



УДК 577.152.344

ОСОБЕННОСТИ ГИДРОЛИЗА ХИМЕРНЫХ БЕЛКОВ ЭНТЕРОПЕПТИДАЗОЙ ПО СПЕЦИФИЧЕСКОМУ ЛИНКЕРУ (Asp)₄Lys В ЗАВИСИМОСТИ ОТ УСЛОВИЙ РЕФОЛДИНГА

© 2000 г. Е. Д. Шибанова[#], А. Г. Михайлова, С. Л. Александров, Л. Д. РумшИнститут биоорганической химии им. М.М. Шенякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
117871, Москва, ГСП-7, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

Поступила в редакцию 25.11.99 г. Принята к печати 17.03.2000 г.

Проведен рефолдинг из тел включения химерных белков, содержащих специфический для расщепления энтеропептидазой линкер (Asp)₄Lys. Показано, что в зависимости от условий рефолдинга химерные белки выступают в роли субстратов либо ингибиторов по отношению к энтеропептидазе. Предполагается, что эффективность гидролиза энтеропептидазой химерных белков, содержащих линкер (Asp)₄Lys, определяется не только аминокислотной последовательностью области связывания белка с ферментом, но и ее конформацией.

Ключевые слова: химерные белки; фолдинг; ограниченный протеолиз; энтеропептидаза.

ВВЕДЕНИЕ

Развитие техники рекомбинантных ДНК открыло новую эру в получении белков как для практического их применения, так и для фундаментальных исследований. Синтез рекомбинантных белков трансформированными клетками микроорганизмов, казалось, станет неограниченным источником редких, необходимых в препаративных количествах белков, которые трудно выделить методами белковой химии из природных источников. Однако не для всех белков прямая экспрессия их генов в клетках *Escherichia coli* приводит к желаемому результату.

Для наработки чужеродных белков в клетках *E. coli* часто используется подход, при котором синтез химерных молекул происходит с гибридных генов. В продуктах экспрессии таких генов белок-носитель соединен с целевым полипептидом линкером, обеспечивающим проведение ферментативного гидролиза пептидной связи между линкером и целевым белком высокоспецифичной протеиназой. Удобным для этой цели протеолитическим ферментом является сериновая протеиназа – энтеропептидаза (КФ 3.4.21.9), гидролизующая пептидную связь между остатками Lys и Ile только после пентапептидного фраг-

мента -(Asp)₄Lys-, который в природе присутствует лишь в трипсиногенах.

Однако не всегда удается достигнуть высокого выхода целевых белков. Основные причины низкой эффективности этого биотехнологического процесса связаны с актуальными и интенсивно исследуемыми на сегодняшний день проблемами – проблемой рефолдинга белков и проблемой структурной специфичности протеиназ.

Большинство рекомбинантных белков, нарабатываемых в клетках *E. coli*, формируют в цитоплазме нерастворимые тела включения. Это ставит задачу их эффективного рефолдинга, и далее – получения их устойчивой растворимой формы в достаточно высоких концентрациях (>10⁻⁵ М). Только в этом случае условия реакции ферментативного гидролиза химерного белка (соотношение фермент/субстрат, время проведения реакции, объем реакционной смеси), особенно в случае применения высокоспецифичных протеиназ, позволяют получить отщепляемый целевой продукт в препаративных количествах.

В последние годы накапливается все больше фактов, свидетельствующих о неоднозначности ферментативного гидролиза гибридных белков, а порой и об их устойчивости к действию специфических протеиназ [1, 2]. Вероятно, эти проблемы обусловлены тем, что эффективность ограниченного протеолиза химерных белков по заданной связи определяется не только первичной структурой их линкера, но и микроокружением расщепляемой связи, определяемым как первичной, так и третичной структурой полипептидной цепи вокруг линкера. Яркий пример этому – практически

Сокращения: IFN – фрагмент γ-интерферона человека; HAV – белок области VP1 вируса гепатита А; HIV – протеиназа вируса иммунодефицита человека; HIV_R – протеиназа, соединенная в единую молекулу с ревертазой вируса иммунодефицита человека; Nfa – нафтиламид.

[#] Автор для переписки (тел.: (095) 330-63-74; e-mail: shib@enzyme.siocb.ras.ru).

Таблица 1. Сравнительные данные по эффективности гидролиза энтеропептидазой химерных белков, содержащих линкер (Asp)₄Lys

Химерный белок	Белок-носитель (M, кДа)	Целевой белок (M, кДа)	Молярное соотношение E : S	Эффективность гидролиза*, %	Ссылки
GAL-Enk	β-Галактозидаза (116)	[Leu ⁵]энкефалин (0.5)	1 : 300	0.5	[3]
GAL-3CPV	β-Галактозидаза (116)	Субстрат 3С-протеиназы (11)	1 : 150	0	[10]
GAL-VIP	β-Галактозидаза (116)	Вазокишечный пептид (1.35)	1 : 300	0.1	[3]
TNF-P	Фактор некроза опухоли (16.8)	Ала-аналоги вещества Р (1.4)	1 : 100	0.01	[3]
PrA-P26	Фрагмент белка А (12)	Рековерин (26)	1 : 4000	12	[4]
PrA-GKN	Фрагмент белка А (12)	Ала-гуанилаткиназа (30)	1 : 500	0.5	[5]
PrA-FaD	Фрагмент белка А (12)	Фактор дифференцировки (8.2)	1 : 700	0.07	[6]
[DYK]-IL2	AspTyrLys (0.3)	Интерлейкин-2 (18)	1 : 80	0.01	[7]
TRX-IL2	Тиоредоксин (18)	Интерлейкин-2 (21)	1 : 9000	1	[8]
Активная петля TRX	N-Концевой фрагмент тиоредоксина	C-Концевой фрагмент тиоредоксина	1 : 2000	2.5	[8]
IFN-HAV	Фрагмент γ-интерферона (11)	Антигенная детерминанта вируса гепатита А (44)	1 : 100	0.006	[9]
IFN-HIV _R	Фрагмент γ-интерферона (11)	Протеиназа HIV, соединенная в единую молекулу с ревертазой (44)	1 : 180	0.01	[9]
IFN-HIV	Фрагмент γ-интерферона (11)	Протеиназа HIV (13)	1 : 180	0.02	[9]
Трипсиноген быка	Val-(Asp) ₄ Lys-трипсин (24)		1 : 2500	400	[3]

* Эффективность гидролиза – количество субстрата, которое может быть гидролизовано 10^{-8} M энтеропептидазой за 2 ч.

абсолютная специфичность энтеропептидазы в отношении линкера -(Asp)₄Lys- при процессинге трипсиногена и неоднозначность, непредсказуемость результатов гидролиза по этому же линкеру ряда химерных белков (табл. 1).

Кроме того, следует отметить, что при рефолдинге рекомбинантных белков нельзя исключить образование набора стабильных в растворе структур этих белков, часть из которых устойчива к действию энтеропептидазы, что может существенным образом сказываться на эффективности протеолиза и выходе целевых продуктов.

В связи с вышеизложенным актуальной задачей представляется исследование кинетики и особенностей расщепления химерных белков под действием энтеропептидазы в зависимости от условий их рефолдинга, чему и посвящена данная работа.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для решения поставленной задачи нами были исследованы особенности гидролиза созданных ранее [9] химерных белков, содержащих специфический для действия энтеропептидазы линкер, после получения их устойчивой растворимой формы при рефолдинге в разных условиях. Исследуемые в настоящей работе белки состояли из фрагмента γ-интерферона (IFN; M 11770 Да) в качестве белка-носителя и целевых белков: белка области

VP1 вируса гепатита А (HAV; M 44640 Да); протеиназы вируса иммунодефицита человека (HIV), соединенной в единую молекулу с ревертазой (HIV_R; M 21030 Да), и собственно протеиназы HIV

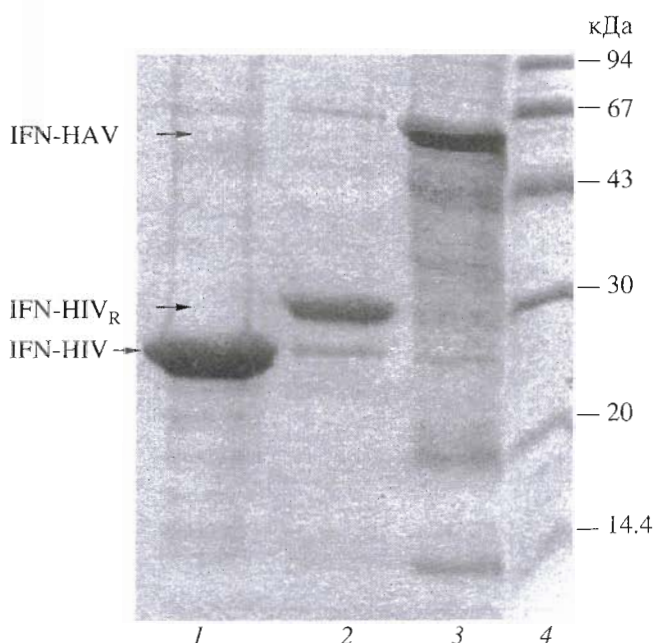


Рис. 1. SDS-электрофорез в 12% ПААГ химерных белков IFN-HIV (1), IFN-HIV_R (2) и IFN-HAV (3) после их очистки в виде тел включения; (4) – маркеры молекулярного веса.

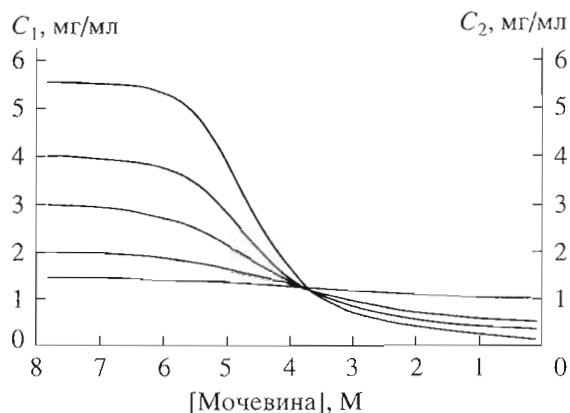


Рис. 2. Зависимость концентрации растворимой формы химерного белка IFN-HAV после рефолдинга (C_2) в 10 мМ Трис-HCl-буфере, pH 7.5, от начальной концентрации химерного белка (C_1) в денатурирующем буфере, содержащем 8 М мочевины и 1 мМ дитиотреит (денатурация в течение 20 ч).

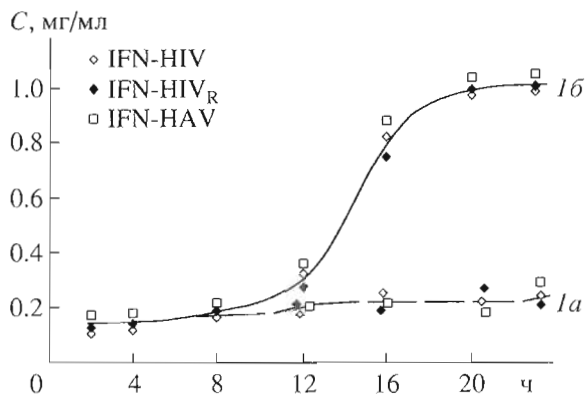


Рис. 3. Образование устойчивой растворимой формы химерных белков в 10 мМ Трис-HCl-буфере, pH 7.5, после диализа при 20–22 (1а) и 6–8°C (1б) в зависимости от времени денатурации (10 мМ Трис-HCl-буфер, pH 7.5, содержащий 8 М мочевины и 1 мМ дитиотреит).

(M 10940 Да). При экспрессии соответствующих рекомбинантных генов в клетках *E. coli* HB101 синтезировалось до 30% химерных белков от суммарного количества белков клетки, которые формировали в цитоплазме тела включения (рис. 1).

Рефолдинг химерных белков из тел включения

Денатурацию химерных белков проводили инкубацией тел включения в Трис-HCl-буфере, pH 7.5, содержащем 8 М мочевины, 1 мМ дитиотреит, при комнатной температуре в течение различных периодов времени. В этих условиях концентрация растворимой формы белка из тел включения могла достигать 8–10 мг/мл. Однако при последующем рефолдинге не удавалось сохранить в растворе такую же концентрацию химерного белка, что было показано при проведе-

нии ступенчатого диализа против 100-кратного объема Трис-HCl-буфера, pH 7.5, содержащего последовательно 6, 4, 2 М мочевины и не содержащего ее вовсе (рис. 2). Эти данные свидетельствуют, что растворение тел включения в буфере с 8 М мочевиной до концентрации более 1–1.5 мг/мл приводило при последующем рефолдинге к выпадению основного количества белка в осадок. Концентрация растворимой формы химерных белков при этом составляла 100–150 мкг/мл. Поэтому в дальнейшем тела включения растворяли в буфере с 8 М мочевиной до концентрации 1–1.5 мг/мл.

Рефолдинг химерных белков проводили в разных условиях (табл. 2).

1. В первом случае раствор денатурированного белка диализовали против 10 мМ Трис-HCl-буфера, pH 7.5, в течение 20 ч при температуре 22 (а) или 6–8°C (б).

Таблица 2. Гидролиз энтеропептидазой химерных белков IFN-HAV, IFN-HIV и IFN-HIV_R после их рефолдинга в разных условиях

Условия рефолдинга		Концентрация белка в растворе после рефолдинга, мкг/мл	Реакция гидролиза энтеропептидазой, 37°C, 20 ч		
			Молярное соотношение E : S	Выход продуктов гидролиза, % от исходного белка (по данным электрофореза)	Отношение к энтеропептидазе
1. Диализ (20 ч)	(а) 20–22°C	100–150	1 : 100	40–60	Субстрат
	(б) 6–8°C	800–1000	1 : 1000 1 : 100	– –	Ингибитор, K_i 10 ⁻⁶ М
2. Разбавление раствора денатурированного белка в 100 раз	(а) ультрафильтрация при 6–8°C	100–150	1 : 100	40–60	Субстрат
	(б) дополнительная очистка с помощью МАТ (только для IFN-HAV)	900–1100	1 : 1000 1 : 100	100 100	Субстрат

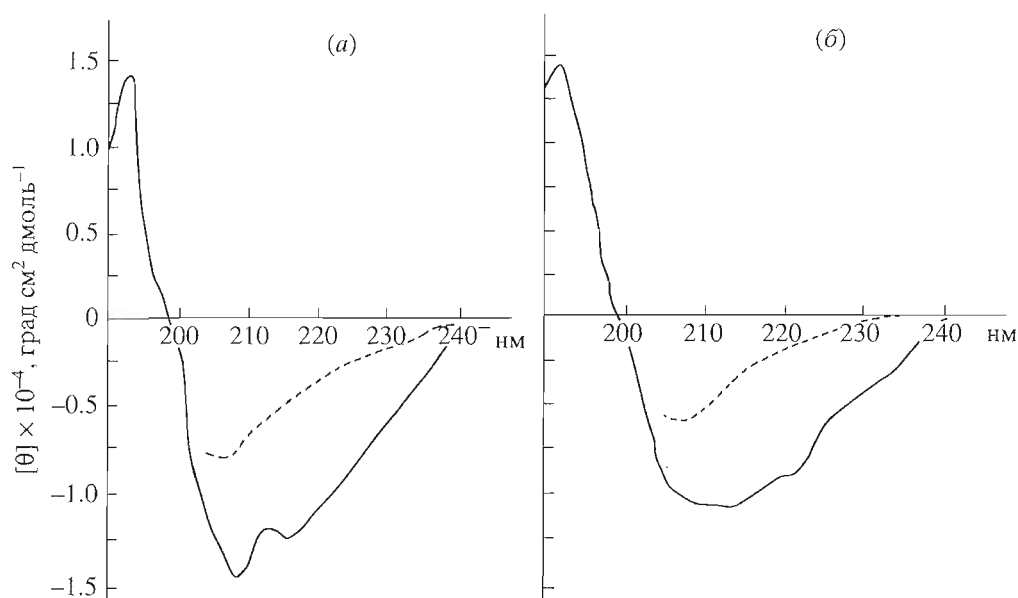


Рис. 4. Спектры КД химерных белков IFN-HIV (а) и IFN-HAV (б) в 10 мМ Трис-НСl-буфере, содержащем 8 М мочевины и 1 мМ дитиотреит (денатурированная форма, прерывистая линия), и после рефолдинга (растворимая форма, сплошная линия).

2. Во втором – раствор денатурированного белка разбавляли в 100 раз 10 мМ Трис-НСl-буфером, рН 7.5, инкубировали 16 ч при комнатной температуре, а затем подвергали ультрафильтрации (а) или дополнительной очистке с помощью моноклональных антител (только для химерного белка IFN-HAV) (б).

После диализа при 20–22°C (условия 1а) (рис. 3) или ультрафильтрации разбавленного раствора (условия 2а) концентрация белка в растворе составляла не более 150 мкг/мл. Диализ при 6–8°C (условия 1б) (рис. 3) или дополнительная очистка разбавленного раствора на аффинном сорбенте с моноклональными антителами (условия 2б) позволяли получить раствор белка с концентрацией 0.8–1.1 мг/мл.

Структура исследуемых белков в денатурирующих условиях и после рефолдинга была охарактеризована с помощью спектров КД (рис. 4). Для химерных белков IFN-HIV и IFN-HIV_R спектры КД практически не различались.

Спектры образцов в 8 М мочевины были прописаны только до 205 нм из-за высоких значений оптического поглощения. Оценка молярной эллиптичности при 222 нм α-спиральной составляющей свидетельствует о денатурации химерного белка в этих условиях (табл. 3).

Вид спектров КД химерных белков после рефолдинга соответствует большому содержанию β-складчатой структуры, хотя характеристические полосы α-спиральных структур также присутствуют (табл. 4). Различий в типах вторичной структуры химерных белков (расчет по програм-

ме CONTIN [11]), ренатурированных в разных условиях, выявлено не было.

Известно, что при рефолдинге белков *in vitro* в растворе могут возникать промежуточные нативноподобные устойчивые структуры, что непосредственно продемонстрировано методами ЯМР и масс-спектрометрии [12]. Несомненно, что рефолдинг химерных белков, состоящих из двух эволюционно сформировавшихся белков, не может протекать в одну стадию, то есть без образования в растворе промежуточных продуктов (хотя бы одного) [13, 14]. Различия между возникающими при этом нативноподобными структурами и нативными молекулами наиболее оче-

Таблица 3. Оценка молярной эллиптичности при 222 нм α-спиральной составляющей

Химерный белок	α-Спиральная структура	
	денатурированная форма	растворимая форма после рефолдинга
IFN-HIV	0.44	0.36
IFN-HAV	0.20	0.21

Таблица 4. Содержание в химерных белках вторичных структур, рассчитанных по программе CONTIN [11]

Химерный белок	α-Спиральная структура	β-Складчатая структура	Неупорядоченная структура
IFN-HIV	0.37	0.59	0.04
IFN-HAV	0.25	0.48	0.28

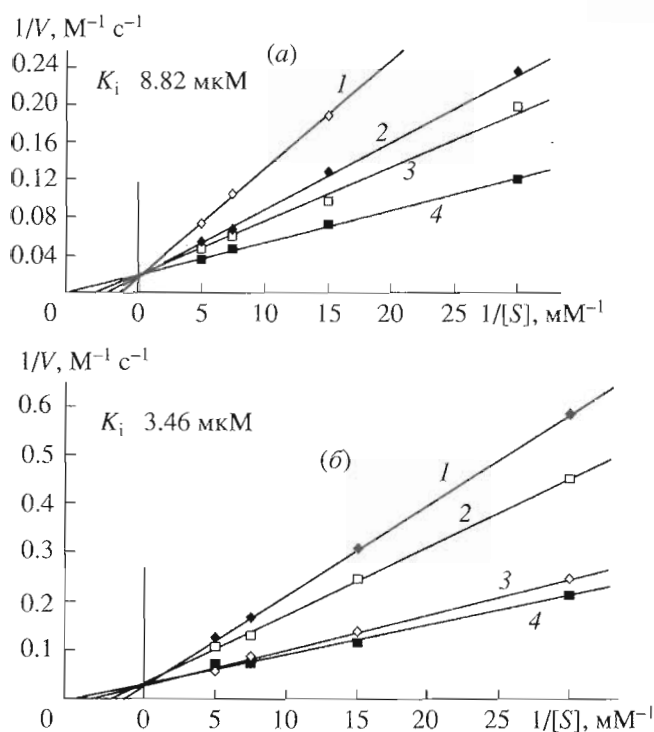


Рис. 5. Ингибирование химерными белками IFN-NAV (а) и IFN-HIV (б) гидролиза энтеропептидазой пептида Gly-(Asp)₄Lys-Nfa. Условия определения: 10 мМ Трис-НСl-буфер, рН 7.5, 20°C, [E] 2.6×10^{-8} М, [IFN-NAV] – 0.8×10^{-6} (1), 2.7×10^{-6} (2), 5.4×10^{-6} (3), 8.1×10^{-6} М (4); [IFN-HIV] – 0.9×10^{-6} (1), 4.2×10^{-6} (2), 8.3×10^{-6} (3), 12.2×10^{-6} М (4).

видно будут проявляться при осуществлении ими специфической биологической активности – ферментативной, реализации фермент-субстратных, лиганд-рецепторных или антиген-антительных взаимодействий.

Гидролиз энтеропептидазой химерных белков, полученных в разных условиях рефолдинга

Гидролиз энтеропептидазой химерных белков IFN-NAV, IFN-HIV и IFN-HIV_R проводили при 37°C в течение 20 ч при молярном соотношении E : S 1 : 100 или 1 : 1000 (см. табл. 2). При этом не более 60% химерного белка, полученного в растворимой форме после диализа при 22°C (условия 1а) или после разбавления и ультрафильтрации (условия 2а), подвергалось расщеплению с образованием соответствующих продуктов. Рефолдинг IFN-NAV с дополнительной очисткой на аффинном сорбенте (условия 2б) приводил к получению в растворе формы белка, способной к полному гидролизу. Растворимая форма химерных белков, полученная диализом при 6–8°C (условия 1б), оказалась устойчивой к действию энтеропептидазы.

На основе этих данных первоначально было сделано предположение, что при высоких ($\sim 10^{-5}$ М, т.е. ~ 1 мг/мл) концентрациях химерных белков в растворе, достигаемых при рефолдинге в условиях 1б, происходит образование растворимых агрегатов, которое препятствует связыванию энтеропептидазой линкера -(Asp)₄Lys-. Однако последующие исследования не подтвердили это предположение.

Во-первых, ферментативный гидролиз химерных белков энтеропептидазой при концентрациях $\sim 10^{-6}$ М, т.е. после их разбавления в 10 раз, или в присутствии 4 М мочевины, препятствующей формированию растворимых агрегатов, не приводил к появлению продуктов гидролиза.

Во-вторых, факт гидролиза (в тех же условиях проведения реакции) связи Arg-Pro в последовательности -(Asp)₄-Lys-Arg-Pro- химерных белков IFN-HIV_R и IFN-HIV, катализируемый протеиназой KEX2 из дрожжей [15], свидетельствует о доступности действию фермента области линкера (Asp)₄Lys.

В-третьих, не наблюдалось изменения спектров КД, поглощения в УФ-области и флуоресценции при разбавлении 10^{-5} М растворов химерных белков (данные не приведены), что также косвенно свидетельствует об отсутствии агрегатов исследуемых белков в растворе в концентрации 1.0–1.2 мг/мл ($\sim 10^{-5}$ М).

Далее было установлено, что исследуемые химерные белки являются конкурентными ингибиторами гидролиза низкомолекулярного синтетического флуорогенного субстрата энтеропептидазы Gly-(Asp)₄Lys-Nfa с K_i 10^{-6} М (рис. 5) и в концентрации 10^{-5} М полностью подавляют гидролиз энтеропептидазой расщепляемого химерного белка протеин А-(Asp)₄Lys-рековерин (PгA-P26; M 36000 Да) [4] (рис. 6). Это доказывает, что во всех случаях происходит связывание энтеропептидазы с химерными белками по специфическому линкеру, но в одних случаях происходит гидролиз, а в других – нет. Иными словами, химерный белок выступает то в роли субстрата, то в роли ингибитора.

Энтеропептидаза является высокоспецифичной протеиназой процессинга, реализующей конформационную специфичность в реакции гидролиза природного субстрата – трипсиногена [16, 17]. При этом последовательность -(Asp)₄Lys- обуславливает узнавание и связывание субстрата ферментом. Для последующего гидролиза, возможно, необходима последовательность -Ile-Val-Gly-, находящаяся непосредственно после линкера во всех трипсиногенах (<http://www4.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed/>), которая может обеспечивать нужную пространственную организацию области связывания субстрата с ферментом. Однако было показано, что

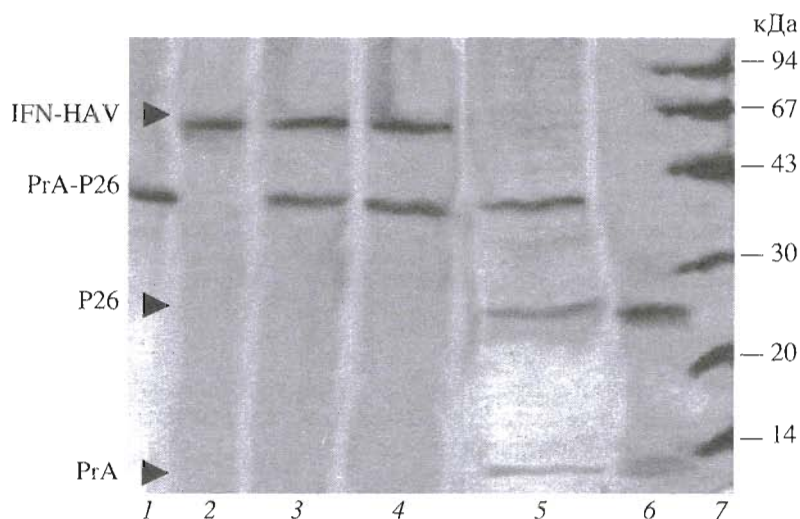


Рис. 6. SDS-электрофорез в 12% ПААГ продуктов гидролиза энтеропептидазой химерного белка PrA-P26 в присутствии химерного ингибитора IFN-HAV. [PrA-P26] 3.5×10^{-5} М, pH 7.5, 37°C, 9 ч; 1, 2, 3 – контроль, [E] 0: PrA-P26 (1), IFN-HAV (2) и их смесь (3); 4, 5, 6 – реакционная смесь, [E] 6.5×10^{-8} М: (PrA-P26 + IFN-HAV (1.9×10^{-5} М)) (4); (PrA-P26 + IFN-HAV (2.6×10^{-6} М)) (5); PrA-P26 (6); 7 – маркеры молекулярных масс.

замена остатка Ile в P_1' -положении в молекуле гидролизуемого химерного белка глутатион-S-трансфераза-(Asp)₄Lys-Ile-кальмодулин на любой другой (Хаа) не приводит к существенному изменению параметров гидролиза связи Lys-Хаа энтеропептидазой [18]. Поэтому более вероятно, что эффективность гидролиза определяется структурой всей молекулы трипсиногена в целом.

Очевидно, при рефолдинге химерного белка из тел включения образуется набор различных конформеров. Все они способны связываться с энтеропептидазой за счет последовательности -(Asp)₄Lys-. Часть из них способна к “продуктивному связыванию”, в результате чего происходит гидролиз химерного белка (т.е. он является субстратом). Другая часть, связываясь “непродуктивно”, не гидролизуется и является ингибитором.

Можно предположить, что у молекул химерного белка при концентрации 100–150 мкг/мл после рефолдинга (см. табл. 2), формируется такая пространственная структура, при которой он выступает в роли субстрата. Увеличение концентрации химерного белка в растворе после рефолдинга при 6–8°C объясняется, возможно, накоплением молекул в промежуточной конформации, достаточно стабильной и находящейся в локальном минимуме энергии. При этом химерный белок является ингибитором.

Дополнительная очистка химеры IFN-HAV с помощью моноклональных антител способствует сворачиванию химерного белка в целом [19]. При этом равновесие сдвигается в сторону образования конечной структуры из промежуточного состояния или происходит отбор антителами про-

межуточного состояния, соответствующего химерному субстрату. И тогда образуется стабильный в растворе химерный субстрат в высокой концентрации. Можно предположить, что взаимодействие химеры IFN-HAV с моноклональными антителами к HAV приводило к конформационным изменениям преимущественно окружения C-концевой области линкера. Заметим, что в трипсиногенах эта область содержит от одного до нескольких аминокислотных остатков, является подвижной и не имеет выраженной пространственной организации. Этот факт подчеркивает важность правильной конформации C-концевой части химерной молекулы для ее успешного гидролиза энтеропептидазой [20].

Схему рефолдинга химерных белков можно представить следующим образом (рис. 7). Химерный белок в виде тел включения под действием 8 М мочевины образует в растворе денатурированную форму (U). Снижение концентрации мочевины при разбавлении или диализе (точка перегиба графиков при снижении концентрации мочевины до ~3.8 М на рис. 2) приводит к быстрому свертыванию пептидного остова белковой цепи (этап 1) и формированию промежуточных продуктов (интермедиатов) рефолдинга I_1 и I_2 . На следующем значительно более длительном этапе свертывания полипептидной цепи (этап 2), вероятно, происходит последовательное формирование набора структур (I_n), отличающихся укладкой боковых цепей свертывающегося белка. Свертывание полипептидной цепи из промежуточного состояния I_1 приводит к образованию устойчивой растворимой формы химерного субстрата (N) при рефолдинге во всех приведенных ус-

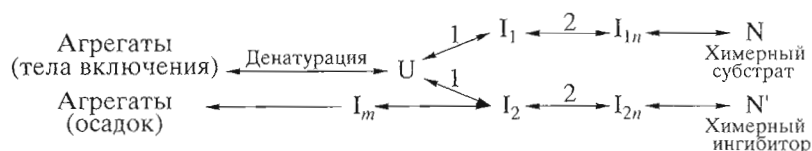


Рис. 7. Предполагаемая схема рефолдинга химерных белков. 1 – ранний этап сворачивания пептидного остова белковой цепи, происходящий за очень малое время (миллисекунды-секунды); 2 – этап длительной (часы-сутки) укладки боковых цепей и фрагментов вторичной структуры за счет дальних взаимодействий. U – денатурированная форма белка; I_1, I_2 – промежуточные продукты разных стадий рефолдинга белка; N – нативная форма белка; N' – нативноподобная форма белка.

ловиях. Свертывание промежуточного продукта I_2 в условиях рефолдинга 1а, 2а, б (см. табл. 2) приводит к агрегации молекул и их преципитации. И только в условиях диализа при температуре 6–8°C (условия 1б) последующие стадии свертывания промежуточного продукта I_2 приводят к образованию устойчивой формы химерного белка в растворе – химерного ингибитора (N').

Полученная в результате рефолдинга пространственная структура химерного субстрата обозначена как нативная (N), а химерного ингибитора – как нативноподобная (N'). Дополнительная очистка (рефолдинг) химеры IFN-(Asp)₄Lys-NAV с помощью моноклональных антител к NAV способствовала, вероятно, формированию конформации NAV, близкой к нативной, что привело к получению химерного субстрата. В этом случае именно он имеет больше оснований считаться нативной формой химеры. Ведь, по крайней мере, целевой белок в IFN-NAV находится в конформации, отобранной антителами и максимально соответствующей природной.

Это приводит к заключению, что химерный субстрат отличается от химерного ингибитора пространственной структурой области связывания.

Таким образом, с помощью высокоспецифичного фермента энтеропептидазы проведен отбор конформационно различающихся молекул химерных белков, возникающих при рефолдинге их из тел включения. Дальнейшее изучение таких белков, получаемых с помощью генной инженерии или химической модификацией, может стать инструментом для исследования механизма реализации конформационной специфичности энтеропептидазы.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использованы бычий трипсиноген и флуорогенный пептид Gly-(Asp)₄Lys-Nfa (Sigma, США); бычья энтеропептидаза получена А.Г. Михайловой (Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва) [21], моноклональные антитела к антигенной детерминанте области VP1 вируса гепатита А (НПО “Биотехнология” Приволжского ОП БХЗ).

Все используемые реактивы имели квалификацию “х. ч.” и “ос. ч.”.

Конструирование, экспрессия, выделение и очистка рекомбинантных химерных белков IFN-NAV, IFN-NIF_R и IFN-NIV проводились как описано в работе [3]. Химерный белок IFN-NIV получен Н.И. Дергоусовой (Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва). Химерные белки хранили при –20°C в 10 мМ Трис-НСl-буфере, pH 7.5.

Рефолдинг химерных белков (условия 1а, б, см. табл. 2) проводили диализом против 100-кратного объема 10 мМ Трис-НСl-буфера при температуре 20–22 или 6–8°C в течение 20 ч. Разбавление раствора денатурированного белка (рефолдинг в условиях 2а, б) проводили, добавляя его по каплям к 100-кратному объему 10 мМ Трис-НСl-буфера при постоянном перемешивании. Последующее концентрирование разбавленного раствора белка проводили ультрафильтрацией через мембрану YM 30 (Amicon) до исходного объема (условия рефолдинга 2а). Очистку на иммуоаффинном сорбенте химерного белка IFN-NAV проводили при нанесении его разбавленного раствора на 2 мл сорбента, белок IFN-NAV элюировали 20 мМ глициновым буфером, pH 2.5. Иммуоаффинный сорбент с использованием моноклональных антител против антигенной детерминанты области VP1 вируса гепатита А (NAV) получали на основе коммерческого препарата белок-А-сефарозы CL-4B (Pharmacia) по методике [22].

Гидролиз энтеропептидазой флуорогенного субстрата Gly-(Asp)₄Lys-Nfa и ингибирование его гидролиза устойчивыми к протеолизу химерными белками контролировали на спектрофлуориметре Hitachi (Япония) по возрастанию интенсивности флуоресценции β-нафтола ($\lambda_{эм}$ 410 нм, $\lambda_{возб}$ 330 нм). Реакцию проводили при 20°C в 10 мМ Трис-НСl-буфере, pH 7.5, при концентрации субстрата и энтеропептидазы 0.2 мМ и 0.1 мкМ соответственно. Концентрация химерных ингибиторов в пробах варьировалась в пределах 1–10 мкМ. Объем проб составлял 0.6 мл. Кинетические параметры гидролиза, включая константы ингибирования, определяли по методу Лайнуивера–Берка [23].

Гидролиз химерных белков проводили в 10 мМ Трис-НСl-буфере, pH 7.5. К 20 мкл исходного рас-

твора химерного белка с концентрацией 1–10 мкМ добавляли 2–3 мкл раствора энтеропептидазы с концентрацией 0.1 мкМ. Реакционную смесь инкубировали при 37°C в течение 20 ч.

Ингибирование протеолиза химерного белка PrA-P26 [3] химерными ингибиторами проводили в аналогичных условиях при концентрации химерных ингибиторов 1–10 мкМ.

Активность энтеропептидазы в отношении трипсиногена контролировали на спектрофотометре Gilford (США) модифицированным нами методом [21].

Спектры КД получены на дихрографе J-500C (JASCO, Япония).

Электрофорез реакционных смесей проводили в 12% SDS-ПААГ [24].

Авторы выражают благодарность И.А. Кудеиной за съемку спектров КД, Ю.Г. Молотковскому и И.В. Гречишниковой за предоставленную возможность и помощь в работе на флуориметре.

Настоящая работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 99-04-48362).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Nygren P.-A., Stahl S., Ulhen M. // Trends in Biotechnology. 1994. V. 12. P. 184–188.
- He M., Jin L., Austen B. // J. Protein Chem. 1993. V. 12. P. 1–5.
- Михайлова А.Г., Шибанова Е.Д., Руми Л.Д., Антонов В.К. // Биоорганич. химия. 1994. Т. 20. С. 883–893.
- Кутузов М.А., Шмуцер Б.Е., Суслов О.Н., Заргаров А.А., Абдулаев Н.Г. // Биоорганич. химия. 1992. Т. 18. С. 623–634.
- Гайдаров И.О., Суслов О.Н., Овчинникова Т.В., Абдулаев Н.Г. // Биоорганич. химия. 1994. Т. 20. С. 367–381.
- Костянян И.А., Астапова М.В., Старовойтова Е.В., Драницына С.М., Липкин В.М. // Биоорганич. химия. 1995. Т. 21. С. 243–248.
- Hopp T.P., Prickett K.S. // Bio/Technology. 1988. V. 6. P. 1204–1210.
- LaVallie E.R., DiBlasio E.A. // Bio/Technology. 1993. V. 11. P. 187–193.
- Шибанова Е.Д., Руми Л.Д., Александров С.Л. // Тез. IV симп. "Химия протеолитических ферментов". М.: ИБХ, 1997. С. 74.
- Саблина Е.П., Америк А.Ю., Антонов В.К. // Биоорганич. химия. 1991. Т. 17. С. 1201–1212.
- Provincher S.V. // Comput. Phys. Commun. 1982. V. 27. P. 229–242.
- Miranek A., Robinson C.V., Radford S.E., Dobson C.M. // FASEB J. 1996. V. 10. P. 93–101.
- Понов Е.М. // Проблема белка. М.: Наука, 1997. Т. 3. С. 459–466.
- Dill K.A., Chan H.S. // Nature Struct. Biol. 1997. V. 4. P. 10–19.
- Бессмертная Л.Я., Лойко И.И., Гончарова Т.И., Иванов Н.В., Руми Л.Д., Антонов В.К. // Биохимия. 1997. Т. 62. С. 993–1000.
- Light A., Janska H. // Trends Biochem. Sci. 1989. V. 14. P. 110–112.
- Михайлова А.Г., Руми Л.Д. // Биоорганич. химия. 1998. Т. 24. С. 282–287.
- Hosfield T., Lu Q. // Anal. Biochem. 1999. V. 269. P. 10–16.
- Carlson J.D., Yarmush M.L. // Bio/Technology. 1992. V. 10. P. 86–91.
- Александров С.Л. // Биоорганич. химия. 1994. Т. 20. С. 5–13.
- Mikhailova A.G., Rumsh L.D. // Appl. Biochem. Biotechnol. 1999 (in press).
- Schneider C. // J. Biol. Chem. 1982. V. 257. P. 10766–10769.
- Eisenthal R., Cornish-Bowden A. // Biochem. J. 1974. V. 139. P. 715–720.
- Laemmli U.K. // Nature. 1970. V. 227. P. 680–685.

Specific Features of Enteropetidase Hydrolysis of Chimeric Proteins at the Specific Linker (Asp)₄Lys Depending on the Refolding Conditions

E. D. Shibanova[#], A. G. Mikhailova, S. L. Aleksandrov, and L. D. Rumsh

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

Refolding from inclusion bodies of chimeric proteins containing the enteropetidase-specific linker (Asp)₄Lys was carried out. It was shown that, depending on the refolding conditions, chimeric proteins function as substrates or inhibitors of the enteropetidase. The efficiency of the enteropetidase hydrolysis of chimeric proteins containing the (Asp)₄Lys linker may depend not only on the amino acid sequence of the protein binding site for the enzyme but also on the site conformation.

Key words: chimeric proteins, folding, limited proteolysis, enteropetidase

[#] To whom correspondence should be addressed; phone: +7 (095) 330-6374; e-mail: shib@enzyme.siobc.ras.ru.

For the full text of English translation of this article, see *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2000, vol. 26, no. 7. It is also available (free) in PDF format through the Web Site <http://www.maik.rssi.ru/>.