

УДК 577.152.3

Обратимая циклическая термоинактивация олигопептидазы В из *Serratia proteamaculans*

М. В. Овчинникова^{1,2}, А. Г. Михайлова^{1*}, Д. М. Карлинский¹, В. А. Горленко², Л. Д. Румш¹¹Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10²Московский педагогический государственный университет, 119991, Москва, ул. М. Пироговская, 1, стр. 1

*E-mail: anna.mikhailova@ibch.ru

Поступила в редакцию 29.01.2018

Принята к печати 11.05.2018

РЕФЕРАТ Обнаружено уникальное свойство олигопептидазы В из *Serratia proteamaculans* (PSP) и ее мутантных вариантов – способность к обратимой термоинактивации при 37°C с возвращением и даже повышением активности выше первоначальной при последующем охлаждении. Процесс можно повторять с теми же результатами многократно (до пяти циклов). Данный эффект можно объяснить сдвигом равновесия между неактивной открытой формой фермента и активной закрытой при изменении температуры инкубации.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА олигопептидаза В, *Serratia proteamaculans*, термоинактивация.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ PSP – протеиназа из *Serratia proteamaculans*; OpdB – олигопептидаза В; BAPNA – *n*-нитроанилид N_α-бензоил-DL-аргинина; ДМСО – диметилсульфоксид.

ВВЕДЕНИЕ

Олигопептидаза В (OpdB) [КФ 3.4.21.83] – это трипсиноподобная сериновая пептидаза, принадлежащая к семейству пролилолигопептидаз. OpdB присутствует в одноклеточных эукариотах: трипаносомах *Trypanosoma cruzi* [1], *T. brucei* [2] и *T. evansi* [3], а также в лейшманиях *Leishmania major* и *L. amazonensis* [4]. OpdB или гены, кодирующие этот фермент, обнаружены в прокариотах: *Escherichia coli* [5], *Moraxella lacunata* [6], *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* [7], *Yersinia pestis* [7], *Serratia marcescens*, *Stenotrophomonas maltophilia* и *Rhodococcus erythropolis* [8], микобактериях *Mycobacterium tuberculosis* и *M. leprae* [7], а также в спирохетах *Treponema denticola* [9]. Представители олигопептидаз В обнаружены также в некоторых высших растениях, например в амброзии *Ambrosia artemisiifolia* [10]. На настоящий момент наиболее изучены OpdB из простейших; определены трехмерные структуры OpdB *L. major* [11] и *T. brucei* [12]. Пространственная структура и энзимологические характеристики большинства бактериальных олигопептидаз В не определены, известны лишь нуклеотидные последовательности кодирующих их генов.

Объектом нашего исследования является олигопептидаза В *Serratia proteamaculans*, названная нами PSP. Ген *OpdB S. proteamaculans* 94 был клонирован,

секвенирован и экспрессирован в *E. coli*; изучена субстратная специфичность OpdB, ингибирование, а также влияние ионов кальция, pH и температуры на активность фермента [13–18].

Все ранее изученные олигопептидазы В как протозойные, так и бактериальные, отличаются высокой термостабильностью [5, 19]. PSP – это первая известная психрофильная олигопептидаза В. Этот фермент достаточно быстро инактивируется при 37°C; процесс термоинактивации не зависит от природы буфера, оставаясь одинаковым в фосфатном, имидазольном и Трис-буфере pH 7.5–8.0 [17]. Спектры собственной флуоресценции указывают на разворачивание молекулы PSP в результате нагревания при 37°C, сопровождающееся уменьшением ферментативной активности. Ионы кальция ускоряют и усиливают инактивацию PSP [17].

При изучении термоинактивации PSP в ходе экспериментов, описанных в [17], неожиданно обнаружили восстановление активности после инкубации некоторых проб при низких температурах. В этом исследовании мы детально изучили этот феномен при [Ca²⁺] = 0 и 50 мМ.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали *n*-нитроанилид N_α-бензоил-D,L-аргинина (BAPNA) (Sigma, США); Трис и NaCl

(Merck, Германия), глицерин (ICN, США); диметилсульфоксид (ДМСО) и *n*-нитрофениловый эфир *n*'-гуанидинобензойной кислоты (Fluka, Германия).

Получение и очистка PSP дикого типа и точечных мутантов, экспрессированных в *E. coli* BL21(DE3) (Novagen), были выполнены как описано в [17, 20].

Оптическое поглощение измеряли на спектрофотометре Eppendorf BioSpectrometer@kinetic (Германия). Концентрацию белка определяли методом Брэдфорда с помощью реактива Bio-Rad Protein Assay, стандарт БСА. Молярность растворов фермента определяли титрованием активных центров *n*-нитрофениловым эфиром *n*'-гуанидинобензойной кислоты [21].

Изучение активности препаратов PSP проводили спектрофотометрически с использованием VAPNA (0.2 мМ) в качестве субстрата в 0.1 М Трис-НСl-буфере, рН 8.0; 50 мМ CaCl₂, содержащем 2% ДМСО при 25°C, регистрируя увеличение оптического поглощения при 405 нм, происходящее при образовании свободного *n*-нитроанилина ($\Delta\epsilon_{405}$ 10400 М⁻¹см⁻¹). Начальные скорости гидролиза субстрата (два-три повтора для каждого измерения; разница в величинах скоростей не более 5–10%) определяли по начальному линейному участку кинетической кривой (степень гидролиза не превышала 10%).

Изучение термостабильности препаратов PSP

Определяли начальную активность фермента дикого типа и его мутантных вариантов (0.05 мг/мл = 0.65 мкМ) после разведения запасного раствора фермента, нагретого до 25°C, в буфере инкубации при этой же температуре, отбирая аликвоты по 5–10 мкл и измеряя начальную скорость гидролиза субстрата VAPNA (0.2 мМ; общий объем 1.5 мл). Аликвоты растворов фермента (100 мкл; 0.65 мкМ) инкубировали в течение соответствующего промежутка времени при соответствующей температуре, отбирая по 5–10 мкл в кварцевую кювету с VAPNA и немедленно измеряя остаточную активность как описано выше. Контрольные пробы всех вариантов PSP с той же концентрацией (0.05 мг/мл = 0.65 мкМ) инкубировали в течение соответствующего промежутка времени при 25 и 4°C так же, как опытные образцы, за исключением нагревания, и определяли их активность.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Характерной особенностью ферментов семейства пролилолигопептидаз, в том числе OpdB, является N-концевой β-пропеллерный домен, препятствующий проникновению в активный центр объемных глобулярных белков, и каталитический домен, распо-

ложенный в С-концевой части молекулы. Изучение трехмерных структур ферментов семейства пролилолигопептидаз показало, что эти белки существуют в открытой (неактивной) и закрытой (активной) форме, находящихся в равновесии. Определение трехмерных структур протозойных OpdB из *L. major* [11] и *T. brucei* [12] показало, что функционирование этих ферментов определяется не только аминокислотными остатками триады активного центра и первичного субстратсвязывающего центра, но и пятью междоменными солевыми мостиками SB1–SB5, в которых задействованы 9 заряженных аминокислотных остатков. Ключевая роль при этом принадлежит мосту SB1 – E 172/179–R650/664 (трипаносома/лейшмания), замыкание-размыкание которого при переходе от открытой неактивной формы фермента к закрытой активной и обратно приводит к образованию триады активного центра или соответственно к ее разрушению. Солевые мосты SB1–SB5 строго консервативны у всех протозойных OpdB.

Аминокислотная последовательность PSP обладает 35% идентичности по отношению к последовательностям OpdB *L. major* и *T. brucei*; в области С-концевого каталитического домена уровень идентичности выше – 50%. При этом участки активного центра и первичного субстратсвязывающего центра у всех этих ферментов практически одинаковы. Однако оказалось, что пять функционально важных междоменных солевых мостов, обнаруженных в протозойных ферментах, не являются консервативными. Только один из них (SB3) сохраняется в PSP, а также в других известных бактериальных OpdB. В положениях, соответствующих пяти из семи заряженных остатков OpdB *L. major* и *T. brucei*, образующих солевые мосты SB1, SB2, SB4 и SB5, в PSP и других исследованных бактериальных OpdB находятся незаряженные или противоположно заряженные аминокислотные остатки. Отсутствует и ключевой солевой мост, отвечающий за активность фермента.

Для выяснения механизма действия PSP мы провели моделирование трехмерной структуры этого белка в закрытой и открытой форме [20].

В результате были выявлены 12 заряженных остатков, образующих структуру из меж- и внутридоменных солевых мостов, определяющих структуру и активность PSP. Восемь из них (E75, E96, E125, D647, D649, K655, R658, K660) были заменены на незаряженные путем точечного мутагенеза. Получены и охарактеризованы соответствующие мутантные ферменты и показана важная роль вышеперечисленных остатков. Удаление заряженных остатков 75, 96, 655 и 658 приводило к инактивации фермента, 125 и 649 – к повышению его активности. В зависимости от использованных субстратов замена остатков 647

и 660 приводила либо к 2–3-кратному понижению активности, либо к 1.5–2-кратному повышению [20].

В данном исследовании сравнили термостабильность при $[Ca^{2+}] = 0$ и 50 мМ PSP дикого типа (wt) и четырех точечных мутантов с заменой заряженных остатков His652-петли PSP (D647A, D649A, K655A и K660A), а также двух точечных мутантов (E75A и E125A) с заменой кислотных остатков, локализованных в N-концевом β -пропеллерном домене, на незаряженные.

Как нами было неоднократно показано ранее, активность препаратов PSP дикого типа [15, 17, 18] и его мутантных вариантов [20] при температуре $\leq 25^\circ C$ в 0.1 М Трис-НСI-буфере, pH 8.0 практически не меняется в течение достаточно длительных интервалов времени (до 10–14 сут); при этом отсутствие или наличие (50 мМ) ионов Ca^{2+} не имеет значения. В данном исследовании активность исходных препаратов PSP, хранящихся как при $4^\circ C$, так и при $25^\circ C$ также оставалась постоянной в течение всего эксперимента.

Данные, представленные на рис. 1А,Б, показывают, что ионы кальция являются дестабилизирующим фактором для всех вариантов PSP. Термостабильность мутантов E75A и E125A при $[Ca^{2+}] = 0$ выше на 20–25% термостабильности фермента дикого типа, а мутантов D649A, K655A, K660A и, особенно D647A, в 1.5–2 раза ниже (рис. 1А). При $[Ca^{2+}] = 50$ мМ различие в термостабильности всех вариантов PSP было менее выражено, однако наиболее термолабильным оказался мутант E75A (рис. 1Б).

На основании данных о скорости инактивации PSP и соответствующих мутантных вариантов этого фермента, представленных на рис. 1, для изучения реактивации вариантов PSP выбрали инкубацию при $37^\circ C$ в течение 3 ч. После определения остаточной активности пробы ферментов инкубировали при $25^\circ C$ (0.5 и 1 ч), определяя активность, а затем оставляли при $4^\circ C$ на 18–20 ч. Обнаружено, что активность как фермента дикого типа, так и всех мутантных вариантов возрастала (рис. 2А,Б), причем в случае wt, E125A и E75A при охлаждении частично термоинактивированной пробы систематически наблюдали 1.2–1.8-кратное повышение начальной активности (рис. 2А–В). Активность D649A при охлаждении достигала 100–107% (рис. 2Г).

Еще более интересным представляется возможность повторения данного цикла нагревания-охлаждения аликвоты вариантов PSP (до 5-кратного), причем каждый цикл включает падение активности при нагревании ($37^\circ C$) с последующим возрастанием при охлаждении (25 и $4^\circ C$). При последующих циклах (2–5) восстановленная активность превышала исходную в меньшей степени (или практически не пре-

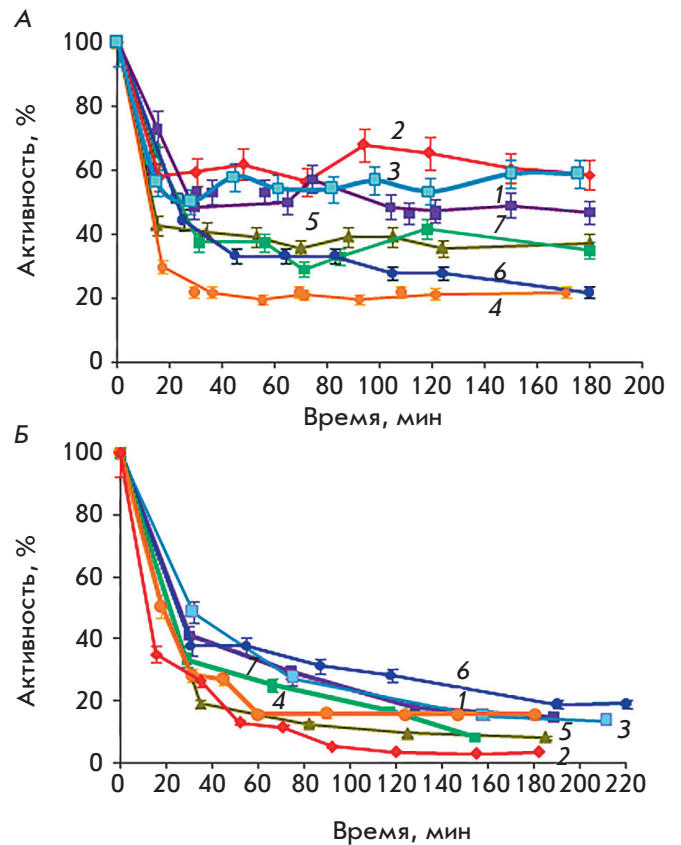


Рис. 1. Инактивация PSP (wt) и мутантных вариантов этого фермента (0.65 мкМ), субстрат ВАРНА, в ходе инкубации при $37^\circ C$ (0.1 М Трис-НСI pH 8.0). А – $[Ca^{2+}] = 0$; Б – $[Ca^{2+}] = 50$ мМ. 1 – wt; 2 – E75A; 3 – E125A; 4 – D647A; 5 – D649A; 6 – K655A; 7 – K660A. Начальная активность ($v_0/[E]$, мин $^{-1}$): wt – 739; E75A – 200; E125A – 1846; D647A – 346; D649A – 923; K655A – 300; K660A – 323

вышала), а активность вариантов D649A в циклах 4 и 5 после охлаждения была меньше исходной (около 80%) (рис. 2Г). Аналогичные опыты по реактивации D647A, K655A и K660A также выявили повышение активности при охлаждении частично денатурированного фермента, однако при этом реактивация в первых двух циклах не превышала 75–80%, а в следующих циклах – 45–50% исходной активности препаратов (данные не приведены).

Охлаждение частично инактивированных проб в присутствии ионов кальция также приводило к повышению активности, но оно не достигало 100%, оставаясь на уровне 64% (wt), 36% (D649A) и 28% (E125A), даже при длительной инкубации (несколько суток) при $4^\circ C$ (рис. 3).

Термостабильность молекулы PSP мы изучали ранее с помощью высокочувствительной дифферен-

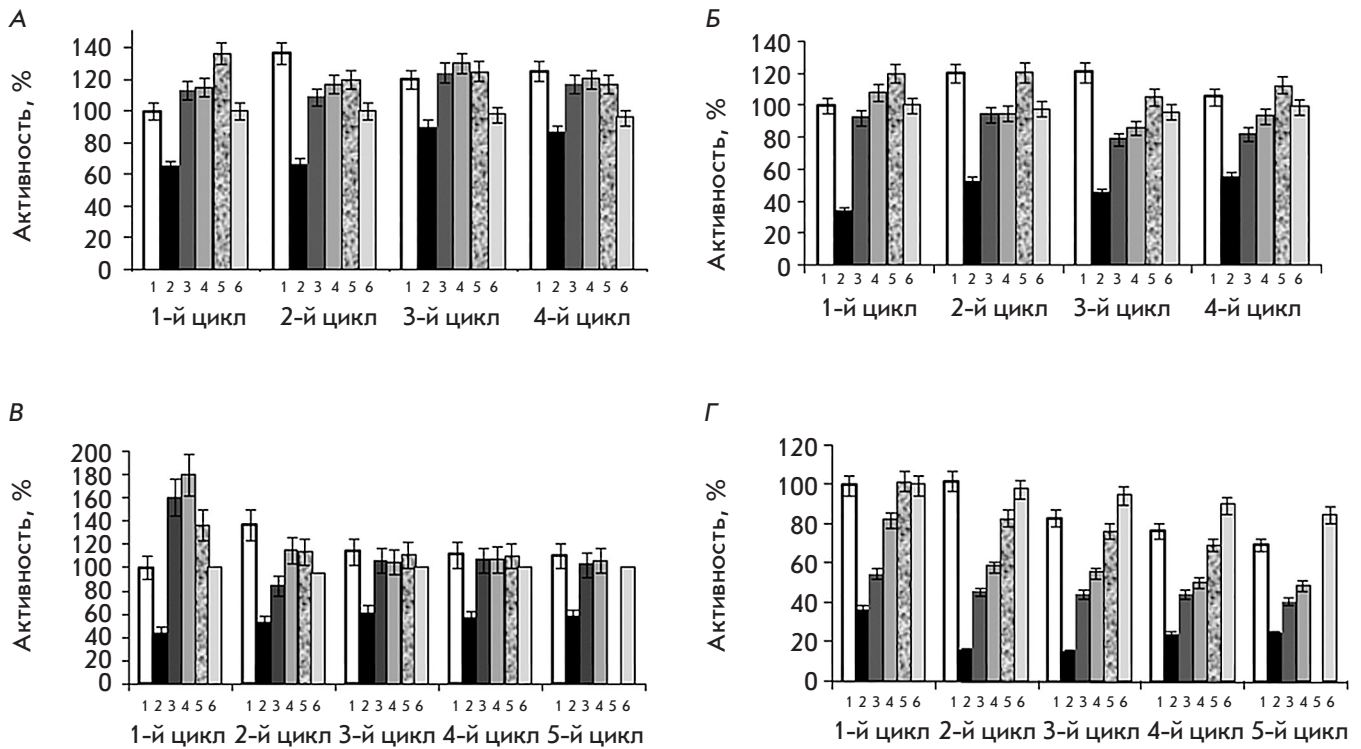


Рис. 2. Влияние на активность мутантных вариантов PSP (0.65 мкМ) циклического нагревания-охлаждения в 0.1 М Трис-НСl pH 8.0. А – wt; Б – E125A; В – E75A; Г – D649A. 1 – начальная активность; 2 – 37°C, 3 ч; 3, 4 – 25°C, 0.5 и 1 ч соответственно; 5 – 4°C; 18–20 ч; 6 – контроль: 25°C, 4 ч и 4°C, 18–20 ч. Начальная активность ($v_0/[E]$, мин⁻¹): wt – 739; E75A – 200; E125A – 1846; D649A – 923

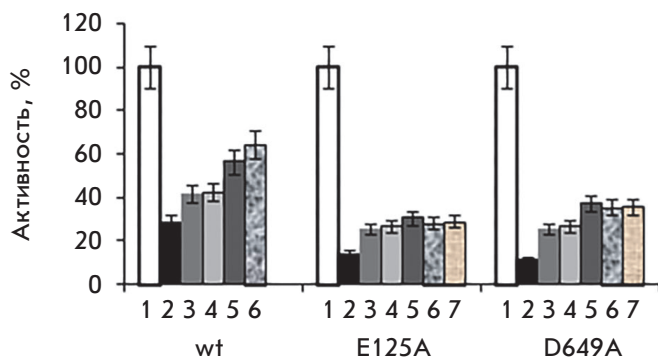


Рис. 3. Влияние на активность PSP (wt), E125A и D649A (0.65 мкМ) последовательного нагревания при 37°C и охлаждения в 0.1 М Трис-НСl pH 8.0, содержащем 50 мМ СаCl₂. 1 – начальная активность; 2 – 37°C, 3 ч; 3, 4 – 25°C, 0.5 и 1 ч соответственно; 5, 6, 7 – 4°C, 18–20, 36–48 и 54–72 ч соответственно

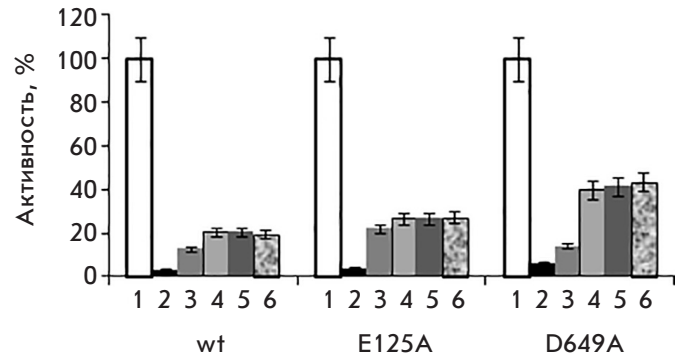


Рис. 4. Влияние на активность PSP (wt), E125A и D649A (0.65 мкМ) последовательного нагревания при 43°C и охлаждения в 0.1 М Трис-НСl pH 8.0. 1 – начальная активность; 2 – 43°C, 0.5 ч; 3, 4 – 25°C, 0.5 и 1 ч соответственно; 5, 6 – 4°C, 18–20 и 36–48 ч соответственно

циальной сканирующей калориметрии (ВЧ-ДСК). Полученные данные выявили низкую термостабильность PSP; кривая теплоемкости этого белка содержала два пика с соответствующими значениями $T_d = 43.1^\circ\text{C}$ (менее стабильный С-концевой каталити-

ческий домен) и 46.3°C (более стабильный N-концевой β -пропеллер) [17].

Мы исследовали влияние на активность PSP (wt, E125A и D649A) инкубации в течение 0.5 ч при температуре 43°C, соответствующей температуре дена-

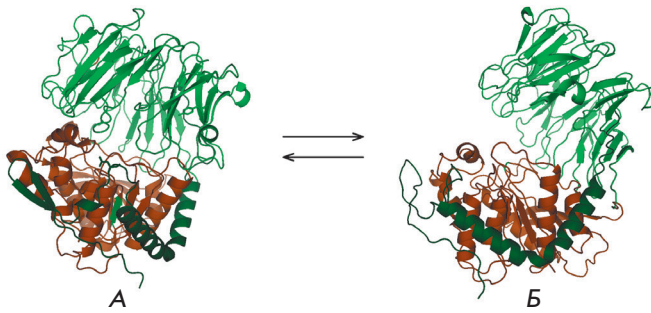


Рис. 5. Активная закрытая (А) и неактивная открытая (Б) формы PSP. Темно-зеленым цветом выделен N-концевой пептид 1–80; зеленым – N-концевой β -пропеллерный домен 81–408; коричневым – C-концевой протеолитический домен 409–677

турации C-концевого каталитического домена, с последующим охлаждением по схеме экспериментов при 37°C. Остаточная активность после нагревания составляла несколько процентов, тем не менее, последовательная инкубация при 25 и 4°C приводила к повышению активности вариантов PSP на порядок (до 20–40%) (рис. 4).

В результате инкубации wt, E125A и D649A в течение 0.5 ч при температуре 46°C, соответствовавшей плавлению N-концевого β -пропеллерного домена, наблюдалась полная инактивация фермента; последующая инкубация при 25 и 4°C к реактивации не приводила (данные не приведены).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Обнаружено уникальное свойство олигопептидазы В из *S. proteamaculans* (PSP) – способность к обратимой термоинактивации при 37°C с восстановлением и даже с некоторым превышением исходной активности при последующем охлаждении. Процесс можно повторять с аналогичными результатами многократно (до пяти циклов). Данный эффект может быть объяснен сдвигом равновесия между неактивной открытой формой фермента и активной закрытой в сторону открытой формы при нагрева-

нии. Последующее охлаждение приводит к обратному сдвигу в сторону закрытой активной формы. Основанием для этой гипотезы служат результаты рентгеноструктурных и ЯМР-исследований характера обратимых переходов между разными формами ферментов семейства пролилолигопептидаз [12], а также полученные нами ранее экспериментальные данные о корреляции термоинактивации PSP при 37°C с разворачиванием (согласно спектрам собственной флуоресценции) его белковой молекулы [17]. На рис. 5 изображены закрытая и открытая формы PSP, соответствующие полученной нами модели этого фермента [20]. Очевидно, что неактивная открытая форма – развернутая молекула, т.е. денатурированный фермент.

Сложнее объяснить происходящее при этом повышение активности. Вероятно, в ходе перехода могут образовываться промежуточные более активные формы фермента. Действительно, ЯМР-исследования пролилолигопептидазы человека обнаружили существование многочисленных конформаций этого белка в растворе, что позволило сделать вывод [12], что молекулы ферментов этого семейства, в том числе и OpdB, находятся в постоянно подвижном состоянии, принимая последовательно ряд различных конформаций, включая полностью открытую и полностью закрытую формы.

Ионы кальция препятствуют обратному переходу к закрытой форме. Понижение термостабильности PSP в присутствии Ca^{2+} может быть вызвано разрушением солевых мостов SB2 и SB3 при связывании Ca^{2+} с остатками участвующих в них E494 и D460. Действительно, замена соответствующих остатков в OpdB *T. brucei* на незаряженные приводила к значительному понижению термостабильности мутантов. Сделан вывод [22] о том, что солевые мосты SB2 и SB3 играют структурную роль, определяя стабильность молекулы OpdB. ●

*Работа выполнена при финансовой поддержке
Российского научного фонда
(грант № 14-50-00131).*

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Burleigh B.A., Caler E.V., Webster P., Andrews N.W. // *J. Cell Biol.* 1997. V. 136. № 3. P. 609–620.
- Morty R.E., Shih A.Y., Fülöp V., Andrews N.W. // *FEBS Lett.* 2005. V. 579. № 10. P. 2191–2196.
- Morty R.E., Pelle R., Vadasz I., Uzcanga G.L., Seeger W., Bubis J.J. // *J. Biol. Chem.* 2005. V. 280. № 12. P. 10925–10937.
- de Matos Guedes H.L., Duarte Carneiro M.P., de Oliveira Gomes D.C., Rossi-Bergmann B., Giovanni De-Simone S. // *Parasitol. Res.* 2007. V. 101. № 4. P. 865–875.
- Yan J.B., Wang G.Q., Du P., Zhu D.X., Wang M.W., Jiang X.Y. // *Prot. Expr. Purif.* 2006. V. 47. № 2. P. 645–650.
- Yoshimoto T., Tabira J., Kabashima T., Inoue S., Ito K. // *J. Biochem.* 1995. V. 117. № 3. P. 654–660.
- Morty R.E., Fülöp V., Andrews N.W. // *J. Bacteriol.* 2002. V. 184. № 12. P. 3329–3337.
- Mustafa M.S.M., Nakajima Y., Oyama H., Iwata N., Ito K. // *Biol. Pharm. Bull.* 2012. V. 35. № 11. P. 2010–2016.
- Fenno J.C., Lee S.Y., Bayer C.H., Ning Y. // *Infect. Immun.* 2001. V. 69. № 10. P. 6193–6200.
- Bagarozzi D.A. Jr., Potempa J., Travis J. // *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 1998. V. 18. № 3. P. 363–369.
- McLuskey K., Paterson N.G., Bland N.D., Isaacs N.W., Mottram J.C. // *J. Biol. Chem.* 2010. V. 285. № 50. P. 39249–39259.

12. Canning P., Rea D., Morty R.E., Fulop V. // *PloS One*. 2013. V. 8. № 11. e79349.
13. Михайлова А.Г., Лихарева В.В., Хайруллин Р.Ф., Лубенец Н.Л., Румш Л.Д., Демидюк И.В., Костров С.В. // *Биохимия*. 2006. Т. 71. № 5. С. 697–706.
14. 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. // *Биохимия*. 2009. Т. 74. № 10. С. 1427–1437.
15. Михайлова А.Г., Хайруллин Р.Ф., Демидюк И.В., Громова Т.Ю., Костров С.В., Румш Л.Д. // *Биохимия*. 2011. Т. 76. № 4. С. 591–603.
16. Михайлова А.Г., Хайруллин Р.Ф., Коломийцева Г.Я., Румш Л.Д. // *Биохимия*. 2012. Т. 77. № 3. С. 384–391.
17. Mikhailova A.G., Khairullin R.F., Demidyuk I.V., Kostrov S.V., Grinberg N.V., Burova T.V., Grinberg V.Ya., Rumsh L.D. // *Protein Exp. Purif.* 2014. V. 93. P. 63–76.
18. Михайлова А.Г., Некрасов А.Н., Зинченко А.А., Ракитина Т.В., Корженевский Д.А., Липкин А.В., Разгуляева О.А., Овчинникова М.В., Горленко В.А., Румш Л.Д. // *Биохимия*. 2015. Т. 80. № 11. С. 1606–1620.
19. Ismail N.I.M., Yuasa T., Yuasa K., Nambu Y., Nisimoto M., Goto M., Matsuki H., Inoue M., Nagahama M., Tsuji A. // *J. Biochem.* 2010. V. 147. № 2. P. 201–211.
20. Mikhailova A.G., Rakitina T.V., Timofeev V.I., Karlinsky D.M., Korzhenevsky D.A., Agapova Yu.K., Vlaskina A.V., Ovchinnikova M.V., Gorlenko V.A., Rumsh L.D. // *Biochimie*. 2017. V. 139. P. 125–136.
21. Walsh K.F., Wilcox P.E. // *Meth. Enzymol.* 1970. V. 19. P. 31–41.
22. Fukumoto J., Ismaliza N., Ismail M., Kubo M., Kinoshita K., Inoue M., Yuasa K., Nishimoto M., Matsuki H., Tsuji A. // *J. Biochem.* 2013. V. 154. № 5. P. 465–473.