and Bjork J. (1999); ² Turk B. et al., (1995).

Константы ингибирования (K_i) рекомбинантного катепсина Н человека куриным цистатином, стефином А и стефином В составили 45 пМ, 99 пМ и 74 пМ соответственно. В сравнении с данными для нативных ферментов [Pol E. and Bjork J., 1999; Turk B. et al., 1995] ингибирование рекомбинантного катепсина Н происходило примерно в два раза быстрее: значения k_{ass} для стефинов были выше $3,5 \times 10^{-6} M^{-1}c^{-1}$ и с формированием более плотного комплекса ($K_i < 100$ пМ).

Таким образом, в данной работе был впервые успешно выделен рекомбинантный человеческий катепсин Н. Нами было показано, что проформа данного фермента, экспресированная в *Escherichia coli*, способна к аутокаталитическому процессингу, выраженному в формации активной формы катепсина Н, лишенной октапептида. Наши результаты экспериментально подтвердили, что наличие мини-цепи в структуре молекулы катепсина Н является решающим для его специфичности. На основе пространственной структуры катепсина Н [Gunčar et al., 1998] нами было доказано, что отсутствие октапептида ведет к «открытию» активного центра и таким образом выражается в эндопептидазной активности проявляемой данным ферментом. С другой стороны, эндопептидазная активность нативных препаратов катепсина Н может быть объяснена наличием не-гомогенного материала на предмет присутствия октапептида в активном центре.

Исследование аутокаталитического процессинга прокатепсина S

Подобно катепсину Н конформационно свернутый рекомбинантный прокатепсин S был способен к аутопроцессингу в активный фермент. Исследование скорости процессинга рекомбинантного прокатепсина S человека в

присутствии гепарина, декстрансульфата, гепарансульфата, хондроитинсульфата В и полилизина показало, что, как и для катепсина Н, наибольший эффект на скорость активации профермента оказывает декстрансульфан в концентрации 25 мкг/мл: активность процессированного в течение 10 мин фермента различалась примерно в 10 раз с контролем в отсутствии гликозаминогликана.

Учитывая, что для катепсина S характерна исключительная стабильность и активность в нейтральной среде, нами было проведено исследование процесса аутокаталитической активации прокатепсина S в зависимости от рН среды в отсутствии и присутствии декстрансульфата. Описание рН профиля процессинга рекомбинантного прокатепсина S проводили путем активации профермента добавлением 2,5 мМ ДТТ в буферы, обладающие рН от 3,0 до 9,0 (цитратный буфер рН 3,0 – 6,0; фосфатный буфер рН 6,5 и ТрисНСl буфер рН 7,0 – 9,0) и инкубацией смеси при 37 °С в течение 30 и 60 мин и в течение 15 и 30 мин в присутствии декстрансульфата с концентрацией 25 мкг/мл. Полученные результаты свидетельствовали, что процессинг прокатепсина S наиболее эффективно происходил в пределах значений рН 4,0 – 5,0 с рН спектром, подобным другим лизосомальным протеиназам, тогда как рН профиль аутокаталитической активации прокатепсина S в присутствии декстрансульфата характеризовался двумя максимумами: в кислотной (4,5 – 5,5) и нейтральной среде (7,0 – 8,0). Последнее наблюдение является особенно важным, так как до настоящего времени считалось, что лизосомальные цистеиновые протеиназы способны к активации исключительно лишь в кислотной среде. Сравнительный спектр процессинга прокатепсина S в отсутствии и присутствии декстрансульфата наглядно показывает смещение первого пика активации и появление второго пика в нейтральной среде для процессинга в присутствии гликозаминогликана (рис. 5).

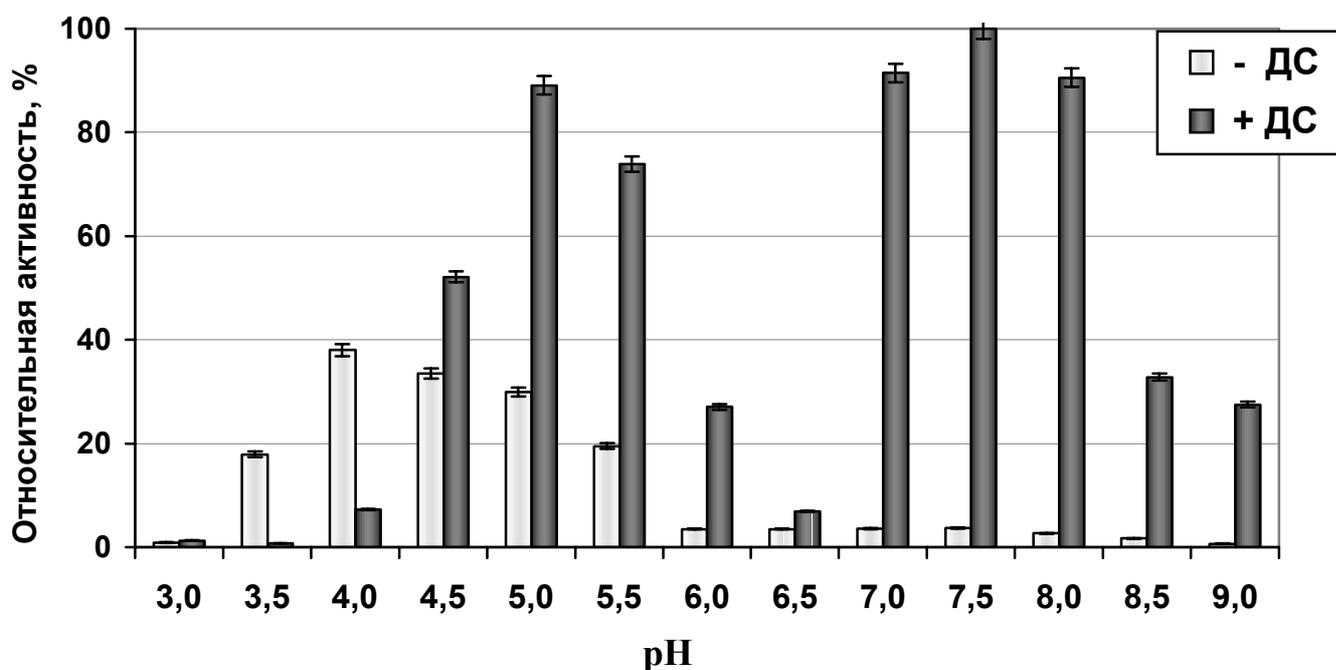


Рис. 5. Сравнительный рН профиль активности катепсина S после 30 мин инкубации при 37 °С в отсутствии (-ДС) и присутствии (+ДС) декстрансульфата. Данные стандартизованны относительно максимальной активности, соответствующей рН 7,5 в присутствии декстрансульфата

Визуализация процесса аутокаталитической активации прокатепсина S в активную форму фермента в слабощелочной среде (pH 8,0), проведенная с помощью SDS-ПААГ электрофореза, дополнительно подтверждала кинетические исследования активности процессинга прокатепсина S.

Для определения времени полного процессинга ($t_{1/2}$) рекомбинантного прокатепсина S человека в кислотной и нейтральной среде в присутствии декстрансульфата, нами был использован прерывный метод измерения активности процессированного фермента (рис. 6).

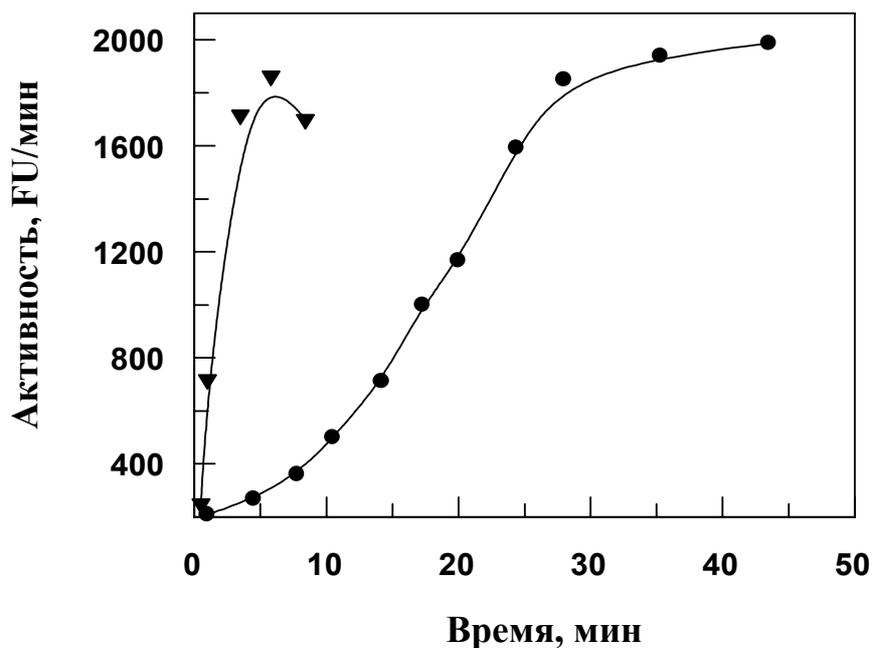


Рис. 6. Активность зрелого катепсина S в процессе аутокаталитической активации рекомбинантного профермента при 37 °С в 25 мМ ТрисНСI буфере, pH 7,0 (●) и в 25 мМ цитратном буфере, pH 5,0 (▼) в присутствии декстрансульфата

Как показано на рис. 6, кривая процессинга рекомбинантного прокатепсина S человека, подобно катепсину Н, имеет сигмоидальную форму, что подтверждает гипотезу о бимолекулярной природе данного процесса. Значения $t_{1/2}$ процессинга рекомбинантного прокатепсина S человека при величинах pH среды 5,0 и 7,5, соответствующих максимальным значениям активности катепсина S в спектре процессинга прокатепсина S при различных значениях pH (рис. 5), составляли ~4 и ~25 мин (рис. 6) соответственно. В сравнении с данными для рекомбинантного прокатепсина Н человека скорость активации прокатепсина S при физиологическом значении pH является достаточно высокой и сравнима с таковой для прокатепсина Н в кислой среде, являющейся оптимальной для всех лизосомальных цистеиновых протеиназ. Таким образом, полученные нами результаты свидетельствуют о несомненной важности открытия процесса аутокаталитической активации прокатепсина S в нейтральной среде, а следовательно, и возможности протекания данного процесса за пределами лизосом в физиологических условиях.

Принимая во внимание значительное влияние гликозаминов на скорость процессинга лизосомальных цистеиновых протеиназ, нами было изучено влияние

декстрансульфата на активность катепсина S. В данном эксперименте декстрансульфат был добавлен к раствору катепсина S, активированному без добавления гликозаминогликанов. В результате в сравнении с исходной активностью катепсина S комплекс катепсин S/декстрансульфат не обладал статистически значимыми различиями в уровне проявляемой активности.

Принимая во внимание отсутствие эффекта декстрансульфата на уровень активности катепсина S и высокий отрицательный заряд? сконцентрированный на его поверхности, можно предположить вовлечение ионных сил раствора в механизм каталитического действия гликозаминогликанов на процессинг прокатепсина S. Для подтверждения данной гипотезы, нами было изучено влияние ионной силы раствора на скорость процессинга при величинах pH среды, соответствующих максимальным значениям активности катепсина S в кислотной и нейтральной среде: 5,0 и 7,5 в присутствии декстрансульфата и 4,0 – в его отсутствии. Ионная сила растворов была рассчитана с помощью компьютерной программы “Java Buffer Calculator” и регулировалась добавлением ионов NaCl. При сравнении полученных данных (рис. 7), можно сделать вывод, что наибольшее значение ионная сила раствора процессинга имеет при аутокаталитической активации профермента в нейтральной среде, в то время как при отсутствии декстрансульфата вклад исследованного показателя является минимальным.

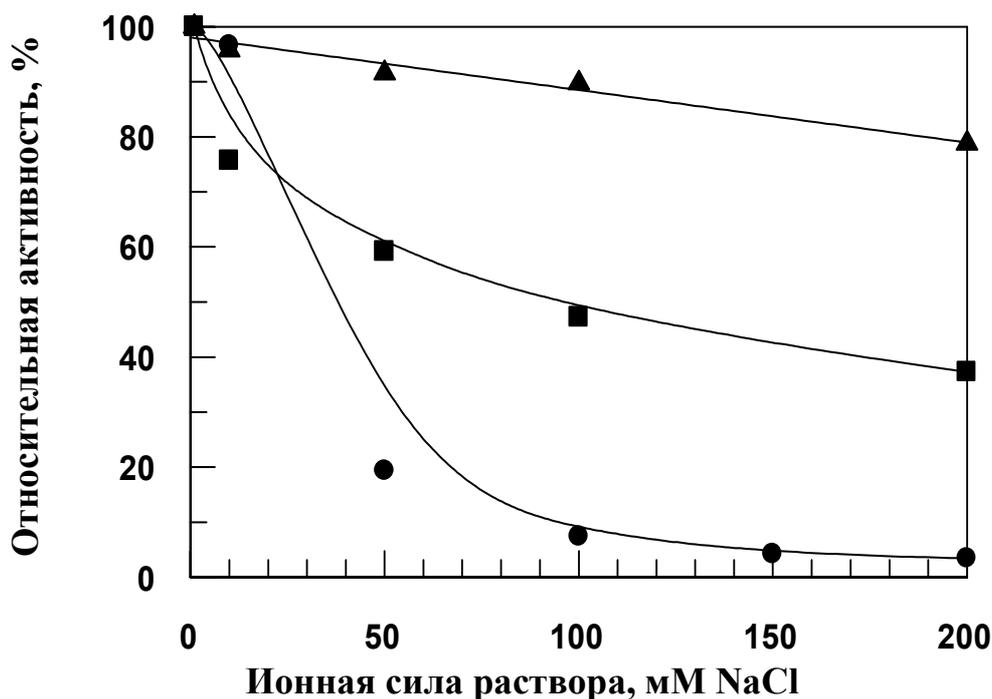


Рис. 7. Сравнительная диаграмма зависимости активности процессированного катепсина S от ионной силы раствора.

Прокатепсин S был инкубирован при 37 °С в 25 мМ ТрисHCl буфере, pH 7,0 (●), в 25 мМ цитрат-фосфатном буфере, pH 5,0 (■) и pH 4,0 (▲) в присутствии и отсутствии декстрансульфата соответственно

Результаты исследования скорости процесса аутокаталитической активации прокатепсина S в нейтральной среде в присутствии различных буферных систем при физиологическом pH и значением ионной силы растворов, равной 25 мМ,

уравновешенной добавлением ионов NaCl, показали, что эффективность процессинга в использованных буферах различается незначительно. Более высокая скорость аутоактивации была отмечена для ТрисHCl, ADA и PIPES буферных систем, тогда как для буферных систем TES и BES были отмечены более низкие показатели процессинга профермента. Выявленные различия в скорости аутокаталитической активации, вероятно, объясняются воздействием компонентов буферных систем на внутренние гидрофобные связи, важных как для взаимодействия пропептида с активным центром фермента, так и для стабильности фермента [Turk V. et al., 1994], что, в свою очередь, влияет на эффективность процессинга прокатепсина.

Таким образом, нами впервые была обнаружена уникальная способность прокатепсина S человека к процессингу в нейтральной среде. Возможность протекания процесса аутокаталитической активации в физиологических условиях является, несомненно, важным открытием, которое может служить основой для более подробного изучения функций катепсинов во внутри- и межклеточном пространстве как в физиологических, так и при множестве патологических состояний.

ВЫВОДЫ

1. Экспрессированные в *E. coli* рекомбинантные прокатепсины Н и S здорового человека способны к аутокаталитической активации в зрелый фермент, с увеличением скорости данного процесса в присутствии гликозаминогликанов. Наиболее выраженным эффектом при этом обладает декстрансульфат в концентрации 25 мкг/мл.

2. В условиях *in vitro* рекомбинантный прокатепсин Н человека аутокаталитически процессируется в активный фермент, лишенный характерной лишь для данного фермента структуры – октапептида (мини-цепь).

3. Рекомбинантный катепсин Н, лишенный мини-цепи, характеризуется высокой эндопептидазной активностью в отношении синтетических субстратов и β -цепи инсулина. При этом значения констант гидролиза синтетических субстратов в отношении эндопептидазного субстрата повысились более чем в 40 раз, а для экзопептидазного - снизились в 15 раз по сравнению с таковыми для нативного фермента.

4. В сравнении с данными для нативных ферментов ингибирование рекомбинантного катепсина Н происходит более чем в 2 раза быстрее ($k_{ass} > 3,5 \times 10^{-6} \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$) и с формированием более плотного комплекса фермента и ингибитора ($K_i < 100 \text{ пМ}$).

5. В дополнение к типичному для всех цистеиновых протеиназ максимуму аутоактивации в кислой среде рекомбинантный прокатепсин S человека характеризуется уникальной способностью к аутопроцессингу при физиологических значениях среды (pH 7,0 – 8,0).

6. Влияние ионной силы раствора на процессинг рекомбинантного прокатепсина S человека особенно выражено в присутствии декстрансульфата, тогда как различные буферные системы значимого влияния на эффективность данного процесса не оказывают.

Список работ опубликованных по теме диссертации

1. Васильева О.С., Серебров В.Ю., Долинар М., Турк Б., Турк В. Выделение и активация человеческого прокатепсина Н экспресированного в *Escherichia coli* // Сборник научных работ "Актуальные проблемы медицинской биологии" (Томск 2002 г.) - С. 97-98.
2. Васильева О.С., Серебров В.Ю., Долинар М., Турк В., Турк Б. Экспрессия и характеристика рекомбинантного человеческого катепсина Н, выделенного в *Escherichia coli* // Труды Всероссийской конференции "Проблемы медицинской энзимологии", "Современные технологии лабораторной диагностики нового столетия" (Москва 28 - 31 мая 2002 г.) - С. 50-51.
3. Васильева О.С., Серебров В.Ю., Турк Б., Турк В. Изучение механизма аутокаталитической активации прокатепсина Н *in vitro* // Электронный журнал "Исследовано в России" - 2002 - №100 - С.1092-1102 - <http://zhurnal.ape.relarn.ru/articles/2002/100.pdf>.
4. Vassilieva O., Dolinar M., Mozetich-Francky B., Klemencic I., Leonardi A., Zerovnik E., Turk V., Turk B. Folding, activation and characterization of recombinant human cathepsin H produced in *Escherichia coli* // 4th Meeting of the Slovenian Biochemical Society with international participation (September 13-15, Kranjska Gora, Slovenia) Book of abstracts. 2001, P. 39.
5. Vassilieva O., Dolinar M., Klemencic I., Leonardi A., Zerovnik E., Turk V., Turk B. Interactions of recombinant human cathepsin H with substrates and cystatins // VIIth International Symposium on Proteinase Inhibitors and Biological Control (June 16 – 20, 2001, Brdo, Slovenia) Book of abstracts 2001, P. 68.
6. Vassilieva O.S., Dolinar M., Stefe I., Serebrov V. Iu., Turk V. and Turk B. Recombinant human cathepsin H lacking the mini-chain is an endopeptidase // Book of abstracts for 3rd International Conference on Cysteine Proteinases and their Inhibitors, Portoroz, Slovenia, 14-18 September 2002, P 66.
7. Vassilieva O.S., Dolinar M., Serebrov V. Iu., Turk V. and Turk B. Autocatalytic processing of recombinant procathepsin S *in vitro* // Book of abstracts for 3rd International Conference on Cysteine Proteinases and their Inhibitors, Portoroz, Slovenia, 14-18 September 2002, P. 67.
8. Rozman-Pungercar R., Kopitar Jerala N., Turk D., Vassilieva O.S., Stefe I., Bromme D., Fonovic M., Dolenc I., Turk V., Turk B., et al. When reaction mechanism is more important than substrate specificity: Inhibition of papain-like cysteine proteases and legumain by "caspase-specific" inhibitors // Book of abstracts for 3rd International Conference on Cysteine Proteinases and their Inhibitors, Portoroz, Slovenia, 14-18 September 2002, P. 31.
9. Rozman-Pungercar J., Kopitar Jerala N., Turk D., Vassilieva O.S., Stefe I., Bromme D., Turk V., Turk B. et al. Inhibition of papain-like cysteine proteases and legumain by "caspase-specific" inhibitors // Book of abstracts for 3rd International Conference on Cysteine Proteinases and their Inhibitors, Portoroz, Slovenia, 14-18 September 2002, P. 90.
10. Oreshich K., Droga-Mazovec G., Cirman T., Rozman-Pungercar J., Stefe I., Vassilieva O.S., Stoka V., Turk V., Turk B. et al. Cleavage of Bid by lysosomal cathepsins induces cytochrome c release from mitochondria and caspase-3 activation

// Book of abstracts for 3rd International Conference on Cysteine Proteinases and their Inhibitors, Portoroz, Slovenia, 14-18 September 2002, P. 91.