

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

УДК 543.51: 547

© А. В. Новиков, Н. В. Савельева, А. Н. Симанкова,
Н. В. Краснов, О. А. Миргородская

МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЭНЗИМАТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ НА ПРИМЕРЕ АСПАРТАТНОЙ ПРОТЕИНАЗЫ ИЗ *TRICHODERMA VIRIDE*

Продемонстрирована возможность использования масс-спектрометрии для определения специфических сайтов разрывов в пептидных и белковых субстратах, а также для определения количественных характеристик гидролиза для аспартатной протеиназы из *Trichoderma viride*. Изучена зависимость от pH. Определены кинетические параметры для отдельных наиболее быстро гидролизующихся связей. Показано, что результаты, полученные с помощью масс-спектрометрии, совпадают с данными, полученными с использованием ВЭЖХ.

ВВЕДЕНИЕ

Протеолитические ферменты (протеиназы) широко представлены в природе, и к настоящему времени выявлено несколько тысяч их представителей. Эти ферменты играют важную роль в регуляции основных физиологических процессов как в норме, так и при патологии. Кроме того, они используются в качестве катализаторов в технологических процессах, а также в структурных исследованиях белков.

Наиболее важным свойством этого класса ферментов является их специфичность, которая прежде всего определяет их участие в реакциях ограниченного протеолиза, которые инициируют появление из предшественников новых биологически активных соединений. Кроме того, протеиназы участвуют в деградации пептидов и белков. Таким образом, в комплексе протеиназы регулируют содержание пептидов и белков в биологических жидкостях на требуемом уровне в процессе функционирования наиболее важных физиологических процессов.

Как правило, изучение специфичности протеиназ осуществляется при гидролизе достаточно коротких пептидов или даже соответствующих эфиров аминокислот. Выбор субстратов проводится таким образом, чтобы в них разрывалось ограниченное количество связей, поскольку идентификация образующихся продуктов вызывает некоторые затруднения. При использовании более сложных субстратов, в которых осуществляется гидролиз нескольких пептидных связей, специфичность изучалась только для продуктов исчерпывающего гидролиза. Это обусловлено тем, что наличие более чем одного сайта расщепления на начальных стадиях гидролиза приводит к образованию большого ко-

личества промежуточных продуктов, подвергающихся дальнейшим превращениям. Очевидно, что даже определять состав продуктов в таких смесях затруднительно. А тем более сложно контролировать их текущие концентрации в гидролизатах.

Отметим, что появление таких масс-спектрометрических методов, как ESI-MS и MALDI-MS, в сочетании с ВЭЖХ положило начало изучению специфичности протеиназ на пептидных субстратах, в которых возможны несколько сайтов разрывов [1, 2].

В настоящей работе подобные исследования, включая использование в качестве субстратов не только пептидов, но и белков, были продолжены изучением специфичности карбоксильной протеиназы из *Trichoderma viride* (Tv-протеиназы). Интерес к изучению специфичности именно карбоксильных протеиназ в последнее время значительно возрос, т. к. имеется довольно мало данных о специфичности гидролиза отдельных амидных связей в олиго- и полипептидных субстратах. При этом необходимо учесть, что именно они являются их природными субстратами.

Новизной этой работы является то, что для изучения специфичности масс-спектрометрия была использована не только для идентификации продуктов гидролиза, но и для количественных измерений концентраций отдельных пептидов.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее в работе [1] нашей группой было исследовано действие протеиназы из *Trichoderma viride* (Tv-протеиназы) на такие субстраты, как мелиттин (М 2846) и инсулин свиньи (М 5778). Были обнаружены некоторые отличия по специфичности

действия и скоростям гидролиза наиболее быстро разрываемых связей в сравнении с более хорошо изученными пепсином и гастриксином. В частности, было показано, что *Ty*-протеиназа способна разрывать связи вблизи основной аминокислоты (например, при гидролизе мелиттина по связи Lys-Val), что характерно и для других аспартатных протеиназ из аналогичных источников [1, 2].

1. Изучение специфичности аспартатной протеиназы из *Trichoderma viride* в отношении гидролиза синтетического пептида сурфагона

Работы по изучению этого фермента были продолжены на примере гидролиза другого субстрата — сурфагона (SPN), являющегося синтетическим аналогом гормона люлиберина (гонадолиберина), регулирующего секрецию как лютеинизирующего, так и фолликулостимулирующего гормонов передней доли гипофиза [3] и имеющего следующую структуру:

Pglu-His-Trp-Ser-Tyr-dAla-Leu-Arg-Pro(NH-Et).

Отличительной особенностью этого биологически активного субстрата является наличие в его последовательности остатка dAla. Ранее нами было показано [2], что гидролиз сурфагона гастриксином идет именно вблизи этого остатка по связи Tyr-dAla наряду с гидролизом связей His-Trp и Trp-Ser. Напомним, что в отличие от гастриксина пепсин не гидролизует связь Tyr-dAla, а преимущественно гидролизует связь Trp-Ser. Предстояло прежде всего выяснить, какова специфичность протеиназы из *Trichoderma viride* в отношении гидролиза сурфагона.

Определение сайтов расщепления в сурфагоне под действием протеиназы из *Trichoderma viride*

Первые эксперименты показали, что этот субстрат гидролизует *Ty*-протеиназой как при pH 3.0 (рис. 1, а), так и при pH 6.5 (рис. 1, б). Причем одинаковая (максимальная) скорость убыли SPN (пик 5, рис. 1, а, б) достигается примерно в 10 раз быстрее при pH 6.5 (30 мин) против pH 3.0 (5 ч).

Масс-спектрометрический анализ выделенных фракций позволил определить продукты гидролиза (табл. 1) и соответственно выявить места разрывов.

Из полученных данных следует, что при pH, близких к нейтральным, наблюдаются преимущественно продукты — результат гидролиза ферментом связей Arg-Pro и His-Trp (рис. 1, б; табл. 1). А в области значений pH, типичных для подобных протеиназ [5] (рис. 1, а; табл. 1), наблюдается еще

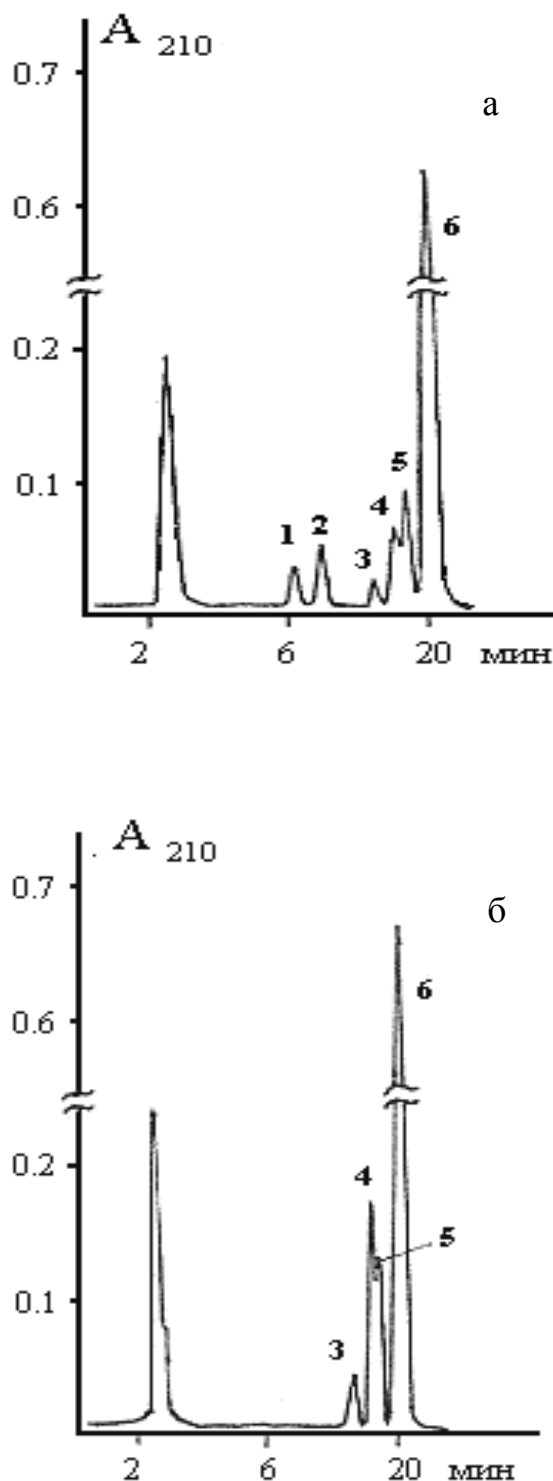
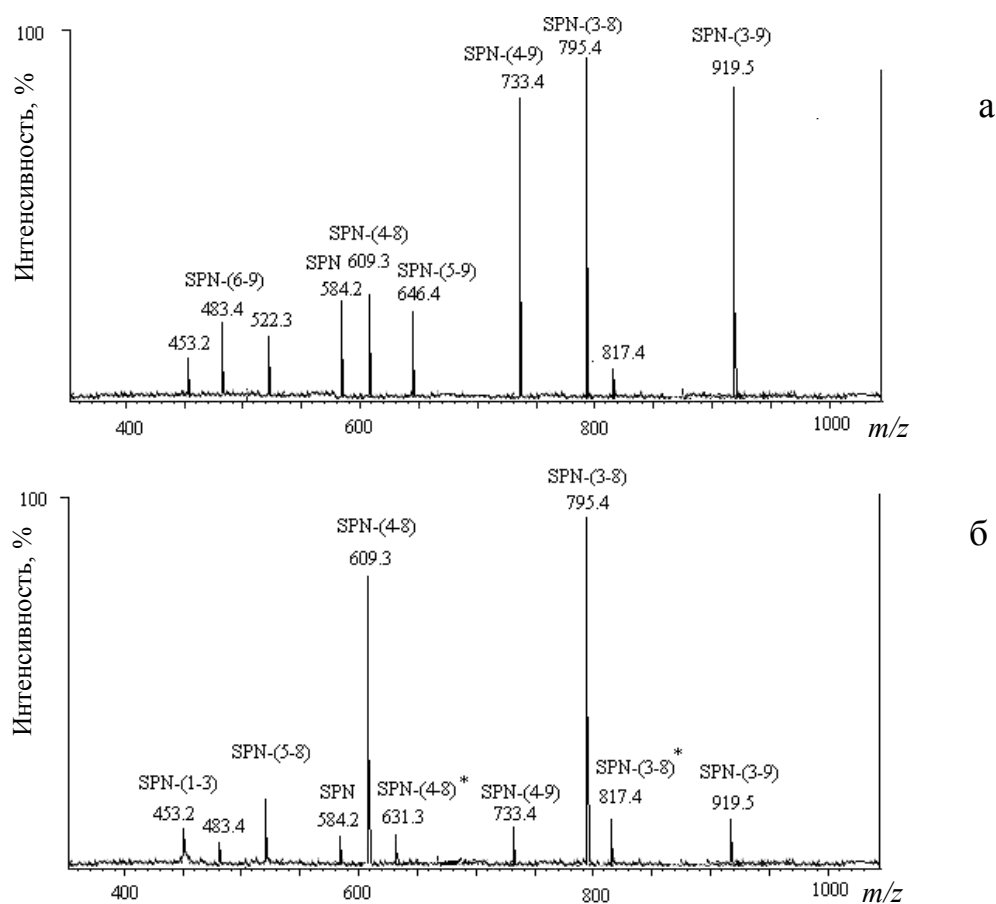


Рис. 1. Хроматограмма смеси продуктов расщепления сурфагона грибной протеиназой при pH 3.0 за 300 минут (а) и при pH 6.5 за 30 минут (б) при 37°C

Табл. 1. Продукты гидролиза сурфагона протеиназой из *Trichoderma viride*

Номер пика	Масс-спектрометрические данные, m/z *	ММ продуктов, Da*		Продукты
		Измерено	Рассчитано	
1	733.2	732.2	732.4	SPN-(4-9)
2	453.0	452.0	452.2	SPN-(1-3)
3	795.2	794.2	794.4	SPN-(3-8)
4	1043.4	1042.4	1042.5	SPN-(1-8)
5	919.3	918.3	918.4	SPN-(3-9)
6	1167.5	1166.5	1166.4	SPN

* Приведены значения моноизотопных масс.

**Рис. 2.** ESI-MS спектры реакционных смесей, полученных при гидролизе SPN грибной протеиназой в течение 48 ч при pH 3.0 (а) и при pH 6.0 (б) соответственно.* — положительно заряженные ионы, регистрируемые в виде $M+Na$

один разрыв по связи Trp-Ser со скоростью, примерно в 2 раза меньшей, чем скорость гидролиза по связи Arg-Pro. Следует отметить, что, как показали результаты масс-спектрометрического анализа гидролизатов SPN (рис. 2, а и б), при увеличении времени гидролиза до 48 ч как при pH 6.0, так и при pH 3.0 в конечном итоге наблюдается появление продуктов, соответствующих одинаковым разрывам связей: Arg-Pro, His-Trp, Trp-Ser и Ser-Tyr. Таким образом, в зависимости от условий проведения гидролиза различие в специфичности для Tv-протеиназы проявляется главным образом на начальных скоростях гидролиза. В результате этого фермент может принимать участие в реакциях ограниченного протеолиза.

Определение pH-оптимума гидролиза SPN под действием Tv-протеиназы

Выявленная зависимость состава продуктов и скоростей их образования при гидролизе SPN была подробно исследована в диапазоне pH 1–9. Результаты экспериментов представлены на рис. 3. Из полученных данных следует, что гидролиз наиболее быстро разрываемой связи Arg-Pro имеет максимум в области pH 5.2–5.6. Образование же продуктов гидролиза в результате разрыва связи Trp-Ser наблюдалось только для двух рассмотренных значений pH 3.0 и 4.0 с максимумом при pH 3.0. Отметим, что скорость гидролиза связи Trp-Ser составляла всего 1 % от скорости гидролиза по связи Arg-Pro в pH-оптимуме (данные на рис. 3 не приведены).

Полученные данные отличаются от картины pH-зависимости гидролиза SPN протеиназами желудочного сока человека [4], где основными были разрывы по связям Trp-Ser и dAla-Leu. При этом для первой разрываемой связи максимальная скорость наблюдалась при pH 4.7, гидролиз же второй связи не зависел от pH. Сравнение действия всех трех ферментов показывает, что скорости гидролиза связи Trp-Ser в сурфактоне при pH 3.0 пепсином А и гастриксином выше приблизительно в 60–100 раз, чем в случае Tv-протеиназы.

Кинетические исследования гидролиза SPN Tv-протеиназой

Сравнительная оценка способности данной Tv-протеиназы к гидролизу отдельных связей и исследование последовательности гидролиза могут быть проведены только на основании кинетических данных. Для их получения на разных степенях гидролиза SPN Tv-протеиназой отбирались алиquotы, реакция останавливалась кипячением. Концентрации исходного субстрата и основных продуктов его гидролиза прежде всего определялись из хроматографических данных с учетом соответствующих площадей хроматографических

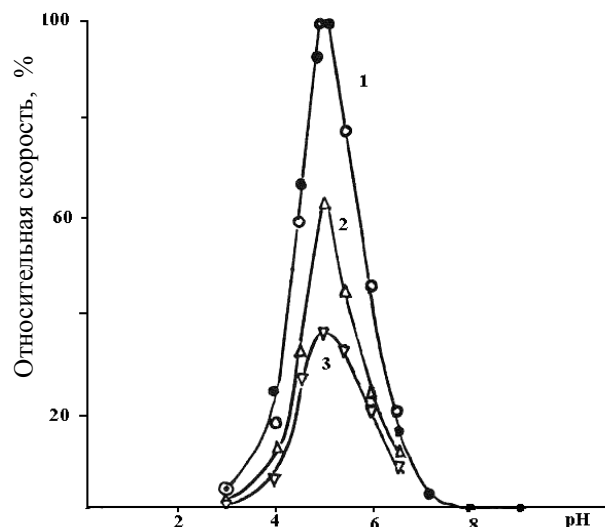


Рис. 3. pH-зависимость скорости гидролиза сурфактона (1) грибной протеиназой по связям His-Trp (2) и Arg-Pro (3). Скорость выражена в процентах от максимальной начальной скорости при pH 5.0–5.2

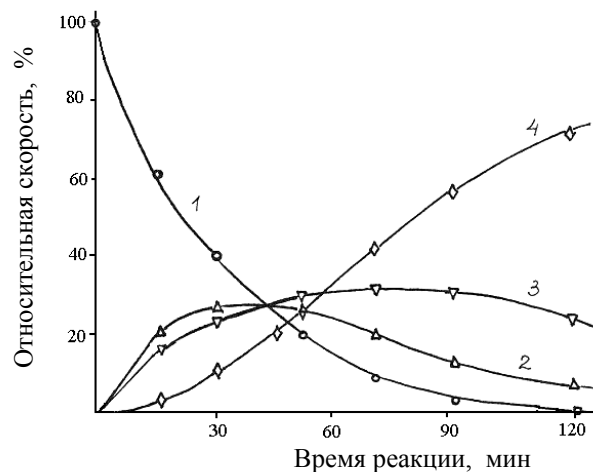


Рис. 4. Кинетические кривые гидролиза SPN грибной протеиназой. Условия гидролиза: начальные концентрации SPN и протеиназы 850 мкМ и 14 мкМ соответственно; 0.02 М ацетат-аммонийный буфер; pH 5.0 и 37°C. 1 — SPN; 2 — SPN-(3-9); 3 — SPN-(1-8); 4 — SPN-(3-8). В случаях 3 и 4 концентрация определялась с использованием MALDI-MS

пиков и коэффициентов экстинкций, рассчитанных по аддитивной схеме с учетом поглощения при выбранной длине волны для пептидных связей и отдельных аминокислот. Результаты одного из экспериментов представлены на рис. 4, pH взято

в значениях, близких к оптимальным. Из серии подобных экспериментов были определены зависимости начальных скоростей гидролиза сурфагона по связям Arg-Pro и His-Trp от начальных концентраций субстрата. Полученные значения начальных скоростей в координатах Лайнуивера—Берка представлены на рис. 5. На основании этих данных вычислены значения каталитических $K_{\text{кат}}$ и K_m для первичных разрывов по связям Arg-Pro и His-Trp (табл. 2) и эффективность гидролиза как $K_{\text{кат}} / K_m$. Для сравнения в этой же таблице представлены аналогичные характеристики гидролиза SPN пепсином по наиболее быстро гидролизуемой связи.

Видно, что Tv-протеиназа гидролизует SPN значительно более эффективно, чем пепсин. Причем наиболее быстро протеиназа гидролизует связь Arg-Pro, из чего можно сделать вывод о ее участии в реакциях ограниченного протеолиза.

Использование MALDI-MS для получения количественных характеристик гидролиза SPN протеиназой из *Trichoderma viride*

Как следует из представленных выше данных, масс-спектрометрия позволяет надежно идентифицировать продукты, образующиеся в результате гидролиза. Причем идентификация продуктов гидролиза может осуществляться как после ВЭЖХ в отдельных фракциях, так и непосредственно в реакционной смеси. Однако все количественные характеристики по оценке скоростей гидролиза были получены исключительно из данных ВЭЖХ. В отличие от спектрофотометрических измерений (при ВЭЖХ) интенсивности отдельных регистрируемых ионов при масс-спектрометрической детекции не отражают реальных соотношений содержания соответствующих им соединений в анализируемой смеси. В значительной мере это обусловлено тем обстоятельством, что в зависимости от аминокислотного состава в пептидах выход ионов может не воспроизводиться, особенно при ис-

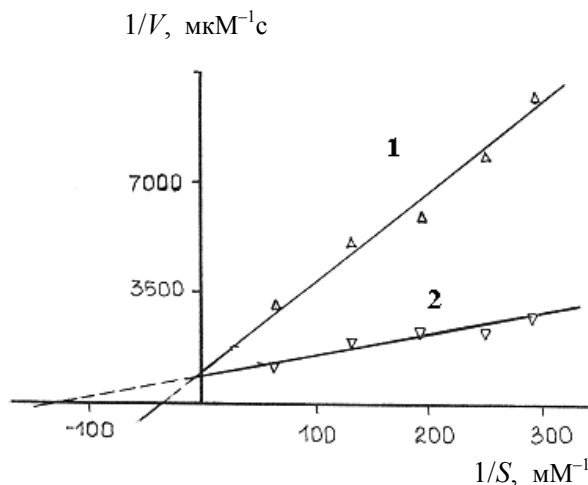


Рис. 5. Зависимость скорости гидролиза SPN грибной протеиназой по связям His-Trp (1) и Arg-Pro (2) от концентрации сурфагона в координатах Лайнуивера—Берка

пользовании MALDI-MS. Вместе с тем известно, что в пептидах соотношения изотопных пиков как природного происхождения с ^{13}C , так и при искусственно введенных стабильных изотопах, например ^{18}O , регистрируются пропорционально их концентрациям. И это позволяет использовать "изотопное разбавление" в сочетании с масс-спектрометрическими методами для количественного определения пептидов и белков [5, 6]. Отметим, что для подобных измерений необходимо иметь изотоп, содержащий стандарты. И такие стандарты для пептидов и белков могут быть получены путем гидролиза подходящими ферментами образца анализируемого соединения с известной концентрацией в присутствии тяжелой воды, обогащенной ^{18}O , как это показано, например, в работе [5].

Табл. 2. Кинетические параметры энзиматического гидролиза SPN при 37 °C

Разрываемая связь	Фермент	pH	K_m , мкМ	$K_{\text{кат}}$, с ⁻¹	$K_{\text{кат}} / K_m$, М ⁻¹ /с ⁻¹
His-Trp	Tv-протеиназа	5.0	30	0.011	370
Arg-Pro	„	5.0	8	0.012	1500
Trp-Ser	Пепсин	3.0	660	0.006	9

В случае гидролиза SPN *Tv*-протеиназой стандарты двух пептидов SPN-(1-8) и SPN-(3-8) могут быть получены при гидролизе исходного субстрата в $H_2^{18}O$. Отметим, что для нас наибольший интерес представляет получение стандарта для пептида SPN-(1-8), поскольку именно измерение его концентраций отражает начальные скорости гидролиза SPN. Поскольку этот пептид является промежуточным продуктом в процессе гидролиза, необходимо выбрать время, когда его содержание в реакционной среде близко к максимальному, и остановить реакцию, например, кипячением. В табл. 3 приведены результаты масс-спектрометрической детекции пептидов SPN-(1-8) и SPN-(3-8), полученных при гидролизе SPN в $H_2^{18}O$.

В данном случае, как видно из таблицы, осуществлялось включение только одного атома ^{18}O именно в результате гидролиза, поскольку отсутствовал дополнительный обмен, который осуществлялся при получении стандартов для количественного определения белков. Полученный раствор с ^{18}O изотоп-содержащими пептидами далее был высушен и перерастворен в водном растворе. Концентрации отдельных пептидов, далее исполь-

зуемых в качестве стандартов для количественных измерений, были определены с использованием ВЭЖХ. Аликвоты из этого раствора использовались для определения концентраций в гидролизатах SPN в пробах, соответствующих определению этих же пептидов в гидролизатах, ранее проанализированных с использованием ВЭЖХ.

В табл. 4 приведен в качестве примера результат масс-спектрометрического измерения пептидов SPN-(1-8) и SPN-(3-8) в одной из реакционных смесей, полученных при гидролизе SPN на 52-й минуте (рис. 4) с использованием в качестве стандартов этих же пептидов с изотопным распределением. Расчет концентраций пептидов проводился аналогично процедуре, описанной в работе [5]. Для расчета были использованы значения 4 моноизотопных пиков. Для масс-спектрометрической детекции к 1 мкл реакционной смеси (после остановки реакции) добавлялось 10 мкл раствора стандарта с концентрацией пептидов SPN-(1-8) и SPN-(3-8) в нем 240 и 86 мкМ соответственно. На мишень для MALDI-MS наносилось 0.3 мкл смеси образца и стандарта. Для ВЭЖХ использовалось непосредственно 100 мкл реакционной смеси. Таким образом, количество образца, необходимое

Табл. 3. Соотношения изотопов ^{18}O по данным масс-спектрометрических измерений в стандартах для двух пептидов SPN после гидролиза *Tv*-протеиназой в $H_2^{18}O$

Пептид	Интенсивности (площади) изотопных пиков						Расчетный изотопный состав по ^{18}O (в %)		
	M	M+1	M+2	M+3	M+4	M+5	$^{18}O_0$	$^{18}O_1$	$^{18}O_2$
SPN-(1-8)	40	25	499	307	100	30	7.5	92.5	0
SPN-(3-8)	22	10	290	135	37	5	7.0	93.0	0

Табл. 4. Масс-спектрометрическое определение и расчет концентраций пептидов SPN-(1-8) и SPN-(3-8) в аликвоте из реакционной смеси (на 52-й минуте гидролиза). Исходная концентрация SPN в реакционной смеси составляла 856 мкМ

Пептид	Содержание стандарта в смеси, мкМ	Интенсивности (площади) изотопных пиков				Содержание пептида в смеси		
						MALDI-MS		ВЭЖХ
		M	M+1	M+2	M+3	мкМ	%	%
SPN-(1-8)	24	817	464	852	481	26	30	30
SPN-(3-8)	9	1002	470	492	205	21	24.5	25

для MALDI-MS и ВЭЖХ, соотносится примерно как 3/1000. Причем с учетом чувствительности современных приборов MALDI-MS можно проводить детектирование пептидов в концентрациях, почти на 2 порядка меньших, чем в наших экспериментах. При этом определение может осуществляться без предварительного фракционирования, поскольку селективность гарантируется выбором соответствующих значений m/z исходя из молекулярного веса анализируемого образца.

Полученные с использованием MALDI-MS значения концентраций пептидов на 52-й минуте в кинетическом эксперименте совпадают со значениями, полученными ранее с использованием ВЭЖХ. Аналогичным образом с использованием этих же стандартов для пептидов SPN-(1-8) и SPN-(3-8) с помощью MALDI-MS были проанализированы остальные реакционные смеси в этом эксперименте, и полученные значения концентраций, выраженные в % по отношению к исходной концентрации SPN, приведены на рис. 4. Наблюдается хорошее совпадение при использовании обоих методов — MALDI-MS и ВЭЖХ.

Возможность использования масс-спектрометрии для оценки скоростей гидролиза отдельных субстратов протеиназами по сути открывает возможности измерения большинства энзиматических характеристик любых ферментов (рН-оптимума, термостабильности, кинетических параметров и т.д.). При этом измерение скоростей будет проводиться по накоплению индивидуальных продуктов, концентрация которых может определяться в реакционных смесях без их предварительного разделения. В принципе, возможно с использованием такого подхода определять одновременно содержание в биологических средах протеиназ по начальным скоростям гидролиза специально подобранных индивидуальных субстратов.

2. Изучение активации трипсиногена и химотрипсиногена аспартатной протеиназой из *Trichoderma*

Как уже отмечалось, выявленная способность к эффективному расщеплению пептидных связей вблизи основных аминокислот дает основание полагать, что *Tv*-протеиназа может участвовать в реакциях ограниченного протеолиза. Традиционно для изучения этого типа реакций для аспартатных протеиназ в качестве субстрата используется трипсиноген (ТГ) и химотрипсиноген (ХТГ). Как показано в работе [4], при обработке вышеуказанных субстратов кислыми протеиназами наблюдается образование активного трипсина (Т) и химотрипсина (ХТ). В настоящее время считается, что активация ТГ (VDDDDK⁶-I¹VG...) заключается в отщеплении с N-конца гексапептида в результате

разрыва связи Lys-Ile и образования Т. В случае ХТГ (CGVPAIQPVLSGLSR¹⁵-I¹⁶VG...) наблюдается расщепление связи Arg¹⁵-Ile¹⁶ с получением ХТ. В обоих случаях разрывается связь именно вблизи основных аминокислот.

Как показали первые эксперименты, протеиназа из *Trichoderma viride* действительно способна к образованию активного Т и ХТ при взаимодействии с ТГ и ХТГ. Контроль за этим процессом легко осуществляется традиционным образом — наблюдением активности вновь образующихся ферментов по их воздействию на низкомолекулярные субстраты. Отметим, что непосредственно *Tv*-протеиназа эти субстраты не гидролизует. Изучение этих процессов может быть дополнено использованием масс-спектрометрических методов, поскольку наряду с активационными процессами можно ожидать и протекания деструктивных процессов, т. к. нельзя исключить возможности гидролиза отличных от ожидаемых при активации сайтов расщепления.

Изучение рН-зависимости активации ТГ и ХТГ *Tv*-протеиназой

Прежде всего была изучена зависимость скорости активации ТГ и ХТГ *Tv*-протеиназой в диапазоне рН 2.0–5.2. Контроль за этим процессом проводился измерением активности вновь образующихся ферментов. Как следует из данных, представленных на рис. 1, максимальная скорость активации ТГ *Tv*-протеиназой наблюдается при рН 3.25, в случае ХТГ это значение составляет

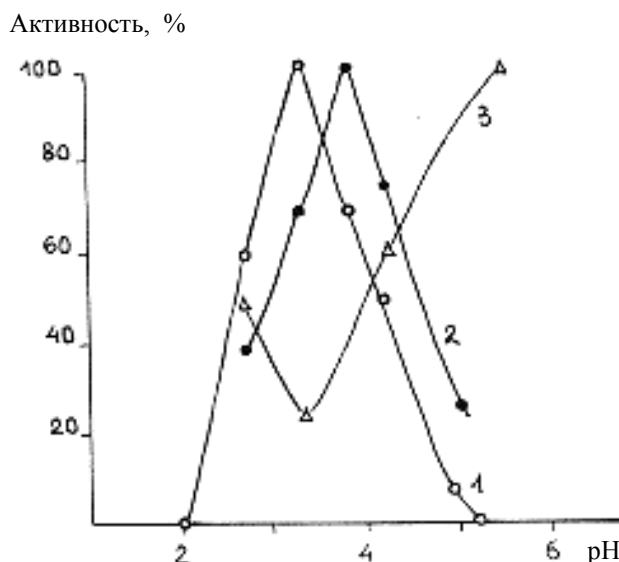


Рис. 6. рН-зависимости: активации ТГ (1) и ХТГ (2) грибной протеиназой; активности грибовой протеиназы после хранения в течение 2 недель при 4 °С (3)

рН 3.8 (рис. 6). Полученные значения лежат в диапазоне рН, несколько сдвинутых в область менее "кислых" значений, характерных для подобных протеиназ. Например, для протеиназ из этой же *Trichoderma viride*, а также и *Trichoderma lignorum* значения рН-оптимумов гидролиза гемоглобина составляют 2.3 и 2.8 соответственно [1]. Возможно, в действительности эти различия обусловлены тем, что гидролиз гемоглобина, использованного в этих экспериментах в качестве субстрата, протекает по многим связям. И выявленный в этом случае рН-оптимум отражает некоторую усредненную характеристику вне зависимости от гидролиза какого-либо типа связи. Полученные нами данные указывают также на то, что если в белках контролировать гидролиз отдельных связей, то рН-оптимум будет лежать в более широкой области значений рН. Таким образом, можно лишь полагать, что при участии подобного типа протеиназ переход от менее специфичного гидролиза к реакциям ограниченного протеолиза может регулироваться выбором подходящих значений рН.

Масс-спектрометрический контроль за активацией ТГ и ХТГ Т_в-протеиназой

Образование Т из ТГ было подтверждено с помощью MALDI-MS (рис. 7). Наряду с Т, представленным в виде моно- и двузарядных ионов ($m/z = 23294.5$ и $m/z = 11647.8$ соответственно), регистрируется ряд других продуктов, идентифицировать которые на основании масс-спектрометрических данных не удалось. Отметим только, что масс-спектрометрические измерения гидролизата на более ранних стадиях не зарегистрировали каких-либо других продуктов с молекулярными массами между Т и ТГ. Это означает, что по крайней мере связь Lys⁶-Phe⁷ в исходном ТГ гидролизует быстрее, чем любая из связей в отщепляющемся N-концевом пептиде. Наличие отщепляемого пептида зарегистрировано в этом же спектре в виде иона с Na⁺ ($m/z = 728.2$). Аналогичные по массам продукты зарегистрированы также с помощью ESI-MS. Фрагмент ESI-спектра отщепляемого пептида, регистрируемого в данном случае в виде иона с H⁺ ($m/z = 706.0$), представлен на рис. 7, б.

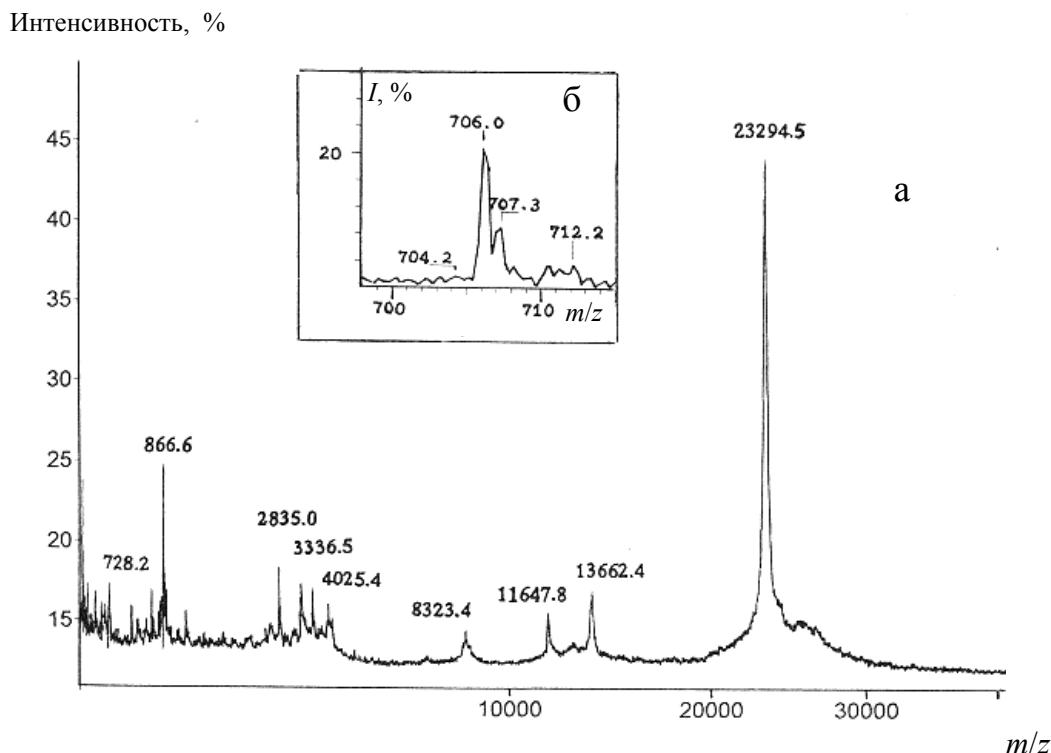
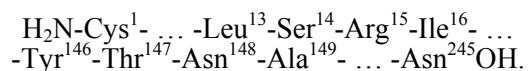


Рис. 7. MALDI-масс-спектр (а) и фрагмент ESI-масс-спектра (б) гидролизата ТГ грибной протеиназой при рН 3.2

В соответствии с обозначениями, принятыми в литературе [6], химотрипсиноген А:



При активации ХТГ возможно образование нескольких форм ХТ:

π -ХТ (ММ 25674.1), разрывы: 15-16;

δ -ХТ (ММ 25430.8), разрывы: 13-14, 15-16;

χ -ХТ (ММ 25448.8), разрывы: 13-14, 15-16, 146-147;

α -ХТ (ММ 25233.6), разрывы: 13-14, 15-16, 146-147, 148-149.

При этом предполагается, что грибные протеиназы так же, как трипсин, осуществляют лишь один разрыв связи 15-16. Все последующие превращения происходят автолитически [7].

С помощью масс-спектрометрии нами показано (рис. 8), что под действием *Tv*-протеиназы наблюдается образование всех последующих за π -ХТ форм, включая α -ХТ ($m/z = 25235.5$), а также δ -ХТ и χ -ХТ, регистрируемых в виде суммарного пика с $m/z = 25240.1$. Необходимо отметить, что использованная масс-спектрометрическая техника не позволяет разрешать пики двух близких по массам форм химотрипсина, а именно δ - и χ -ХТ, поскольку их разница в 18 Да оказывается существенно меньшей, чем полуширина регистрируемых пиков.

Анализируя полученные данные (рис. 8), следует отметить, что при pH 4.2 (кривая 2) наблюдается образование форм ХТ от δ до α , в то время как при pH 5.0 (кривая 3) можно говорить только о δ - и χ -ХТ. При pH 3.2 (кривая 1) через 48 ч ХТ не регистрируется. Вместе с тем дополнительные

Интенсивность (число имп.)

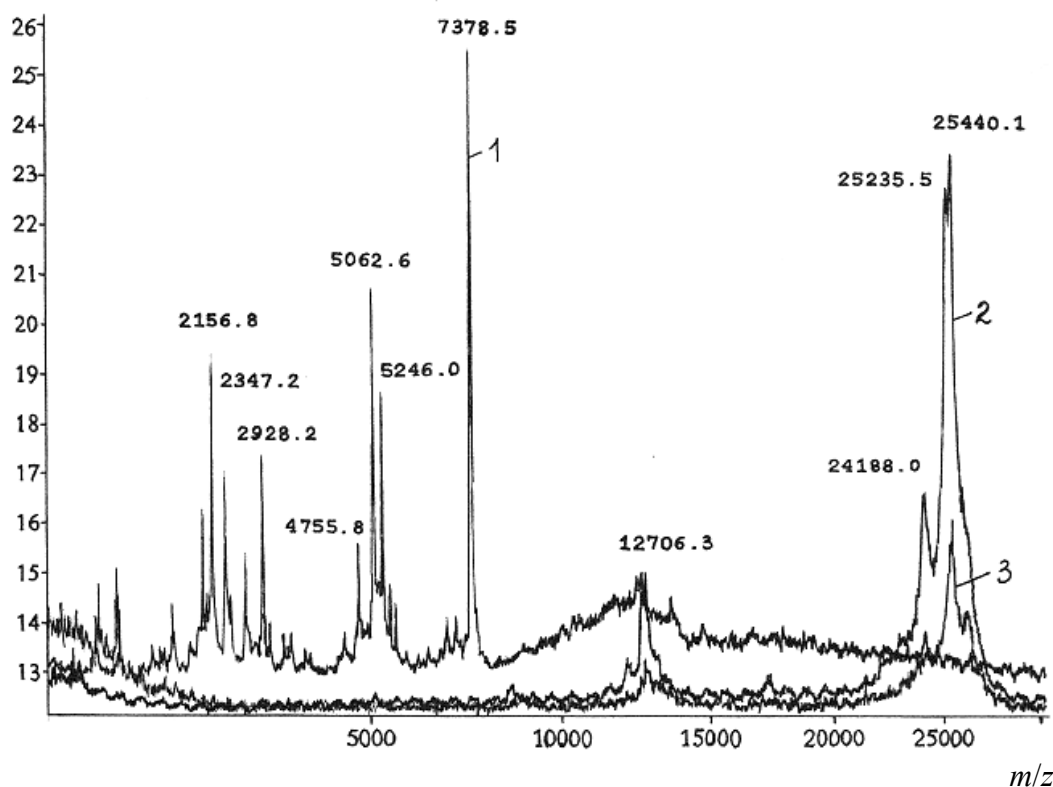


Рис. 8. MALDI-масс-спектры гидролизата ХТГ грибной протеиназой (48 ч) при pH 3.2 (1), pH 4.2 (2) и pH 5.0 (3)

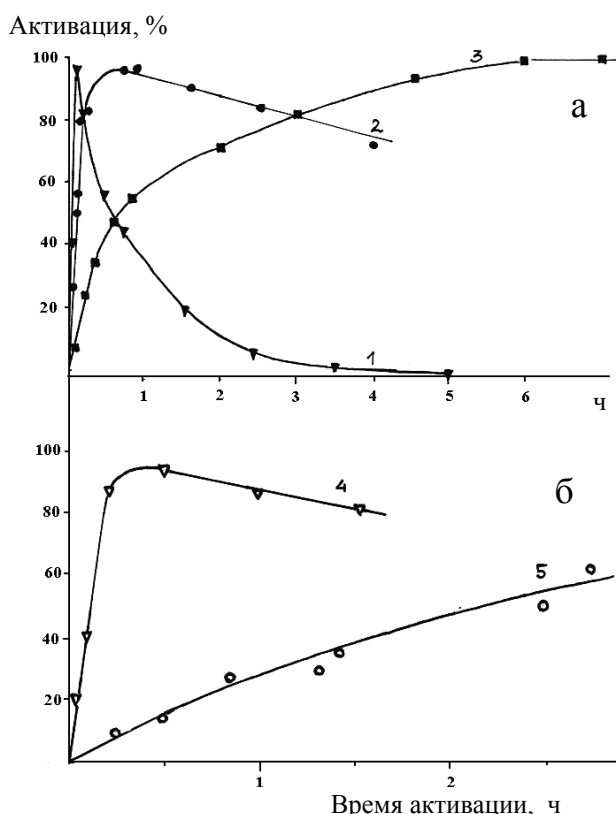


Рис. 9. Активация ТГ (а) (37 мкМ) и ХТГ (б) (33 мкМ) при 37 °С в 0.05 М ацетат-аммонийном буфере рН 3.25 и 3.8 соответственно в зависимости от концентрации протеиназы:
1 — 2.6, 2 — 0.26, 3 — 0.052, 4 — 2.3, 5 — 0.23 мкМ

эксперименты с использованием ESI-MS показали, что формы от δ -ХТ до α -ХТ образуются на начальном этапе (через 5 мин) и исчезают через 90 мин (данные не представлены). Эти результаты показывают, что при рН 3.2 все эти формы подвержены дальнейшему гидролизу *Tv*-протеиназой. Таким образом, следует констатировать, что в зависимости от выбранного значения рН мы в принципе можем иметь разные продукты гидролиза. Полученные данные также позволяют считать возможным, что при функционировании этих протеиназ фактор рН среды наряду с другими факторами в значительной степени может определять участие этих ферментов в различных процессах: от достаточно глубокого гидролиза до реакций ограниченного протеолиза. Кроме того, необходимо еще раз подчеркнуть, что зависимость появления различных форм ХТ от рН указывает на участие *Tv*-протеиназы в реакциях, аналогичных самопревращению π -ХТ.

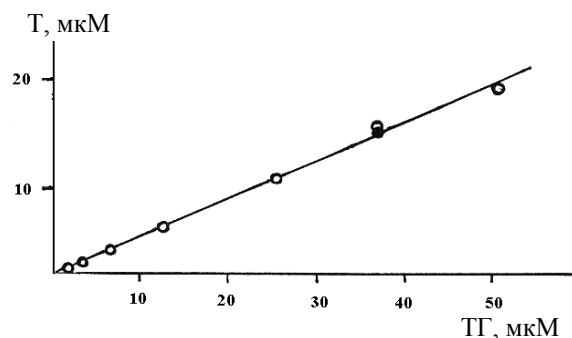


Рис. 10. Зависимость количества трипсина (Т), образовавшегося при активации протеиназой трипсиногена (ТГ), от количества вносимого в реакцию ТГ. Концентрация протеиназы 0.034 мкМ; рН 3.25; 37 °С

Процессы активации ТГ и ХТГ *Tv*-протеиназой, используемой в различных концентрациях, измеряемые по гидролизу специфических низкомолекулярных субстратов, представлены на рис. 9. Во-первых, из полученных данных видно, что с увеличением концентрации *Tv*-протеиназы начальные скорости активации возрастают, и легко рассчитать, что начальные скорости активации протеиназой обоих субстратов в своем рН-оптимуме прямо пропорциональны концентрации фермента. Во-вторых, следует, что при приблизительно равных концентрациях фермента скорость активации ХТГ существенно ниже скорости активации ТГ. Соответственно наблюдаемая при значительных концентрациях фермента инактивация образующихся Т и ХТ оказывается выше в случае ТГ.

Изучение активации *Tv*-протеиназой ТГ при различных его концентрациях показало, что в рассмотренном интервале (от 1.6 до 52.0 мкМ) максимальное количество образовавшегося активного Т строго пропорционально концентрации вносимого в реакцию ТГ (рис. 10). Абсолютное количество активного Т при активации ТГ в максимуме во всех случаях составляет приблизительно лишь 42 % от исходной концентрации ТГ. Остальное количество ТГ гидролизуетсся с образованием более низкомолекулярных, чем Т, продуктов — по данным MALDI-MS (данные не приводятся) и ВЭЖХ (рис. 11). Отметим, что в выбранных условиях проведения ВЭЖХ мы не смогли разделить Т и ТГ. Более того, каждый из этих двух белков всегда был представлен на хроматограмме в виде двух пиков, как это показано на рис. 11, а для ТГ. Возможно, это обусловлено тем, что данные белки склонны к образованию димеров, образующихся или не разрушающихся в процессе хроматографирования. Масс-спектрометрический анализ этих

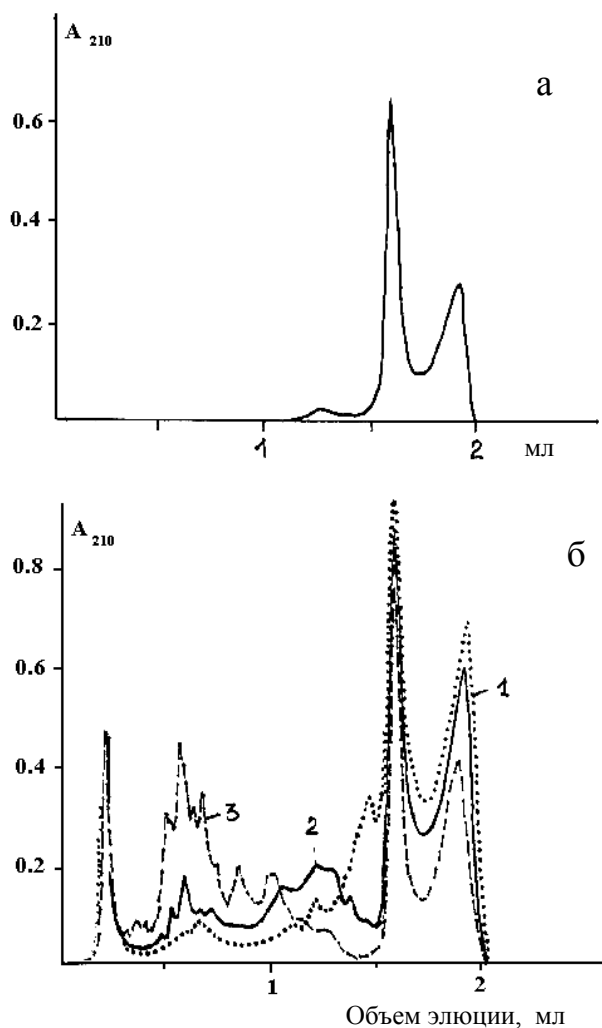


Рис. 11. Хроматограммы исходного ТГ (а) и продуктов его активации (б) протеиназой из *Trich. viride* через 5 мин (1), 20 мин (2) и 4 ч (3) инкубации. Количество загруженного на колонку вещества составляет 5 мкг (а) и по 18.3 мкг (б) соответственно. Условия реакции см. в подписи к рис. 10

пиков показал, что в каждом из них по мере гидролиза регистрируются либо ТГ, либо Т, либо оба вместе (данные не приводятся).

Распределение на хроматограмме других продуктов зависит от времени гидролиза (рис. 11, б), причем начальная скорость образования активного Т более чем в 2 раза ниже скорости образования низкомолекулярных продуктов (рис. 12). По мере накопления отличных от Т продуктов именно они сами становятся предпочтительными объектами для последующего гидролиза *Tv*-протеиназой. В результате вместо ожидаемого из распределения

Относительная концентрация, %

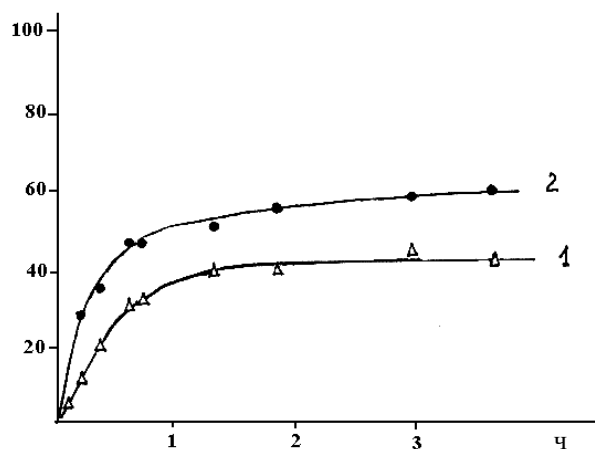


Рис. 12. Образование активного трипсина (1) и низкомолекулярных продуктов (2) в процессе активации трипсиногена (50.8 мкМ) протеиназой (0.085 мкМ) в условиях 0.045 М ацетат-аммонийного буферного раствора с pH 3.25 и 37 °С

начальных скоростей гидролиза количества Т менее 30 % мы наблюдаем образование активного Т в количестве около 42 % от вносимого ТГ.

Относительная стабильность Т в условиях реакции (рис. 12) также указывает на тот факт, что все низкомолекулярные продукты образуются исключительно из ТГ. Учитывая, что аминокислотные последовательности ТГ и Т, за исключением гексапептида, одинаковы, можно предположить, что отщепление этого гексапептида вызывает изменения в конформации образующейся молекулы Т. И именно это делает молекулу Т менее доступной для протеиназы по сравнению с ТГ. Вместе с тем, как показано на рис. 9, а (кривые 1, 2), такое изменение конформации не является достаточным, поскольку при значительном увеличении концентрации протеиназы наблюдается инактивация Т.

Идентифицировать на данном этапе места разрывов в ТГ протеиназой оказалось невозможным вследствие большого числа полученных продуктов гидролиза и трудности соотнесения регистрируемых масс к определенным аминокислотным последовательностям, в том числе из-за наличия дисульфидных связей.

Отметим, что в контрольном эксперименте показано, что инкубация ТГ в аналогичных условиях, но без *Tv*-протеиназы не приводит к его гидролизу, включая активацию.

В случае активации ХТГ количество образованного ХТ выше, чем Т в рассмотренном случае, и составляет приблизительно 80 % от исходного

ХТГ. Остальные 20 %, по данным ВЭЖХ, представляют собой низкомолекулярные продукты, образование которых подтверждается с помощью масс-спектрометрии. Места разрывов, как и в случае гидролиза ТГ, не идентифицированы.

Определение кинетических параметров реакции активации ТГ и ХТГ протеиназой проводили при pH 3.25 и 3.8 соответственно. Полагали, что, поскольку образование активных ферментов и других продуктов гидролиза для обоих субстратов на начальных участках гидролиза идет строго параллельно, то в качестве контроля за процессом активации использование начальных скоростей

образования Т или ХТ оказывается достаточно корректным. Полученные данные суммированы в табл. 5.

Из полученных данных прежде всего следует отметить, что скорости активации протеиназой из *Trichoderma viride* ТГ на порядок превышают таковые для ХТГ, в то время как значения K_m сопоставимы. Аналогичный характер зависимости в отношении активации ТГ и ХТГ протеиназой из *Aspergillus oryzae* описывается в работе [3], хотя сами значения $K_{кат}$ и K_m разнятся для этих ферментов.

Табл. 5. Кинетические константы активации трипсиногена и химотрипсиногена некоторыми грибовыми протеиназами

Источник протеиназы	Трипсиноген				Химотрипсиноген				Откуда данные
	pH	T, °C	K_m , мМ	$K_{кат}$, с ⁻¹	pH	T, °C	K_m , мМ	$K_{кат}$, с ⁻¹	
<i>Trichoderma viride</i>	3.25	37	0.014	0.10	3.8	37	0.02	0.019	Наши
<i>Aspergillus oryzae</i>	3.2–3.6	35	0.10	11.3	3.2–3.6	35	0.18	1.14	[3]
<i>Penicillium janthinellum</i>	3.4 „	0 35	0.0076 „	1.10* 11.0*	— —	— —	— —	— —	[4] „
<i>Aspergillus saitoi</i>	3.5 3.0 4.4	30 1 1	0.0125 0.023 0.015	— 0.14 0.085	— — 4.4	— — 1	— — 0.4	— — 0.00037	[7] [8] „

Примечание. * — расчет по активности, равной 64 и 660 мкМ трипсиногена/мин/мкМ, фермента для 0 и 35 °C соответственно. На основании нескольких измерений при 20 и 30 °C предполагается, что зависимость K_m от температуры незначительна.

Табл. 6. Сравнительные характеристики протеиназы и пепсина в отношении гидролиза отдельных связей при 37 °C

Фермент	pH	Субстрат	Связь	K_m , мкМ	$K_{кат}$, с ⁻¹	$K_{кат} / K_m$, (М·с) ⁻¹
Протеиназа <i>Trich. viride</i>	2.9	Мелиттин	Leu-Thr	15	4.2	280 000
	3.25	ТГ	Lys-Ile	14	0.102	7300
	3.8	ХТГ	Arg-Ile	20	0.019	950
Пепсин А	2.9*	Мелиттин	Leu-Ile	215	18.1	84 000

В табл. 6 суммированы имеющиеся данные ($K_{\text{кат}}$ и K_m) по гидролизу протеиназой из *Trichoderma viride* отдельных связей для ряда субстратов, за исключением SPN (данные по гидролизу отдельных связей в SPN пепсином и *Tv*-протеиназой приведены ранее в подразделе 1). Для некоторых из этих субстратов приведены также результаты их гидролиза пепсином. Прежде всего отметим, что с наибольшей эффективностью *Tv*-протеиназой, а также и пепсином гидролизуются связи, в P_1 -положении которых стоят алифатические аминокислоты, что продемонстрировано на примере мелиттина. Область оптимальных значений гидролиза для протеиназы в этом случае совпадает с pH-оптимумом ($\approx$ pH 3) гидролиза традиционного белкового субстрата, такого как гемоглобин. Для гидролиза связей вблизи основных аминокислот значения оптимума pH сдвинуты в область менее кислых значений. При этом сами значения pH оптимума отличаются для разных субстратов. Сравнение эффективностей гидролиза ($K_{\text{кат}}/K_m$) связи Arg-Ile в ХТГ и сурфаконе позволяет лишь констатировать тот факт, что они сопоставимы по величине как для белка, так и для нанопептида.

ВЫВОДЫ

В результате проведенных экспериментов получены новые данные об энзиматических свойствах *Tv*-протеиназы, из которых особо следует отметить:

- явно выраженную зависимость местоположения сайтов расщепления от pH даже в одном и том же пептидном субстрате;
- выбор характера гидролиза белковых субстратов (ограниченный протеолиз или деструктивный) для *Tv*-протеиназы зависит от первоначального сайта расщепления, т. к. в дальнейшем происходит изменение конформации в пептидной цепи и она оказывается устойчивой к последующему гидролизу.

Несомненна перспективность использования масс-спектрометрии не только для идентификации, но и для оценки активности, а следовательно, и количества ферментов. Полученные результаты указывают на возможность в процессе одного масс-спектрометрического измерения определить компонентный состав протеиназ в биологических средах, что невозможно сделать никакими другими методами.

Приложение. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе были использованы следующие ферменты и белки: протеиназа из гриба *Trichoderma*

viride, выделенная согласно [1], трипсин ("Spofa"), химотрипсин, трипсиноген и химотрипсиноген из поджелудочной железы быка ("Sigma", США). В качестве низкомолекулярных субстратов для определения активности трипсина и химотрипсиногена использовали $N\alpha$ -тозил-L-аргинин-метиловый эфир ("TAME") и N-ацетил-L-тирозин-этиловый эфир ("АТЕЕ") соответственно.

В работе использовали дитиотреит, ацетонитрил и трифторуксусную кислоту ("Merk", Германия). Остальные реактивы имели квалификацию ч.д.а. и "для спектрального анализа".

Определение ферментативной активности

Активность грибной протеиназы тестировали по ее способности активировать трипсиноген или химотрипсиноген до трипсина или химотрипсина соответственно и характеризовали количеством трипсина или химотрипсина в мкМ/мин, образовавшимся в условиях эксперимента.

Трипсинолитическую и химотрипсинолитическую активности определяли титрометрически на спектрофотометре CE 2020 (CECIL, Англия). Исследования выполняли при 25 °C в 0.025 М Трис-HCl буфере с pH 8.1, используя "TAME" (0.0005 М) в качестве субстрата для трипсина и "АТЕЕ" (0.00056 М) для химотрипсина. Измеряли изменение оптической плотности на длине волны 247 нм и 237 нм за одну минуту соответственно при гидролизе "TAME" и "АТЕЕ". В качестве раствора сравнения использовали аналогичный раствор субстрата в буфере без фермента. Одну единицу активности приравнивали к гидролизу 1 мкМ субстрата в мин.

Концентрации по белку трипсиногена, химотрипсиногена и протеиназы из *Trich. viride* определяли по поглощению на 280 нм с использованием коэффициентов экстинкции $E^{1\%}$ 14.3, 20.4 и 16.0 соответственно. Для расчета молярных концентраций зимогенов брали значения молекулярных масс, равные 24 000, 25 700 и 34 500 соответственно.

Активацию трипсиногена и химотрипсиногена протеиназой из *Trich. viride* осуществляли при 37 °C в широком интервале концентраций субстрата и фермента в 0.01–0.1 М ацетат-аммонийном буфере с pH 3.25 и 3.8 соответственно.

pH-зависимость реакции активации протеиназой трипсиногена и химотрипсиногена осуществляли в интервале pH 2.2–5.2 при исходных концентрациях субстрата и фермента 37 мкМ и 0.07 мкМ в случае трипсиногена и 33 мкМ и 2.3 мкМ в случае химотрипсиногена. Реакцию осуществляли в 0.05 М ацетат-аммонийном (pH 2.2–4.9) и 0.05 М натрий-ацетатном (pH 5.0 и 5.2) буферах при 37 °C. Время активации трипсиногена 2 ч, химотрипсиногена 30 мин.

рН-зависимость реакции гидролиза SPN грибной протеиназой исследовали при исходной концентрации субстрата 850 мкМ и мольном соотношении фермент/субстрат 1:60 в 0.08 М уксусной кислоте (рН 3.0), в 0.02 М ацетат-аммонийном буфере (рН 4.0–5.6), в 0.08 М натрий-фосфатном буфере (рН 6.0 и 6.5), в трис-НСl (рН 7.0–9.1). Через определенные промежутки времени из реакционной смеси отбирали пробы, реакцию останавливали и полученные смеси анализировали с помощью ВЭЖХ и масс-спектрометрически.

Изучение стабильности протеиназы

Протеиназу из *Trich. viride* инкубировали в концентрации 0.44 мкМ в воде и 0.09 М ацетат-аммонийном буфере разных значений рН при 4 °С. Через определенные промежутки времени отбирали пробы и активность протеиназы определяли по способности активировать трипсиноген, при этом в реакционной смеси концентрации трипсиногена и протеиназы составляли 7.0 и 0.044 мкМ соответственно. Реакцию активации осуществляли в 0.1 М ацетат-аммонийном буфере при рН 3.25 и 37 °С. Количество образовавшегося трипсина определяли через 13.5 мин, внося 50 мкл реакционной смеси в раствор "TAME" (см. выше).

Определение кинетических параметров реакции активации протеиназой трипсиногена и химотрипсиногена

Трипсиноген (1.6–51.2 мкМ) или химотрипсиноген (3.3–33.0 мкМ) инкубировали в течение 30 мин при 37 °С в 0.045 М ацетат-аммонийном буфере при рН 3.25 или 3.8 с протеиназой из *Trich. viride*, присутствующей в концентрации 0.034 или 0.23 мкМ соответственно. Количество образовавшегося трипсина или химотрипсина немедленно определяли по гидролизу "TAME" или "АТЕЕ" при рН 8.1, что также останавливало реакцию активации. Значения $K_{кат}$ и K_m для активации зимогенов протеиназой вычисляли из графика в координатах Лайнуивера—Берка.

ВЭЖХ проводили на микроколоночном жидкостном хроматографе "Миличром" (ПО "Научприбор") в колонке из нержавеющей стали (2 × 62 мм) с сорбентом Proteins C₄ (VydacTM, США). Элюцию осуществляли градиентом концентрации ацетонитрила от 10 до 50 % (по объему) в растворе 0.1 % трифторуксусной кислоты со скоростью 0.1 мл/мин. Концентрации исходного субстрата и продуктов его гидролиза оценивали по площадям хроматографических пиков с учетом молярных коэффициентов поглощения, рассчитанных по аддитивной схеме [8].

MALDI масс-спектры снимали на времяпролетном масс-спектрометре Vision 2000 (Thermo Bioanalysis Corp, Англия) в виде положительно за-

ряженных ионов в рефлектомоде. Пробы в объеме 0.3 мкл помещали на мишень с предварительно нанесенной в таком же объеме матрицей. В качестве матрицы использовали 2,5-дигидроксibenзойную кислоту (DHB, Aldrich).

ESI-MS масс-спектры снимали в виде положительных ионов на приборах Finnigan MAT95 с магнитным секторным масс-анализатором и двойной фокусировкой и на ESI-TOF, изготовленном в лаборатории экологической и биомедицинской масс-спектрометрии, оборудованном электрораспылительным источником ионизации (electrospray ionization, ESI) и времяпролетным масс-анализатором (TOF). Скорость подачи пробы 1 мкл/мин. Объем вводимой пробы составлял 20 или 10 мкл соответственно. Реакционные смеси перед измерением разбавляли ацетонитрилом 1:1.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Симанкова А.Н. и др. Грибная аспартазная протеиназа из *Trichoderma viride*. Специфичность при гидролизе олигопептидов // Биоорган. химия. 1998. Т. 24. С. 822–830.
2. Миргородская О.А. и др. Расщепление желудочным соком человека аналогов люлиберина, содержащих остаток D-аланина // Биоорган. химия. 1997. Т. 23. С. 611–615.
3. Нейроэндокринология / Под ред. чл.-корр. РАН А.Л. Поленова. СПб., 1994. Ч. 2. С. 89–106.
4. Антонов В.К. Химия протеолиза. М.: Наука, 1983.
5. Mirgorodskaya O.A. et al. Quantitation of peptides and proteins by matrix-assisted laser desorption/ionisation mass spectrometry using ¹⁸O-labeled internal standards // Rapid Commun. Mass Spectrom. 2000. V. 14. P. 1226–1232.
6. Новиков А.В. и др. Использование ESI-MS и изотопно меченных аминокислотных стандартов для определения концентрации белков // Научное приборостроение. 2002. Т. 12, № 4. С. 70–80.
7. Ichishima E. // Meth. Enzym. 1970. V. 19. P. 397–406.
8. Гайда А.В., Остерман А.П., Руденская Г.Н., Степанов В.М. // Биохимия. 1981. Т. 46. С. 181–189.

Институт аналитического приборостроения РАН, Санкт-Петербург (Новиков А.В., Краснов Н.В.)

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург (Савельева Н.В., Симанкова А.Н., Миргородская О.А.)

Материал поступил в редакцию 8.12.2003.

DETERMINATION OF SPECIFICITY OF PROTEINASE FROM TRICHODERMA VIRIDE BY MASS SPECTROMETRY

A. V. Novikov, N. V. Savelieva^{*}, A. N. Simankova^{*}, N. V. Krasnov, O. A. Mirgorodskaya^{*}

Institute for Analytical Instrumentation RAS, Saint-Petersburg

^{}Institute of Cytology RAS, Saint-Petersburg*

The possibility of using mass spectrometry to determine specific sites of hydrolysis of peptide and protein sequence was demonstrated. The types of digested bonds, scheme of hydrolysis, kinetic parameters for most easily hydrolyzable bonds were determined. The effect of pH on the initial rates of SPN hydrolysis was appreciated. The agreement of data from mass spectrometry and HPLC was demonstrated.