

УКОРОЧЕННЫЕ ВАРИАНТЫ ОЛИГОПЕПТИДАЗЫ В ИЗ *Serratia proteamaculans* С ИЗМЕНЕННОЙ АКТИВНОСТЬЮ

© 2015 А.Г. Михайлова^{1*}, А.Н. Некрасов¹, А.А. Зинченко¹,
Т.В. Ракитина^{1,2,3}, Д.А. Корженевский², А.В. Липкин^{2,3},
О.А. Разгуляева¹, М.В. Овчинникова^{1,4}, В.А. Горленко⁴, Л.Д. Румш¹

¹ Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина
и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10;
факс: +7(495)335-7103, электронная почта: anna.mikhailova@ibch.ru

² Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт»,
123182 Москва, пл. Академика Курчатова, 1; факс: +7(499)196-1704

³ Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН, 119071 Москва,
Ленинский пр., 33, стр. 2; факс: +7(495)954-2732

⁴ Московский педагогический государственный университет,
119991 Москва, ул. М. Пироговская, 1, стр. 1

Поступила в редакцию 07.04.15
После доработки 02.06.15

Было установлено, что в присутствии 50%-ного глицерина обработка нативной психрофильной олигопептидазы В из *Serratia proteamaculans* (PSP, 78 кДа) растворимым или иммобилизованным на модифицированном кремнеземе MPG-РА химотрипсином приводит к образованию укороченной формы фермента (PSP-Chtr, ~66 кДа), которая сохраняет активность в отношении низкомолекулярного субстрата PSP – BAPNA и, в отличие от PSP, активна в отношении белкового субстрата – азоказеина. С помощью масс-спектрометрии MALDI-TOF было установлено, что в PSP-Chtr отсутствует N-концевая область молекулы, которая, предположительно, препятствует гидролизу высокомолекулярных субстратов. Кроме того, было установлено, что отсутствующий в PSP-Chtr фрагмент соответствует N-концевому элементу информационной структуры высшего ранга PSP, что подтверждает применимость метода анализа информационной структуры для белковой инженерии ферментов. Аналогичная обработка PSP иммобилизованным трипсином также приводила к образованию стабильной укороченной формы фермента (PSP-Tr, ~75 кДа), в которой отсутствовали 22 C-концевых аминокислотных остатка и которая полностью утрачивала ферментативную активность, предположительно, по причине изменения окружения His652 каталитической триады.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: олигопептидаза В, *Serratia proteamaculans*, ограниченный протеолиз, азоказеин, масс-спектрометрия MALDI-TOF, анализ информационной структуры аминокислотной последовательности белка.

Олигопептидаза В (КФ 3.4.21.83) (OpdB) – это трипсиноподобная сериновая пептидаза, принадлежащая к семейству пролилолигопептидаз, названному так по наименованию основоположника этого семейства, пролилолигопептидазы (клан SC, семейство S9) [1]. Отличительной особенностью этого семейства является наличие N-концевого β-пропеллерного домена, препятствующего проникновению в активный

центр объемных глобулярных белков, и каталитического домена, расположенного в C-концевой части молекулы. Предполагается, что OpdB гидролизует олигопептиды с молекулярной массой не более 3000 Да [2].

OpdB присутствуют в древних одноклеточных эукариотах: трипаносомах *Trypanosoma cruzi* [3], *T. brucei* [4] и *T. evansi* [5], а также в лейшманиях *Leishmania major* и *L. amazonensis* [6]. OpdB

Принятые сокращения: PSP – протеиназа из *Serratia proteamaculans*; OpdB – олигопептидаза В; BAPNA – *p*-нитроанилид N_α-бензоил-DL-аргинаина; ДМСО – диметилсульфоксид; Tr – трипсин; Chtr – химотрипсин; MPG-РА – модифицированный кремнезем; PSP-Chtr – продукт ограниченного протеолиза PSP химотрипсином; PSP-Tr – продукт ограниченного протеолиза PSP трипсином; буфер А – 0,1 М Tris-HCl-буфер, рН 8,0, 50 мМ CaCl₂; АНИС – анализ информационной структуры белка; ЭЛИС – элементы информационной структуры; а.о. – аминокислотные остатки.

* Адресат для корреспонденции.

являются важными факторами вирулентности при трипаносомных инфекциях (болезнь Шагаса, сонная болезнь, сурра) и лейшманиозах [5]. У млекопитающих гены, кодирующие этот фермент, отсутствуют. Поэтому OpdV протозойных паразитов являются специфическими терапевтическими мишенями для защиты от этих опасных инфекций. Гены, кодирующие OpdV, обнаружены и в прокариотах, а именно грамотрицательных бактериях *Escherichia coli* [7], *Moraxella lacunata* [8], *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* [9], *Serratia marcescens* и *Stenotrophomonas maltophilia* [10], микобактериях *Mycobacterium tuberculosis* и *M. leprae* [9], а также спирохетах *Treponema denticola* [11]. Первая OpdV из грамположительной бактерии *Rhodococcus erythropolis* была клонирована и исследована только в 2012 г. [10]. Представители олигопептидаз В были также обнаружены в высших растениях, например, в амброзии *Ambrosia artemisiifolia* [12]. На настоящий момент наиболее изучены OpdV из простейших. И только для этих ферментов были определены трехмерные структуры [13, 14]. Для большинства бактериальных OpdV известны лишь нуклеотидные последовательности, а пространственная структура и энзимологические характеристики отсутствуют, однако предполагается, что они также могут быть важными мишенями для антибактериальной химиотерапии [9].

Все ранее изученные OpdV, как протозойные, так и бактериальные, отличает высокая термостабильность [7, 15]. Объектом данного исследования является первая психрофильная OpdV — PSP, выделенная нами из грамотрицательного психротолерантного микроорганизма *Serratia proteamaculans*, клонированная и функционально охарактеризованная [16–20]. PSP, как и другие OpdV, гидролизует пептидные связи, образованные карбоксильными группами остатков Arg/Lys, с заметным предпочтением первого из них. Наиболее предпочтительными остатками в P2-положении субстрата также являются Arg или Lys [1, 18].

Особенностью OpdV является локализация каталитической триады (Ser532, Asp617 и His652 в случае бактериальных OpdV и, в частности, PSP), а также субстратсвязывающих центров S1 (Glu576 и Asp578) и S2 (Asp460) в C-концевом каталитическом домене и необычная структура N-концевого домена — семилопастный β -пропеллер. Такая структура позволяет олигопептидам проникать к каталитической триаде, локализованной в полости на интерфейсе двух доменов, и не допускать к активному центру объемные молекулы глобулярных белков.

Известно, что в нативных условиях протеолитический гидролиз неденатурированной бел-

ковой молекулы в первую очередь происходит на междоменных участках аминокислотной последовательности, не имеющих плотной пространственной укладки и поэтому доступных действию эндопротеаз. Подобный ограниченный протеолиз широко используется для изучения функциональных доменов мультидоменных белков. Анализ N- и C-концевых участков аминокислотной последовательности PSP и сравнение их с соответствующими фрагментами структурно охарактеризованного гомолога PSP из лейшмании *L. major* [13] позволили оценить возможность использования ограниченного протеолиза белковой молекулы этого фермента, не приводящую к его инактивации, но, более того, разрешающую белкам-субстратам доступ к активному центру. Целью данного исследования являлось получение модифицированных вариантов PSP, обладающих, в отличие от нативного фермента, способностью гидролизовать высокомолекулярные субстраты. Нами был также проведен анализ информационной структуры PSP при помощи метода АНИС (анализ информационной структуры белка) [21], подобраны условия ограниченного протеолиза рекомбинантной His₆-PSP химотрипсином и трипсином и получены стабильные укороченные формы белка.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали *p*-нитроанилид N_α-бензоил-D,L-аргинина (BAPNA), азоказеин, Ds-Na («Sigma», США); Tris, NaCl, глицерин («ICN», США); диметилсульфоксид (ДМСО) и *p*-нитрофениловый эфир *p*'-гуанидинобензойной кислоты («Fluka», Германия); акриламид, персульфат аммония, N,N'-метиленабисакриламид, N,N,N,N'-тетраметилэтилендиамин, реактив Protein Assay, БСА и белковые стандарты для электрофореза («Bio-Rad», США); Coomassie G-250 и R-250 («Serva», Германия); бычья лиофилизованные трипсин (Tr) и химотрипсин (Chtr) (ПО «С.-Пб. мясокомбинат», Завод медицинских препаратов, Россия). Остальные реагенты — отечественного производства квалификации о.с.ч. или х.ч.

Рекомбинантный фермент PSP получен по разработанной нами методике [17, 20]. Для концентрирования и разделения смесей белков использованы приборы для ультрафильтрации Centricon («Millipore», США). Для расчета информационной структуры PSP использовался ранее описанный алгоритм [21].

Ds-Na-ПААГ-электрофорез проводили с использованием ячейки для электрофореза Mini-Protean 3 («Bio-Rad», США). Концентрация раз-

деляющего геля составляла 10–12%, концентрирующего – 4%. Гели окрашивали с помощью Coomassie G-250.

Светопоглощение измеряли на спектрофотометре Beckman DU-70 («Beckman», США). Концентрацию белка определяли методом Брэдфорд с помощью реактива Bio-Rad Protein Assay, стандарт БСА («Bio-Rad», США). Молярность растворов фермента определяли титрованием активных центров *p*-нитрофениловым эфиром *p*'-гуанидинобензойной кислоты [22].

Измерение активности препаратов PSP проводили спектрофотометрически с использованием VAPNA (0,2 мМ, 2%-ный ДМСО) в качестве субстрата в 0,1 М Tris-HCl-буфере, pH 8,0, содержащем 50 мМ CaCl₂ (буфер А), при 25°, регистрируя увеличение светопоглощения при 405 нм, происходящее при образовании свободного *p*-нитроанилина ($\Delta\varepsilon_{405} = 10\,400\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$). В этих условиях величина начальной скорости гидролиза составляет 0,01 ед A_{405} /мин при [PSP] = 1 нМ.

Определение протеолитической активности по азоказеину. Использован модифицированный нами метод Демидюк И.В. с соавт. [23]. Раствор азоказеина (0,35 мл, 1%) в 0,1 М Tris-HCl-буфере, pH 8,0, содержащем 1 мМ CaCl₂, и 25 мкл соответствующего раствора фермента или буфера (контроль) инкубировали при 25°. Через необходимые промежутки времени (0,5–6 ч) добавляли 375 мкл 10%-ной ТХУ. Смесь выдерживали 30 мин при 4° и отделяли осадок белка центрифугированием (10 мин, 10 000 g). Супернатант (0,6 мл) смешивали с 0,15 мл 1,8 М NaOH и измеряли A_{420} против соответствующего контроля.

За единицу активности по азоказеину принимали количество PSP, вызывающее прирост A_{420} (ΔA_{420}) на единицу за 4 ч инкубации с азоказеином.

Ограниченный протеолиз PSP. Инкубировали PSP (5–10 мкМ) с Chtr (0,14–0,4 мкМ) в буфере А, содержащем 50%-ный (по объему) глицерин, при 25° в течение 24–48 ч вместе с двумя контролями: без Chtr (контроль 1) и без PSP (контроль 2). В определенные моменты времени отбирали аликвоты инкубационных смесей для определения активности PSP по VAPNA и азоказеину и электрофореза в ПААГ.

Получение иммобилизованных химотрипсина и трипсина на носителе MPG-PA (модифицированный кремнезем, [24]). Инкубировали при мягком перемешивании суспензию MPG-PA (99 мкмоль *p*-нитрофенола на 1 г) с Chtr или Tr (10 мг на 1 мл сорбента) в 1,2-кратном объеме 0,3 М раствора NaHCO₃, содержащего 0,1 М NaCl (pH 8,5), при 4° в течение 2–3 сут. Последовательно промывали 10 объемами буфера

конденсации и 15 объемами 0,5 М раствора моноэтаноламина в том же буфере. Инкубировали в последнем растворе 20 ч при 25° при мягком перемешивании. Последовательно промывали MPG-PA-Chtr и MPG-PA-Tr буфером конденсации (20 объемов), тем же буфером, содержащим 1 М NaCl (30 объемов), и, в заключение, водой (100 объемов). Хранили в воде при 4°.

Ограниченный протеолиз PSP иммобилизованным химотрипсином (MPG-PA-Chtr) и трипсином (MPG-PA-Tr). Инкубировали при мягком перемешивании 150–300 мкл PSP (10 мкМ) в буфере А, содержащем 50%-ный глицерин, при 25° с 30–50 мкл MPG-PA-Chtr (5,3 нмоль Chtr/мл) или MPG-PA-Tr (5,5 нмоль Tr/мл). В определенные моменты времени отбирали пробы супернатанта (по 40–60 мкл) для анализа активности по азоказеину и VAPNA и электрофореза в ПААГ.

Идентификация продуктов ограниченного протеолиза PSP с помощью масс-спектрометрии MALDI-TOF, пептидный фингерпринт. Препараты рекомбинантной PSP, а также продукты ограниченного протеолиза PSP химотрипсином (PSP-Chtr) и трипсином (PSP-Tr) разделяли в 12%-ном денатурирующем ПААГ, гель окрашивали Coomassie Brilliant Blue. Окрашенные белковые полосы вырезали. Для проведения триптического гидролиза кусочки геля размером 3–4 мм дважды промывали 100 мкл 40%-ного (по объему) раствора ацетонитрила в 0,1 М водном растворе NH₄HCO₃ в течение 20 мин при 37°, а затем 100 мкл ацетонитрила. Гель высушивали и обрабатывали 3,5 мкл раствора модифицированного трипсина («Promega», США) с концентрацией 15 мкг/мл в 0,05 М растворе NH₄HCO₃. Гидролиз проводили в течение 2 ч при 37°, затем добавляли 5,25 мкл 0,5%-ной ТФУ в 50%-ном (по объему) растворе водного ацетонитрила и тщательно перемешивали. Надгелевый раствор в количестве 1,5 мкл смешивали на мишени с 0,5 мкл раствора 2,5-дигидроксibenзойной кислоты («Aldrich», США; 10 мг/мл в 20%-ном (по объему) водном ацетонитриле, 0,5%-ная ТФУ), полученную смесь высушивали на воздухе.

Масс-спектры были получены на MALDI-времяпролетно-времяпролетном масс-спектрометре Ultraflextreme BRUKER («Bruker», Германия), оснащенном УФ-лазером (Nd), в режиме положительных ионов с использованием рефлектрона; точность измеренных моноизотопных масс после докалибровки по пикам автолиза трипсина составляла 0,007% (70 ppm). Спектры получали в диапазоне масс 500–6500 m/z, выбирая мощность лазера, оптимальную для достижения наилучшего разрешения. Для получения спектров фрагментации использовали тандем-

ный режим прибора, точность измерения фрагментных ионов была не ниже 3 Да.

Идентификацию белков осуществляли при помощи программы Mascot (www.matrixscience.com). Масс-спектры были обработаны с помощью программного пакета FlexAnalysis 3.3 («Bruker Daltonics», Германия). При помощи программы Mascot (опция «пептидный фингерпринт») проводили поиск по заданной аминокислотной последовательности PSP с указанной выше точностью с учетом возможного окисления метионина кислородом воздуха и возможной модификации цистеинов акриламидом геля. Также были получены спектры фрагментации (MS/MS) отдельных пептидов, соответствующих сигналам различия в сравниваемых MS-спектрах, и проведен анализ объединенных MS + MS/MS-результатов с использованием программного обеспечения Biotoools 3.2 («Bruker Daltonics», Германия). Путем попарного сравнения объединенных спектров фрагментации PSP и PSP-Chtr или PSP и PSP-Tr были установлены аминокислотные последовательности продуктов химотрипсина и трипсинолиза PSP.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее мы продемонстрировали, что природная PSP и рекомбинантная His₆-PSP не различаются по субстратной специфичности, чувствительности к ингибиторам, а также термостабильности [18–20]. Поэтому в данном исследовании во всех экспериментах был использован рекомбинантный фермент, далее называемый PSP.

Обоснованием идеи получения укороченных вариантов PSP, потенциально более активных по отношению к высокомолекулярным субстратам, чем полноразмерный фермент, явилось, во-первых, сравнение аминокислотных последовательностей PSP и OpdB *L. major*, для которой определена трехмерная структура [13]. Этот фермент имеет N-концевую «скобку» ~100 а.о., которая по данным рентгеноструктурного анализа структурно относится скорее к каталитическому домену [13], охватывая его и придавая стабильность белковой молекуле, но, с другой стороны, препятствуя гидролизу высокомолекулярных субстратов. При явной гомологии PSP и OpdB *L. major* (степень идентичности 34%, рис. 1)

1	M	MTPPKAEKRP	YPITT-----	-----H	GDTRVDDYYW	LRDDERTDPQ	VLDYLQAENA	FTDAALKPQQ	PSP
1	MSSDSSVAAS	AQPPIAAKKP	HRVKFGYVEG	EDRGNPNMNP	PRYREDPYFW	MRDDDRKDEA	VIEHLNKEKV	YFQARSADIA	LM
58	ALRETLYEEM	VARIPQOEHS	VPYVRHGYYR	QTRFEPGNEY	AIYVRQPQAE	-SEHWDT---	LIDGNQRAEQ	REFYTLGGLE	PSP
81	QLRDDIYAEH	ISHINEDDMS	APYVYGYRY	YTREVKGKPY	KIYCRVFTDK	EPGDVAEEV	IIDVNQVAEG	KAFCDVMEVK	LM
134	VSP-DNQKLA	VAEDFLSRRQ	YDIRFKNLS	-DSWIDEVLE	NTSGSFEWAN	DSATVYYVRK	HAKTLPLPQV	YRHVVGTDPO	PSP
161	PAPPEHDLVA	FSDMSGNEV	YTIIEFKRIS	PSQTIADKVS	GTNGEIVWGP	DHISLFYVTK	DETL-RENKV	WRHVMGKIQS	LM
212	LDELIYEEQD	DTFYVGLEKT	TSDRFLILHL	SSTTSEILL	LDADRAD--S	TPQMFVPRRK	DHEYGIDHY-	HQHFYIRSNK	PSP
240	EDVCLYEEHN	PLSFAFYKA	ADTNTLCIGS	QSPETAEVHL	LDLRKGNNAH	TLEIVRPREK	GVRVDVQMHG	TSHLVILTNE	LM
289	-DGKNFGLYQ	SEQ-----	ADEAQWQTLI	APRIEVMLEG	FSLFRDWLVV	EERSEGLTQL	R-----Q	IHWQSGEVKR	PSP
320	GGAVNHKLLI	APR-----	QPSDWSHVLV	DHSEDFMES	IAVRSNYLVV	AGRAGLTRI	WTMMADSQDG	VFOAGTGIRE	LM
355	IAFDDPTY--	--TTWLAYNP	EPETELLRYG	YSSMTPTTLL	YELNLDSDER	VMLKQEVKN	-FTPENYRSE	RVWVKARDGV	PSP
394	V--VMEEP IF	TVHLVESQML	EYEEPTFRME	YSSLATPNTW	FVSPQDTLA	PLVKVREVG	GFDAANYKVE	RRFATAPDQT	LM
428	EVPVSLVYRH	DSFARGTNPL	MVYGYGSYGS	SMDPAFSASR	LSILDRGFVF	VLAHIRGGGE	IGQLWYEDG-	KLFKKQNTFN	PSP
472	KIPLSVVCCK	DLDMSQPQPC	MLYGYGSYGL	SMDPQFSIQH	LPYCDRGMIF	ATAHIRGGSE	IGRAWYEGA	KYLTKRNTFS	LM
			*						
507	DFIDVTEALI	AQGYGDAKRV	FAMGGSAGGL	IMGAVINQAP	ELFNGIVAQV	PFVDVVTML	DESIPLTGGE	YDEWGNPNQQ	PSP
552	DFIAAAEFLV	NAKLTTPSQL	ACEGRSAGGL	IMGAVLNMRP	DLFKVALAGV	PFVDVMTMC	DPSIPLTGGE	WEWGNPNEY	LM
587	AYYDYIIQYS	PYDQVKAQDY	PHMLVTTGLH	DSQVQWEP*	KWVAKLRELK	TDDRQLLYT	DMSGHGGKS	GRFKAYEDIA	PSP
632	KYYDYMLSYS	PMDNVRAQDY	PNIMVQCGLH	DPRVAYWEP*	KWVSKLRECK	TDNNEILLNI	DMSGHFSAK	DRYKFWKESA	LM
667	LEYAFILALA	E							PSP
712	IQQAFVCKHL	KSTVR LLVRR							LM

Рис. 1. Сравнение аминокислотных последовательностей OpdB *S. proteamaculans* 94 (PSP) и *L. major* (LM). Выделены совпадающие фрагменты. Подчеркнуты остатки Asp/Glu субстратсвязывающих центров S1 и S2, а также переходные области между доменами. Звездочкой помечены а.о. каталитической триады (Ser, His, Asp)

общий фолдинг молекул OpdV протозойного и бактериального происхождения должен быть достаточно близок.

Дополнительную информацию для проектирования последовательностей укороченных форм PSP предоставил метод АНИС [21], позволяющий выявлять иерархическую организацию структурной информации в первичной структуре белков. Выявляемые иерархические элементы информационной структуры (ЭЛИС) представляются в виде графов (рис. 2). Согласно проведенным расчетам информационная структура PSP Met1–Glu677 представляет собой шестидольный граф, сформированный шестью ЭЛИС высшего ранга. Границами между ЭЛИС высшего ранга являются остатки Glu109, His279, Trp492, His608 и Trp623 (рис. 2, а–в). В ранее проведенных исследованиях было показано, что ЭЛИС высшего ранга, как правило, соответствуют структурным доменам, и высказано предположение, что они обладают способностью независимо формировать свою пространственную структуру [21, 25]. Это позволило предложить метод фрагментации белков при проектировании последовательностей их укороченных аналогов [21]. Метод заключается в удалении из аминокислотной последовательности белка

фрагментов, соответствующих ЭЛИС. Причем чем более высокого ранга ЭЛИС удаляются из последовательности, тем выше вероятность сохранения механизма фолдинга укороченной формы белка. По результатам расчетов были предложены три варианта укороченных белков PSP, которые могут быть получены удалением одного или двух фрагментов из *N*-концевой части белковой молекулы, соответствующих ЭЛИС высшего ранга: Glu109–Glu677, His279–Glu677 и Met1–Ser108/His279–Glu677 (рис. 2, з).

Известно, что протеолиз нативной белковой молекулы происходит в наиболее доступных для эндопротеаз участках аминокислотной последовательности – между доменами или на экспонированных на поверхности глобулы петлях. Для OpdV, по данным рентгеноструктурного анализа белка из *L. major*, таким участком мог бы быть *N*-концевой 100-аминокислотный домен, поэтому мы решили провести ограниченный протеолиз PSP. В интересующей нас области *N*-концевого домена расположено несколько остатков аргинина (положения 82, 86, 90 и 102), что позволяет использовать трипсинолиз. Но более предпочтительным являлось использование для ограниченного протеолиза химотрипсина, гидролизующего полипептиды после остатков ти-

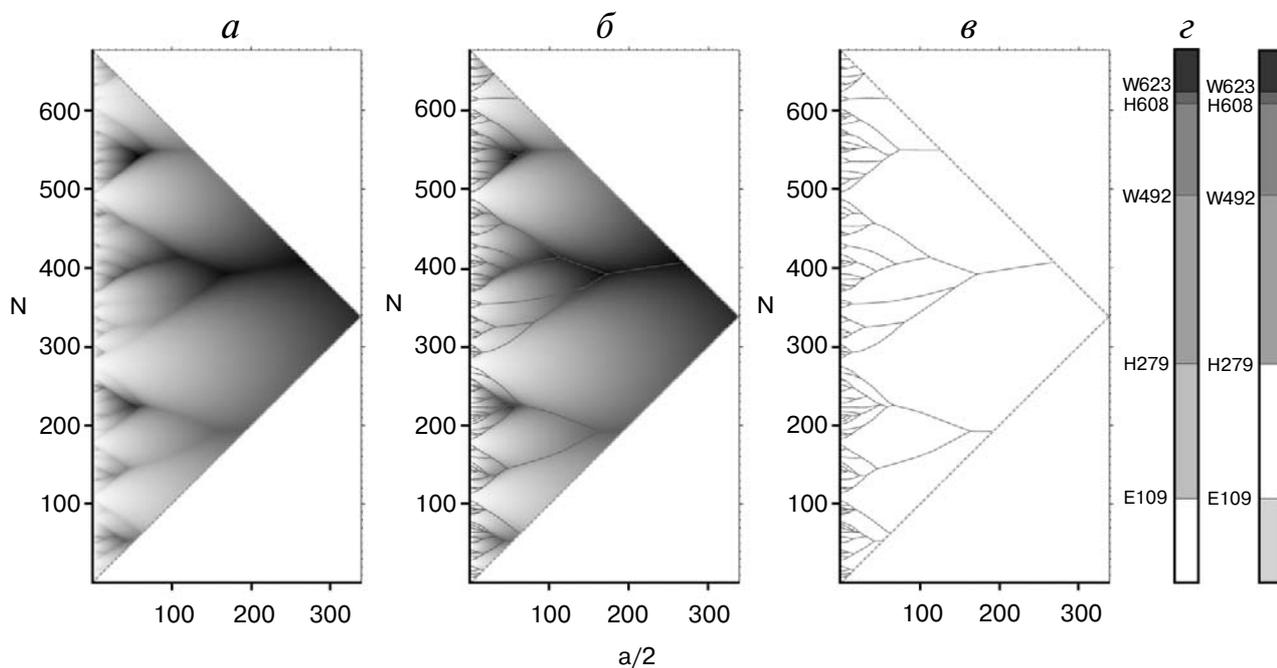


Рис. 2. Информационная структура PSP: а – функция нелинейного сглаживания (G) [21], полученная для PSP; б – граф информационной структуры PSP, построенный на основании функции G; в – граф информационной структуры PSP (N – номер аминокислотного остатка в первичной структуре белка, a/2 – масштаб сглаживания для функции G); з – линейные модели первичной структуры PSP с отмеченными границами между ЭЛИС высшего ранга PSP (неокрашенные области ЭЛИС высшего ранга соответствуют фрагментам PSP – Met1–Ser108 и Glu109–Tyr278)

розина, фенилаланина и триптофана, поскольку для определения активности PSP применялся трипсиновый субстрат BAPNA, и следовало избегать загрязнения продуктов протеолиза трипсином. *N*-Концевой домен PSP содержит ароматические остатки (Phe91, Tyr97, Tyr100, Trp111), представляющиеся подходящими сайтами химотрипсинолиза.

Т.к. при исследовании инактивации PSP при длительной инкубации было обнаружено стабилизирующее влияние глицерина [20], химотрипсинолиз проводили в присутствии 50%-ного глицерина. Использование глицерина тем более актуально, что можно было ожидать дальнейшего понижения стабильности белковой молекулы PSP после удаления *N*-концевой «скобки».

Продукты ограниченного протеолиза PSP анализировали с помощью электрофореза в денатурирующем ПААГ, а также определяли их активность в отношении низкомолекулярного субстрата (BAPNA) и высокомолекулярного субстрата (азоказеина). Азоказеин – бычий казеин (~25 кДа), содержащий азокраситель, является общепринятым белковым субстратом для тестирования активности протеиназ различной специфичности, а также коллагеназ [23].

Химотрипсинолиз PSP. Обнаружено, что в ходе инкубации PSP (5–10 мкМ) с Chtr (2–4 мкМ) в буфере А, содержащем 50%-ный глицерин, в течение 24–72 ч из PSP (78 кДа) происходит образование продукта(ов) гидролиза (PSP-Chtr, ~66 кДа) (рис. 3, а). При этом активность по отношению к низкомолекулярному субстрату BAPNA не только сохраняется, но даже несколько возрастает (на 5–10%) (рис. 3, б). В контрольной пробе, содержащей только PSP в том же буфере, активность немного понижалась за это время (на 10–15%).

Определение протеолитической активности по азоказеину. Для определения величины ΔA_{420} при полном гидролизе азоказеина его инкубировали с 40 мкМ Chtr или Tr в течение 2–4 ч, полученные величины ΔA_{420} составили $\geq 2,5$ и $\geq 3,3$ соответственно.

Обнаружено, что при степени гидролиза азоказеина, не превышающей 10–20% ($\Delta A_{420} \leq 0,3$), химотрипсин и трипсин гидролизуют азоказеин с постоянной скоростью, пропорциональной концентрации фермента. При этом величина активности в условных единицах на 1 мкМ активного фермента составляет 0,35–0,43 ед/мкМ для Chtr и 0,60–0,67 ед/мкМ для Tr.

Полноразмерный фермент PSP не гидролизует азоказеин; величина ΔA_{420} при инкубации азоказеина с PSP невелика, не изменяется во времени и не зависит от концентрации PSP. Так, при инкубации 10 мкМ PSP с азоказеином в те-

чение 1–48 ч величина $\Delta A_{420} \approx 0,02–0,03$. Величина ΔA_{420} при 4 ч инкубации также не зависела от концентрации PSP, составляя 0,02–0,03 в интервале 3,5–250 мкМ фермента. В противоположность этому мы обнаружили, что препарат PSP после химотрипсинолиза эффективно гидролизует азоказеин (рис. 3, в).

Синергизм действия PSP и Chtr. Величина ΔA_{420} , соответствующая гидролизу азоказеина 0,14–0,4 мкМ Chtr за 4 ч (контроль 2), всего в 2–3 раза превышала величину ΔA_{420} в случае такой же инкубации азоказеина с 10 мкМ PSP (контроль 1). Однако оказалось, что если одновременно инкубировать в течение 4 ч с азоказеином смесь 10 мкМ PSP и 0,14–0,4 мкМ Chtr, то наблюдаемый эффект не соответствует сумме отдельных контролей 1 и 2, а превышает ее более чем вдвое (рис. 3, в).

Таким образом, был обнаружен синергизм действия двух ферментов – PSP и Chtr при одновременной достаточной длительной инкубации с азоказеином. Очевидно, что процесс гидролиза азоказеина смесью этих ферментов достаточно сложен. При небольшой степени гидролиза химотрипсином (<10% по ΔA_{420}) наряду с короткими пептидами образуются более высокомолекулярные фрагменты азоказеина, которые осаждаются ТХУ и поэтому не детектируются. Однако полноразмерный фермент PSP уже может гидролизовать эти полипептиды, в отличие от интактного азоказеина, что в свою очередь приводит к превышению величины ΔA_{420} над суммой отдельных контролей по PSP и Chtr. В случае прединкубации PSP и Chtr (24–48 ч) величина ΔA_{420} инкубационной смеси заметно выше соответствующей величины «нулевого контроля» (рис. 3, в), т.е. образующийся в ходе химотрипсинолиза укороченный фермент PSP-Chtr все же обладает повышенной активностью по отношению к высокомолекулярным субстратам. Однако неоднозначность процесса приводит к невозможности использования азоказеина для определения активности PSP-Chtr в составе инкубационной смеси.

Мы не применяли трипсин для ограниченного протеолиза PSP, чтобы избежать неопределенности при определении активности продукта протеолиза, т.к. оба фермента обладают одинаковой специфичностью, расщепляя пептидные связи, образованные COOH-группами остатков Arg и Lys. Однако оказалось, что при гидролизе белкового субстрата – азоказеина – недопустима также примесь фермента с другой специфичностью, химотрипсина, даже в небольшом количестве (1–2%). Для гарантированного отсутствия в препаратах PSP-Chtr примесей химотрипсина для ограниченного протеолиза

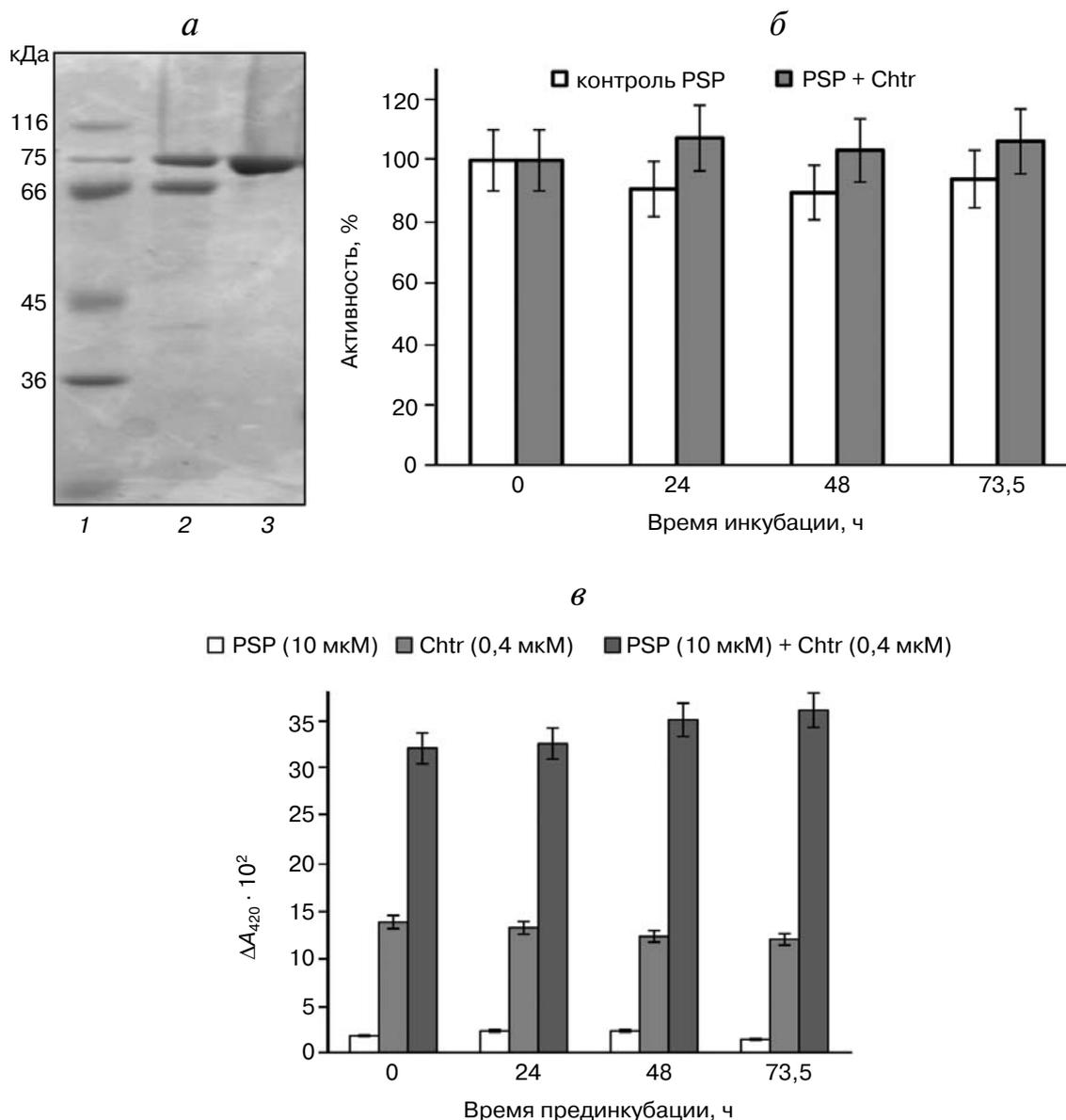


Рис. 3. Химотрипсинолиз PSP. *а* – Ds-Na-ПААГ-электрофорез в 10%-ном ПААГ: 1 – стандарты, 2 – опыт (инкубационная смесь 6 мкМ PSP и 0,2 мкМ Chtr, 24 ч, 25°), 3 – контроль (6 мкМ PSP); *б* – активность PSP (6 мкМ) по VAPNA при инкубации с химотрипсином (0,2 мкМ); *в* – гидролиз азоказеина при инкубации с соответствующими пробами в течение 4 ч

PSP был использован иммобилизованный химотрипсин.

Ограниченный протеолиз PSP с использованием иммобилизованных химотрипсина и трипсина. При использовании иммобилизованного фермента отсутствие в конечных препаратах PSP примеси химотрипсина предотвращает неспецифический протеолиз не только азоказеина, но и других высокомолекулярных субстратов. Еще одно преимущество использования иммобилизованных ферментов – возможность проведе-

ния трипсинолиза PSP с использованием иммобилизованного трипсина.

Для иммобилизации мы использовали носитель MPG-PA (модифицированный кремнезем) [24]. Иммобилизация белков на данном сорбенте происходит за счет образования пептидной связи при взаимодействии активированных *p*-нитрофенолом карбоксильных групп сорбента с аминокетильными группами белка. Ранее мы успешно использовали иммобилизованный на этом сорбенте трипсин и соевый ингибитор трипсина в ка-

честве аффинных сорбентов при очистке энтеропептидазы [26, 27]. Сорбент не разрушается при использовании с выделением активных белков в раствор, а после регенерации может многократно повторно использоваться (более 10 циклов).

Содержание активного по отношению к VAPNA трипсина в MPG-PA-Tr соответствует 12 нмоль/мл сорбента, при гидролизе азоказеина эта величина соответствует 5,5 нмоль/мл. MPG-PA-Chtr содержит 5,3 нмоль Chtr в 1 мл (анализ по азоказеину).

Влияние прединкубации азоказеина с иммобилизованным ферментом на скорость последующего гидролиза полноразмерным PSP. Для проверки того, что PSP может гидролизовать подвергнутый частичному химотрипсинолизу азоказеин, инкубировали 30 мкл MPG-PA-Chtr с 1 мл раствора азоказеина при мягком перемешивании в течение 30 мин и отделяли сорбент центрифугированием. Степень гидролиза азоказеина составляла $\leq 10\%$ ($A_{420} = 0,113$). Супернатант (0,35 мл), содержащий частично гидролизованный азоказеин, инкубировали с 25 мкл 10 мкМ раствора PSP. Параллельно инкубировали такое же количество PSP и буфера с 0,35 мл интактного азоказеина. Рис. 4, а демонстрирует, что прединкубация азоказеина с MPG-PA-Chtr, ведущая к частичному гидролизу этого белка, делает его чувствительным к гидролизу полноразмерным PSP: величина ΔA_{420} после инкубации с PSP такого гидролизованного на $\leq 10\%$ азоказеина выше примерно в 15 раз, чем при инкубации PSP с интактным азоказеином.

Прединкубация азоказеина с MPG-PA-Tr, ведущая к частичному гидролизу этого белка ($< 10\%$: $\Delta A_{420} = 0,061$), также делает его чувствительным к PSP (рис. 4, б): наблюдается 7-кратное превышение величины ΔA_{420} по сравнению с интактным азоказеином. Таким образом, мы доказали, что PSP не гидролизует нативный азоказеин, однако его достаточно длинные фрагменты, осаждаемые ТХУ, уже являются субстратами этого фермента.

Инкубация PSP с MPG-PA-Chtr. Рис. 5 демонстрирует результаты ограниченного протеолиза PSP иммобилизованным химотрипсином. Видно, что в процессе протеолиза PSP (78 кДа) появляется и накапливается полипептид с молекулярной массой ~ 66 кДа (PSP-Chtr) (рис. 5, а). Образование PSP-Chtr коррелировало с появлением у тестируемых препаратов способности гидролизовать азоказеин (рис. 5, в, з). Незначительная фоновая активность PSP в отношении азоказеина ($\Delta A_{420} = 0,04-0,05$) соответствовала присутствию в коммерческом препарате белка частично разрушенных молекул в количестве 1–2%. В результате инкубации PSP с MPG-PA-Chtr эффективность гидролиза азоказеина увеличивалась более чем в 10 раз. Для контроля отсутствия разрушения MPG-PA-Chtr в ходе инкубации и попадания химотрипсина в супернатант параллельно инкубировали такое же количество иммобилизованного химотрипсина в буфере А, содержащем 50%-ный глицерин, и использовали соответствующие супернатанты в качестве дополнительного контроля при инкубации с азоказеином. Для более строгого анали-

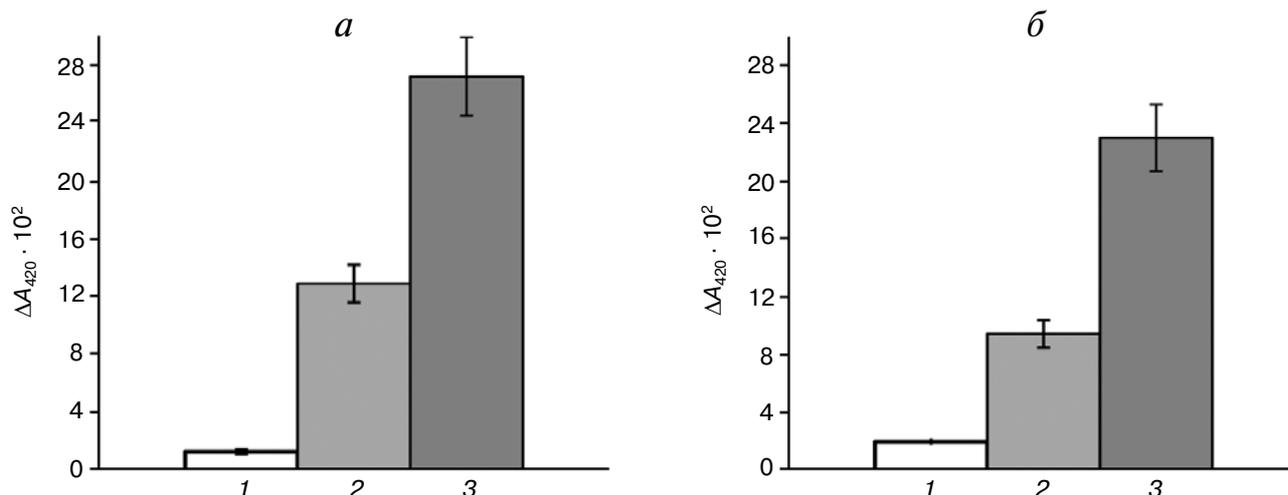


Рис. 4. Влияние прединкубации азоказеина с иммобилизованным химотрипсином (а) и трипсином (б) на скорость последующего гидролиза полноразмерным PSP (10 мкМ): 1 – без прединкубации (фон PSP); 2 – азоказеин, прединкубированный 30 мин с MPG-PA-Chtr (0,2 мкМ) или MPG-PA-Tr (0,07 мкМ); 3 – PSP + частично гидролизованный азоказеин

за отсутствия в этих супернатантах химотрипсина использовали дополнительный контроль, где с азоказеином смешивали 25 мкл буфера, инкубированного с MPG-PA-Chtr, и 25 мкл раствора исходного PSP. Обнаружено, что все дополнительные контроли отрицательны; следовательно, в инкубационной смеси отсутствует растворимый химотрипсин, и только препарат PSP-Chtr был активен в отношении азоказеина (рис. 5, *з*).

В противоположность инкубации с растворимым химотрипсином при инкубации с MPG-PA-Chtr наблюдается некоторое уменьшение активности по низкомолекулярному субстрату VAPNA (рис. 5, *б*), в основном за счет сорбции

фермента на носителе (12–20% сразу при смешивании в зависимости от количества иммобилизованного фермента). По данным электрофореза в ПААГ химотрипсинолиз белковой молекулы PSP иммобилизованным химотрипсином проходит медленнее, чем в случае растворимого химотрипсина и с меньшим выходом PSP-Chtr. При инкубации с Chtr образуется 50–70% активного укороченного PSP-Chtr, но при обработке PSP MPG-PA-Chtr содержание PSP-Chtr редко превышает 30–40%. При длительной инкубации происходит деградация белковой молекулы PSP с образованием более низкомолекулярных продуктов (<50 кДа), которые, по-видимому, неактивны (рис. 5, *а*).

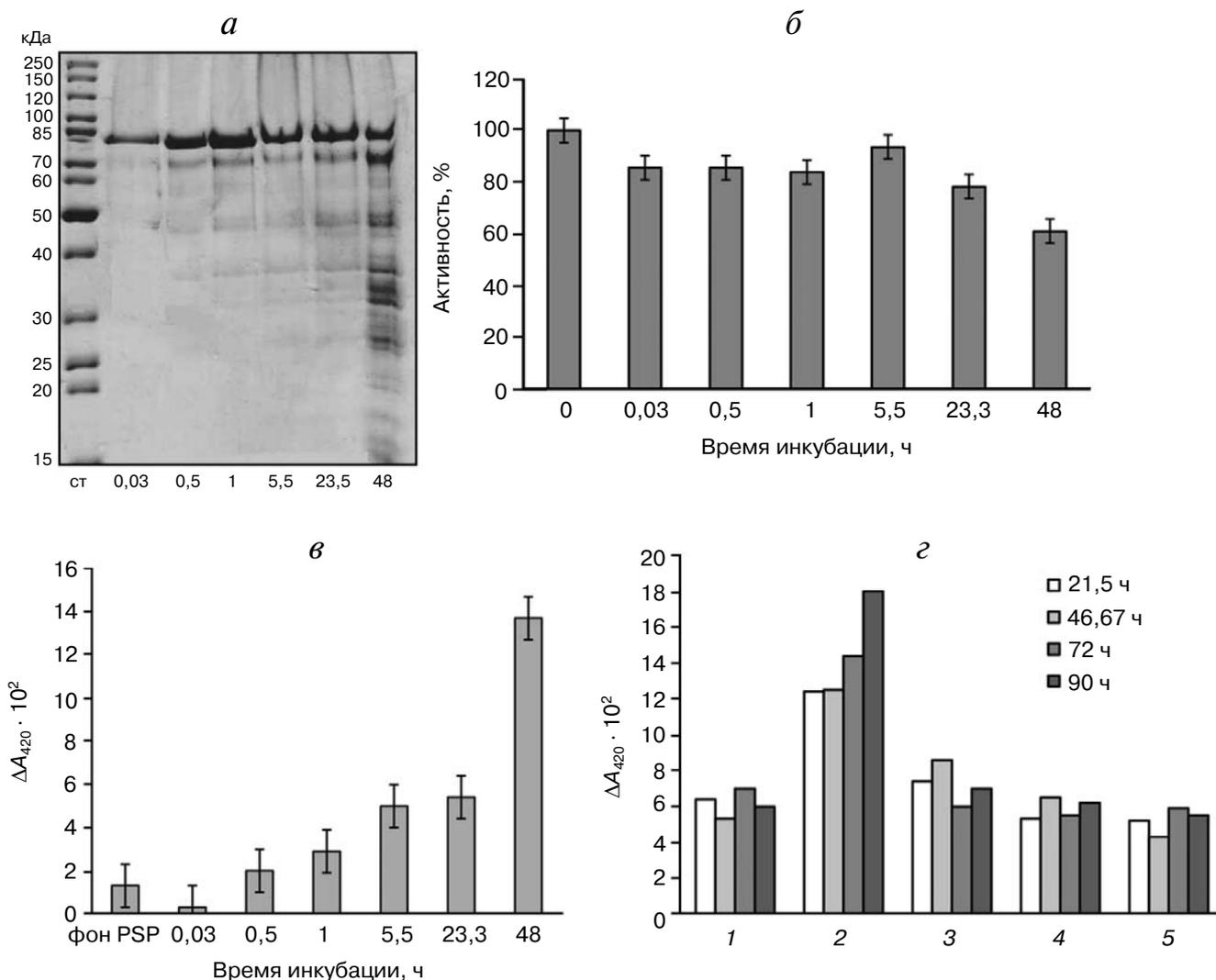


Рис. 5. Химотрипсинолиз PSP (10 мкМ, 300 мкл) с помощью иммобилизованного химотрипсина MPG-PA-Chtr (5,3 нмоль Chtr/мл, 30 мкл). *а* – Электрофорез в ПААГ; *б*, *в* – активность PSP по азоказеину (*б*) и VAPNA (*в*) в ходе инкубации с MPG-PA-Chtr; *г* – активность препаратов PSP и ряда контролей по азоказеину: 1 – PSP, 2 – опыт (инкубация PSP с MPG-PA-Chtr), 3 – контроль (инкубация MPG-PA-Chtr в буфере + PSP 1 : 1), 4 – контроль (инкубация MPG-PA-Chtr в буфере), 5 – буфер

Максимальная активность таких препаратов составляла от 0,02–0,03 ед/мкМ (при уровне гидролиза <30%) до 0,1 ед/мкМ (при уровне гидролиза \geq 50%). Количество активного фермента (PSP + PSP-Chtr) определяли по калибровочному графику с помощью низкомолекулярного субстрата BAPNA. Таким образом, эффективность гидролиза азоказеина укороченной формой PSP-Chtr была лишь на порядок ниже эффективности гидролиза этого белка химотрипсином и трипсином (0,35–0,43 и 0,60–0,67 ед/мкМ соответственно).

При инкубации PSP с MPG-PA-Chtr без глицерина так же, как в случае растворимого химотрипсина, достаточно быстро происходил интенсивный гидролиз белковой молекулы PSP с образованием низкомолекулярных продуктов, не обладающих активностью как по высокомолекулярному субстрату азоказеину, так и по низкомолекулярному BAPNA (данные не приведены).

Инкубация PSP с MPG-PA-Tr. Протеолиз PSP с помощью MPG-PA-Tr проводили аналогично тому, как описано выше для MPG-PA-Chtr. Результаты экспериментов представлены на рис. 6. По данным электрофореза в ПААГ основным продуктом трипсинолиза (PSP-Tr) является белок с молекулярной массой на 2–3 кДа ниже, чем у PSP (рис. 6, а). Причем в отличие от химотрипсинолиза, который проходил достаточно медленно и не до конца, при обработке трипсином полноразмерная PSP превращалась в укороченную форму PSP-Tr быстрее и полностью. Анализ активности продуктов трипсинолиза не выявил у них способности гидролизовать азоказеин (рис. 6, в). Более того, в процессе протеолиза при переходе полноразмерной PSP в PSP-Tr наблюдалось падение активности в отношении BAPNA до 26% при инкубации с MPG-PA-Tr в течение 3 ч и до 4,5 и 4,0% при инкубации с MPG-PA-Tr в течение 20 и 40 ч соответственно (рис. 6, б).

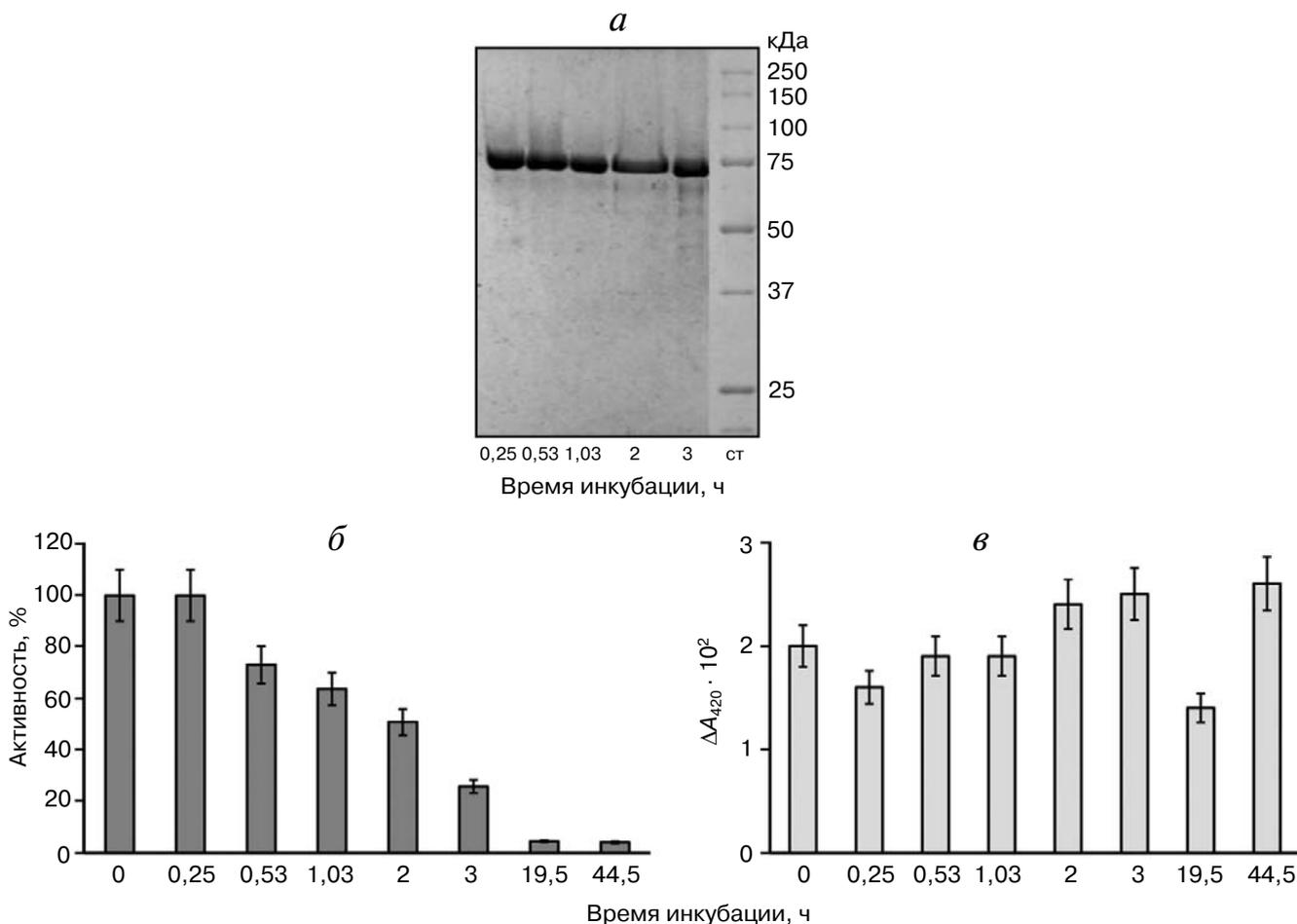


Рис. 6. Трипсинолиз PSP (10 мкМ; 300 мкл) с помощью иммобилизованного трипсина MPG-PA-Tr (Tr 5,5 нмоль/мл, 50 мкл). а – Электрофорез в 10%-ном ПААГ, б – активность по BAPNA, в – активность по азоказеину

Определение мест расщепления PSP при ограниченном протеолизе. Идентификацию продуктов ограниченного протеолиза PSP проводили с помощью масс-спектрометрии MALDI-TOF путем сравнения пептидных карт полноразмерной PSP и продуктов ее протеолиза. Белковые препараты (PSP, PSP-Chtr, полученный с использованием растворимого химотрипсина, и PSP-Tr) были предварительно разделены с помощью электрофореза в ПААГ. На рис. 7 представлен ПААГ, окрашенный Coomassie Brilliant Blue, из которого были вырезаны исследуемые белковые полосы.

Согласно данным электрофореза при обработке PSP химотрипсином появлялся стабильный продукт PSP-Chtr с молекулярной массой ~66 кДа (рис. 7, 1), обладающий ферментативной активностью. Следовало предположить, что химотрипсин отщепляет *N*-концевую область белка размером ~100 а.о., т.к. делеция фрагмента такого размера из *C*-концевого каталитического домена должна была привести к потере активности белка из-за удаления двух а.о. каталитической триады – Asp617 и His652 (рис. 1).

Для уточнения места расщепления химотрипсином в последовательности PSP было проведено сравнение пептидных карт триптического гидролиза, полученных на основании анализа объединенных (MS + MS/MS) спектров фрагментации PSP-Chtr (рис. 7, 1 – белковая полоса ~66 кДа) и PSP (рис. 7, 3).

На рис. 8, а представлены структуры пептидов, идентифицированных при анализе объединенных MS + MS/MS-спектров исследуемых образцов и перекрывающих предполагаемую область расщепления химотрипсином (в районе 100-го аминокислотного остатка от *N*-концевого метионина). Как и ожидалось, в спектре фрагментации PSP-Chtr отсутствовали пептиды, соответствующие *N*-концевой области белка. Кроме того, в нем присутствовал пептид с отношением m/z 2379 Да, не соответствующим ни одному из теоретически возможных триптических пептидов PSP. Для этого пептида был проведен MS/MS-анализ, показавший, что данный пептид имеет структуру VRQPQAESEHWDTLIDGNQR и соответствует последовательности PSP, начинающейся с а.о. Val101. В процессе его фрагментации наблюдалось появление пептида с m/z 2123 Да со структурой QPQAESEHWDTLIDGNQR, присутствующего в MS-спектрах PSP и PSP-Chtr (рис. 8, а). Следует отметить, что в последовательности PSP а.о. Val101 предшествует Tyr100 (рис. 1 и 8). Пептидную связь Tyr–Val гидролизует химотрипсин, а не трипсин, следовательно, ее расщепление должно было произойти не при трипсинолизе PSP-Chtr, а при исходном химотрипсинолизе PSP.

Таким образом, на основании анализа представленных спектров было установлено, что обработка PSP химотрипсином приводит к расщеплению пептидной связи Tyr100–Val101 и удалению *N*-концевого фрагмента размером 100 а.о.

При обработке PSP трипсином появлялся стабильный продукт с незначительно измененной электрофоретической подвижностью (рис. 7, 2), что указывало на отщепление фрагмента размером не более 20–30 а.о. Исходя из того, что при этом наблюдалась полная потеря активности белка, мы предположили, что в этом случае происходит дегградация *C*-концевого каталитического домена (рис. 1).

Для уточнения места расщепления было проведено сравнение пептидных карт триптического гидролиза, полученных на основании анализа объединенных (MS + MS/MS) спектров фрагментации исходного белка PSP (рис. 7, 3) и PSP-Tr (рис. 7, 2). На рис. 8, б представлены структуры триптических пептидов, соответствующих *C*-концевой области PSP, идентифицированные при анализе спектров. Для пептида с m/z 2190 Да, уникального для спектра фрагментации PSP, был проведен MS/MS-анализ, показавший, что данный пептид имеет структуру FKAYEDI-

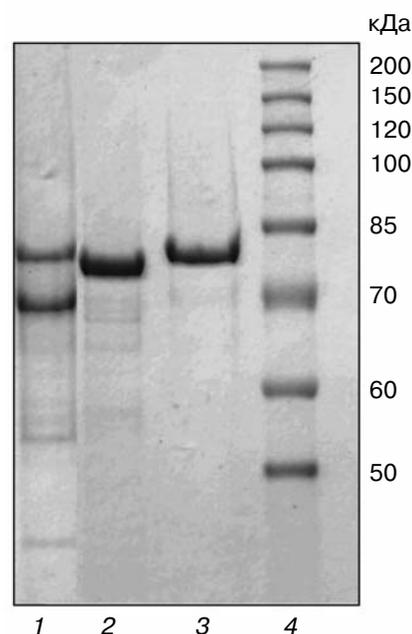


Рис. 7. Ds-Na-ПААГ-электрофорез в 10%-ном ПААГ для идентификации продуктов ограниченного протеолиза PSP: 1 – инкубационная смесь 6 мкМ PSP и 0,2 мкМ Chtr, 24 ч, 25° (смесь PSP и PSP-Chtr); 2 – PSP-Tr (инкубация 300 мкл 10 мкМ PSP с 50 мкл MPG-PA-Tr, 24 ч, 25°); 3 – PSP; 4 – стандарты

ALEYAFILALAE и соответствует 659–677 а.о. С-концевой области PSP.

Кроме того, в MS-спектре полноразмерной PSP были найдены триптические пептиды QLLYTDMDSGHGGKSGR и ELKTDDRQLLLYT-DMDSGHGGKSGR, заканчивающиеся а.о. Arg658,

тогда как в спектре PSP-Tr все более близкие к С-концу пептиды заканчивались а.о. Lys655. Данный факт указывал на то, что при обработке PSP трипсином происходило расщепление пептидной связи Lys655–Ser656 и удаление С-концевого фрагмента размером 22 а.о. (рис. 8, б).

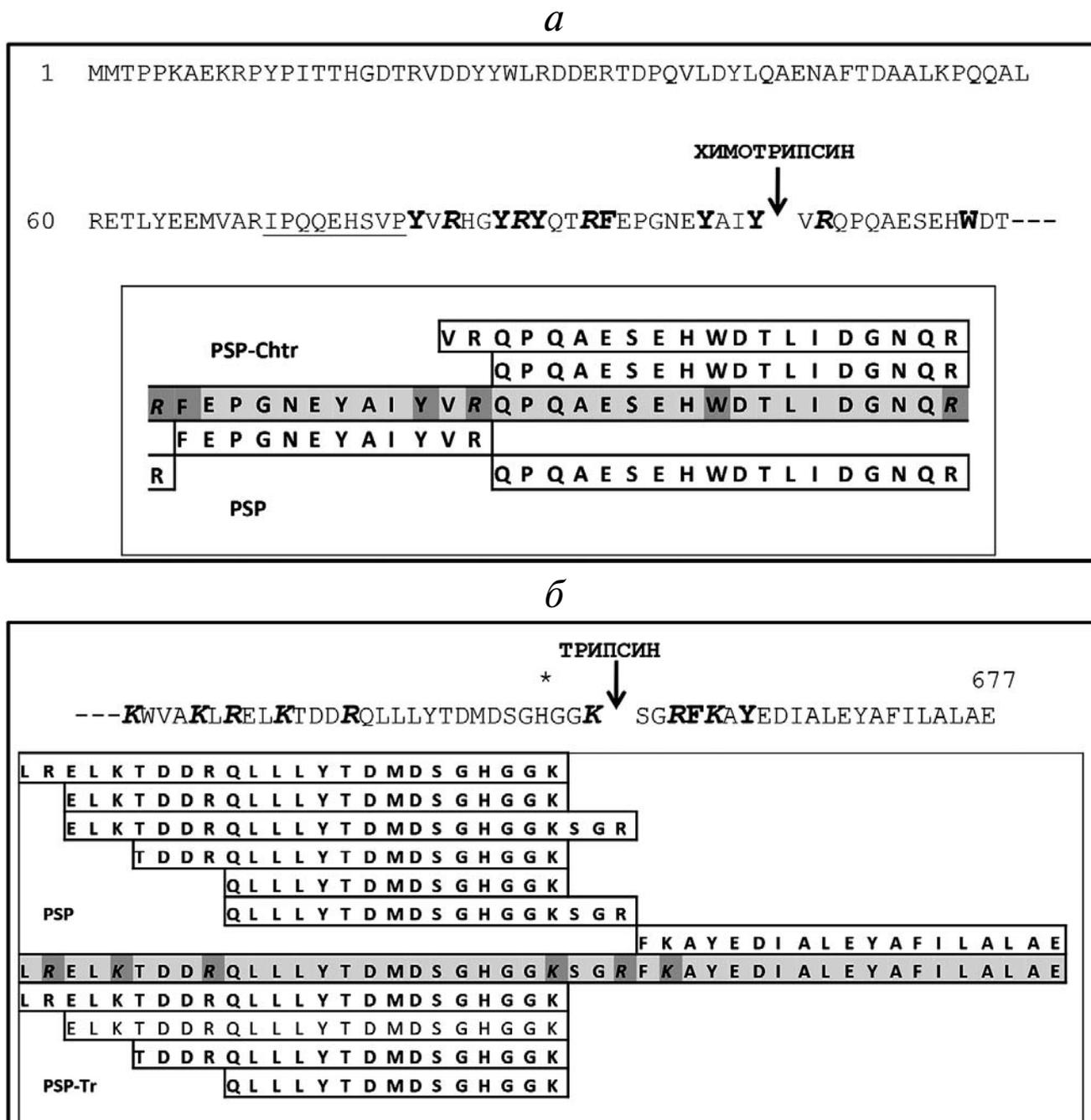


Рис. 8. Ограниченный протеолиз PSP и список триптических пептидов, соответствующих N- и С-концевым областям PSP и идентифицированных при анализе спектров: *a* – химотрипсинолиз, *б* – трипсинолиз. Выделены потенциальные сайты химотрипсинолиза (жирный шрифт) и трипсинолиза (курсив)

Таким образом, обнаружено, что полноразмерный фермент PSP неспособен гидролизовать высокомолекулярный белок азоказеин (23–27 кДа), но в присутствии других протеиназ – химотрипсина и трипсина (или после прединкубации с ними) – наблюдается синергизм их действия. PSP достаточно эффективно гидролизует образовавшиеся в ходе химотрипсинолиза (трипсинолиза) укороченные фрагменты азоказеина, тем самым ускоряя действие этих ферментов более чем вдвое.

Химотрипсинолиз белковой молекулы PSP происходит с отделением 100-аминокислотного *N*-концевого фрагмента (рис. 8, *a*). Согласно данным Ds-Na-ПААГ-электрофореза содержание укороченной PSP (101–677 а.о.) в инкубационной смеси составляло 50–70% (рис. 7, *1*). Такая PSP обладает активностью по отношению к белковым субстратам и может, в отличие от полноразмерной PSP, гидролизовать азоказеин. Эффективность гидролиза азоказеина при этом лишь на порядок ниже эффективности гидролиза этого белка химотрипсином и трипсином. Таким образом, подтверждены наши предположения, что *N*-концевая «скобка», содержащая ~100 а.о. и удерживающая конформацию каталитического домена PSP [13], препятствует гидролизу высокомолекулярных субстратов.

Расщепление PSP иммобилизованным ферментом MPG-PA-Chtr происходит достаточно медленно и не до конца (не более 30–50% гидролиза). В то же время трипсинолиз с помощью MPG-PA-Tr с отщеплением *C*-концевого 22-членного пептида происходит достаточно быстро, активный фермент при этом полностью переходит в укороченный неактивный белок. К полной инактивации фермента при этом приводит не удаление остатка гистидина активного центра (His652), а гидролиз белковой молекулы фермента после остатка Lys655. По-видимому, His652, оказавшись третьим а.о. с *C*-конца, уже не может принимать участие в функционировании активного центра.

Нативная OpdB *T. brucei* не подвергается трипсинолизу, потому что это термостабильный фермент, белковая глобула которого обладает плотной упорядоченной упаковкой [15]. PSP, психрофильная OpdB, обладает более лабильной структурой [20], и ее белковая молекула потенциально более доступна для протеолиза.

Согласно аминокислотной последовательности PSP (рис. 8) как *N*-концевая, так и *C*-концевая области белковой молекулы содержат близкорасположенные потенциальные сайты химотрипсинолиза и трипсинолиза. Очевидно, что остатки Arg фрагмента 82–102 PSP недоступны для протеолиза, в отличие от соответствующих ароматических остатков. Противоположная ситуация в отношении *C*-концевого фрагмента 627–667, где трипсинолиз связи Lys655–Ser666 происходит, а химотрипсинолиз связи Phe659–Lys660 – нет. Объяснение данного феномена будет возможно лишь после определения пространственной структуры PSP.

Химотрипсинолиз белковой молекулы PSP происходит вблизи границы между первым и вторым *N*-концевыми ЭЛИС высшего ранга (рис. 2, *z*) – с расщеплением связи Tyr100–Val101. Тот факт, что укороченный аналог PSP, полученный путем удаления *N*-концевого ЭЛИС высшего ранга, проявляет активность в отношении высокомолекулярных субстратов, полностью отсутствующую в полноразмерном ферменте, подтверждает ценность использования метода АНИС в белковой инженерии ферментов и указывает на биотехнологическую перспективность получения и исследования различных делеционных вариантов PSP.

Авторы выражают благодарность И.А. Каменихой и Л.А. Новиковой (ИНБИ им. А.Н. Баха РАН) за проведение масс-спектрометрического анализа.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ: гранты 14-50-00131 (теоретический расчет структуры укороченных вариантов PSP, разработка методик ограниченного протеолиза и определения активности фермента и прочие биохимические исследования) и 14-24-00172 (выделение и очистка белка, масс-спектрометрический анализ), а также Программы фундаментальных исследований Президиума РАН по стратегическим направлениям развития науки «Фундаментальные проблемы математического моделирования» по теме: «Математическая модель пространственной организации природных полипептидных цепей на основе информационного контента первичной структуры (2014–2016 гг.)» (разработка метода дизайнера белковых молекул).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Polgar, L. (2002) The prolyl oligopeptidase family, *Cell. Mol. Life Sci.*, **59**, 349–362.
- Coetzer, T.H., Goldring, J.P., and Huson, L.E. (2008) Oligopeptidase B: a processing peptidase involved in pathogenesis, *Biochimie*, **90**, 336–344.
- Burleigh, B.A., Caler, E.V., Webster, P., and Andrews, N.W. (1997) A cytosolic serine endopeptidase from *Trypanosoma cruzi* is required for the generation of Ca²⁺ signaling in mammalian cells, *J. Cell Biol.*, **136**, 609–620.
- Morty, R.E., Shih, A.Y., Fulop, V., and Andrews, N.W. (2005) Identification of the reactive cysteine residues in oligopeptidase B from *Trypanosoma brucei*, *FEBS Lett.*, **579**, 2191–2196.
- Morty, R.E., Pelle, R., Vadasz, I., Uzcanga, G.L., Seeger, W., and Bubis, J.J. (2005) Oligopeptidase B from *Trypanosoma evansi*. A parasite peptidase that inactivates atrial natriuretic factor in the bloodstream of infected hosts, *J. Biol. Chem.*, **280**, 10925–10937.
- de Matos Guedes, H.L., Carneiro, M.P.D., Gomes, D.C.O., Rossi-Bergmann, B., and de Simone, S.G. (2007) Oligopeptidase B from *Leishmania amazonensis*: molecular cloning, gene expression analysis and molecular model, *Parasitol. Res.*, **101**, 853–863.
- Yan, J.-B., Wang, G.-Q., Du, P., Zhu, D.-X., Wang, M.-W., and Jiang, X.-Y. (2006) High-level expression and purification of *Escherichia coli* oligopeptidase B, *Protein Expr. Purif.*, **47**, 645–650.
- Yoshimoto, T., Tabira, J., Kabashima, T., Inoue, S., and Ito, K. (1995) Protease II from *Moraxella lacunata*: cloning, sequencing, and expression of the enzyme gene, and crystallization of the expressed enzyme, *J. Biochem.*, **117**, 654–660.
- Morty, R.E., Fulop, V., and Andrews, N.W. (2002) Substrate recognition properties of oligopeptidase B from *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*, *J. Bacteriol.*, **184**, 3329–3337.
- Mustafa, M.S.M., Nakajima, Y., Oyama, H., Iwata, N., and Ito, K. (2012) Assessment of substrate inhibition of bacterial oligopeptidase B, *Biol. Pharm. Bull.*, **35**, 2010–2016.
- Fenno, J.C., Lee, S.Y., Bayer, C.H., and Ning, Y. (2001) The opdB locus encodes the trypsin-like peptidase activity of *Treponema denticola*, *Infect. Immun.*, **69**, 6193–6200.
- Bagarozzi, D.A., Jr., Potempa, J., and Travis, J. (1998) Purification and characterization of an arginine-specific peptidase from ragweed (*Ambrosia artemisiifolia*) pollen, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, **18**, 363–369.
- McLuskey, K., Paterson, N.G., Bland, N.D., Isaacs, N.W., and Mottram, J.C. (2010) Crystal structure of *Leishmania major* oligopeptidase B gives insight into the enzymatic properties of a trypanosomatid virulence factor, *J. Biol. Chem.*, **285**, 39249–39259.
- Canning, P., Rea, D., Morty, R.E., and Fulop, V. (2013) Crystal structures of *Trypanosoma brucei* oligopeptidase B broaden the paradigm of catalytic regulation in prolyl oligopeptidase family enzymes, *PLoS One*, **8**, e79349.
- Ismail, N.I., Yuasa, T., Yuasa, K., Nambu, Y., Nisimoto, M., Goto, M., Matsuki, H., Inoue, M., Nagahama, M., and Tsuji, A. (2010) A critical role for highly conserved Glu(610) residue of oligopeptidase B from *Trypanosoma brucei* in thermal stability, *J. Biochem.*, **147**, 201–211.
- Михайлова А.Г., Лихарева В.В., Хайруллин Р.Ф., Лубенец Н.Л., Румш Л.Д., Демидюк И.В., Костров С.В. (2006) Новая психрофильная трипсиноподобная протеиназа из *Serratia proteamaculans*, *Биохимия*, **71**, 697–706.
- Хайруллин Р.Ф., Михайлова А.Г., Себякина Т.Ю., Лубенец Н.Л., Зиганшин Р.Х., Демидюк И.В., Громова Т.Ю., Костров С.В., Румш Л.Д. (2009) Олигопептидаза В из *Serratia proteamaculans*. I. Определение первичной структуры, выделение и очистка природного и рекомбинантного фермента, *Биохимия*, **74**, 1427–1437.
- Михайлова А.Г., Хайруллин Р.Ф., Демидюк И.В., Громова Т.Ю., Костров С.В., Румш Л.Д. (2011) Олигопептидаза В из *Serratia proteamaculans*. II. Энзиматическая характеристика – субстратный анализ, влияние ионов кальция, pH- и температурная зависимость, *Биохимия*, **76**, 591–603.
- Михайлова А.Г., Хайруллин Р.Ф., Коломийцева Г.Я., Румш Л.Д. (2012) Олигопептидаза В из *Serratia proteamaculans*. Ч. III. Ингибиторный анализ. Особенности взаимодействия с ингибиторами металлопротеиназ, *Биохимия*, **77**, 384–391.
- Mikhailova, A.G., Khairullin, R.F., Demidyuk, I.V., Kostrov, S.V., Grinberg, N.V., Burova, T.V., Grinberg, V.Ya., and Rumsh, L.D. (2014) Cloning, sequencing, expression, and characterization of thermostability of oligopeptidase B from *Serratia proteamaculans*, a novel psychrophilic protease, *Protein Express. Purif.*, **93**, 63–76.
- Nekrasov, A.N., Anashkina, A.A., and Zinchenko, A.A. (2014) A new paradigm of protein structural organization, in *Proceedings of the 2nd International Conference «Theoretical approaches to bioinformation systems» (TABIS 2013)* (Dragovich, B., Panajotovic, R., and Timotijevic, D., eds), Institute of Physics, Belgrade, pp. 1–22.
- Walsh, K.F., and Wilcox, P.E. (1970) Serine proteases, *Methods Enzymol.*, **19**, 31–41.
- Demidyuk, I.V., Kalashnikov, A.E., Gromova, T.Yu., Gasanov, E.V., Safina, D.R., Zabolotskaya, M.V., Rudenskaya, G.N., and Kostrov, S.V. (2006) Cloning, sequencing, expression, and characterization of pretealysin, a novel neutral proteinase from *Serratia proteamaculans* representing a new group of thermolysin-like proteases with short N-terminal region of precursor, *Protein Express. Purif.*, **47**, 551–561.
- Zhigis, L.S., Ivanov, A.E., Rapoport, E.M., Kovalenko, E.A., Getman, E.I., and Zubov, V.P. (1993) Purification of sialic acid binding protein from saprophytic bacteria by hydrophobic interaction chromatography on butyl-toyopearl and polymer-coated porous glass, *Biotechnol. Techniques*, **7**, 667–670.
- Nekrasov, A.N., and Zinchenko, A.A. (2008) Hydrolases: the correlation between informational structure and the catalytic sites organization, *J. Biomol. Struct. Dyn.*, **25**, 553–562.
- Mikhailova, A.G., and Rumsh, L.D. (2000) Enteropeptidase: structure and function: application in biotechnology, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **88**, 159–174.
- Mikhailova, A.G., and Rumsh, L.D. (1999) Autolysis of bovine enteropeptidase heavy chain: evidence of fragment 118–465 involvement in trypsinogen activation, *FEBS Lett.*, **442**, 226–230.

**TRUNCATED VARIANTS OF OLIGOPEPTIDASE B
FROM *Serratia proteamaculans* WITH DIFFERENT ACTIVITY**

**A. G. Mikhailova^{1*}, A. N. Nekrasov¹, A. A. Zinchenko¹,
T. V. Rakitina^{1,2,3}, D. A. Korzhenevsky², A. V. Lipkin^{2,3},
O. A. Razguljaeva¹, M. V. Ovchinnikova^{1,4},
V. A. Gorlenko⁴, L. D. Rumsh¹**

¹ *Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry,
Russian Academy of Science, Miklukho-Maklaya ul. 16/10,
Moscow 117997, Russia; fax: +7(495)335-7103,
E-mail: anna.mikhailova@ibch.ru*

² *Kurchatov Institute, Kurchatova pl. 12, Moscow 123182,
Russia; fax: +7(499)196-1704*

³ *A. N. Bach Institute of Biochemistry, Russian Academy
of Science, Leninsky pr. 33, bld. 2, Moscow 119071,
Russia; fax: +7(495)954-2732*

⁴ *Moscow State Pedagogical University, M. Pirogovskaya ul. 1, bld. 1,
Moscow 119991, Russia*

Received April 7, 2015

Revision received June 2, 2015

Incubation of psychrophilic oligopeptidase B from *Serratia proteamaculans* (PSP, 78 kDa) with chymotrypsin (native or immobilized on modified porous glass MPG-PA) in native condition in the presence of 50% glycerol leads to a truncated enzyme form (PSP-Chtr, ~66 kDa) retaining activity toward the low molecular weight substrate PSP-BAPNA, but in contrast to PSP active toward the protein substrate – azocasein. MALDI-TOF mass-spectrometry revealed that PSP-Chtr lacks the *N*-terminal region of the molecule that envelops the catalytic domain of PSP and is supposed to prevent the hydrolysis of high molecular weight substrates. It was also established that the fragment absent in PSP-Chtr corresponds to the *N*-terminal highest rank element of the informational structure of PSP, therefore confirming the usefulness of the method of informational structure analysis for protein engineering of enzymes. Treating PSP by immobilized trypsin leads also to a stable truncated enzyme form (PSP-Tr, ~75 kDa) lacking the 22 *C*-terminal amino acid residues. PSP-Tr fully loses enzymatic activity, presumably because of conformational changes in the *C*-terminal region affecting His652 of the catalytic triad.

Key words: oligopeptidase B, *Serratia proteamaculans*, azocasein, MALDI-TOF mass spectrometry, analysis of informational protein structure, restricted proteolysis