



УДК 577.152.342/135

© 1994 И. Ю. Сахаров, Ф. Е. Литвин,
О. В. Митькевич*

ГИДРОЛИЗ БЕЛКОВ КОЛЛАГЕНОЛИТИЧЕСКИМИ ПРОТЕИНАЗАМИ КАМЧАТСКОГО КРАБА

Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова,
химический факультет;

*НПП «Иммунотех», Москва;

**Институт экспериментальной кардиологии КНЦ РАМН, Москва

Ключевые слова: коллагенолитические протеиназы; камчатский краб; протеолиз; коллагены; фибрин; субстратная специфичность.

С помощью электрофореза исследован процесс ферментативного гидролиза коллагенов типов I и III в присутствии коллагенолитических протеиназ А и С камчатского краба. Показано, что обе протеиназы эффективно гидролизуют молекулы коллагенов, причем набор продуктов, образующихся в результате ферментативного гидролиза, для изоферментов А и С различен. Найдено, что в результате термоденатурации коллагена типа I резко возрастает эффективность ферментативного гидролиза. Отмечено, что коллагенолитические протеиназы краба катализируют гидролитическое расщепление таких белков, как бычий сывороточный альбумин, овальбумин, цитохром с лошади, иммуноглобулин G мыши, казеин и фибриноген человека; лишь структура эластина оставалась интактной. Показано, что фибриноген расщепляется протеиназами А и С различным образом, при этом регистрируемые процессы не похожи на процесс, характерный для плазмينا. Так же как и фибриноген, обе протеиназы краба с одинаковой эффективностью гидролизуют фибриновый сгусток.

Группа коллагеназ включает в себя протеиназы, гидролизующие нативные молекулы интерстициального коллагена при физиологических значениях рН. Наиболее изученные ферменты этой группы — коллагеназы позвоночных [1] и микробные коллагеназы из *Clostridium histolyticum* и *Achromobacter iophagus* [2,3]. Эти ферменты являются металлопротеинами (КФ 3.4.24.3). Кроме того, были обнаружены сериновые протеиназы, также обладающие способностью гидролизовать коллаген. Эти ферменты были названы коллагенолитическими протеиназами. Такие коллагенолитические протеиназы были выделены из микроскопического гриба *Entomophthora coronata* [4], личинки подкожного цепня *Hypoderma lineatum* [5], гепатопанкреаса краба *Uca pugilator* (КФ 3.4.21.32) [6,7] и поджелудочной железы сома *Parasilurus asotus* [8]. Не так давно нами также были выделены две коллагенолитические протеиназы (А и С) из гепатопанкреаса камчатского краба *Paralithodes camtschatica* [9,10]. Физико-химические свойства этих сериновых протеиназ были описаны ранее [9 — 11].

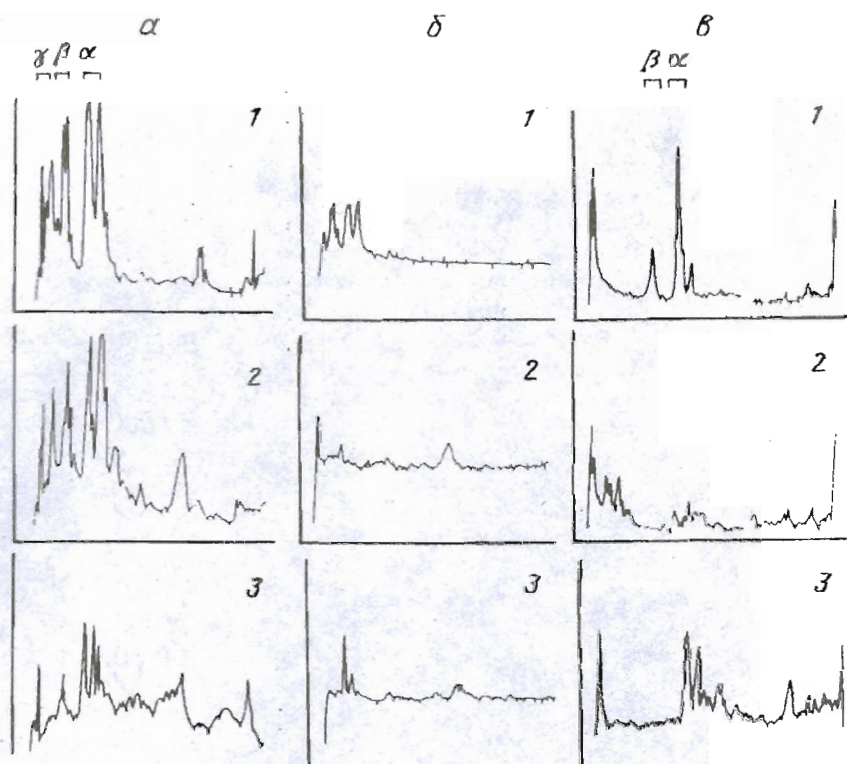


Рис. 1. Электрофореграммы продуктов ферментативного гидролиза коллагена типов I (а), III (б) и желатина (в). 1 — нативный белок, 2 и 3 — продукты гидролиза, полученные в присутствии изоферментов А и С коллагенолитической протеиназы камчатского краба соответственно. Над рисунком обозначены α -, β - и γ -формы коллагенов

Данная работа посвящена изучению ферментативного гидролиза различных белковых молекул в присутствии этих коллагенолитических протеиназ.

Обе коллагенолитические протеиназы камчатского краба эффективно гидролизуют молекулы нативного коллагена (рис. 1), расщепляя их, судя по числу фрагментов, в нескольких местах. Это отличает протеиназы А и С краба от коллагеназы позвоночных, осуществляющей каталитическое расщепление одной-единственной пептидной связи [12, 13], и коллагенолитической протеиназы личинки *Hypoderma lineatum*, для которой характерно расщепление двух пептидных связей, расположенных на незначительном расстоянии, в результате чего, как и в случае коллагеназы позвоночных, в электрофорезе регистрируются два фрагмента длиной 1/4 и 3/4 от исходной молекулы субстрата. В то же время обнаруженный факт роднит выделенные ферменты камчатского краба с коллагенолитическими протеиназами краба *U. pugilator* и коллагеназой из бактерии *S. histolyticum*, для которых характерна множественность гидролиза молекулы нативного коллагена [14, 15]. Необходимо отметить, что в присутствии протеиназ А и С в первую очередь подвергаются гидролизу β -формы коллагена, тогда как α -формы подвержены протеолизу в меньшей степени.

Сравнение продуктов ферментативного гидролиза коллагена типа I коллагенолитическими протеиназами краба показало (рис. 1а), что протеиназы А и С по-разному и с различной скоростью расщепляют этот белковый субстрат. Так, хорошо видно на электрофореграмме, что в случае протеиназы С по сравнению с изоферментом А значительно быстрее исчезают белковые пики исходного коллагена. Кроме того, для этих изоферментов сильно различается и состав образу-

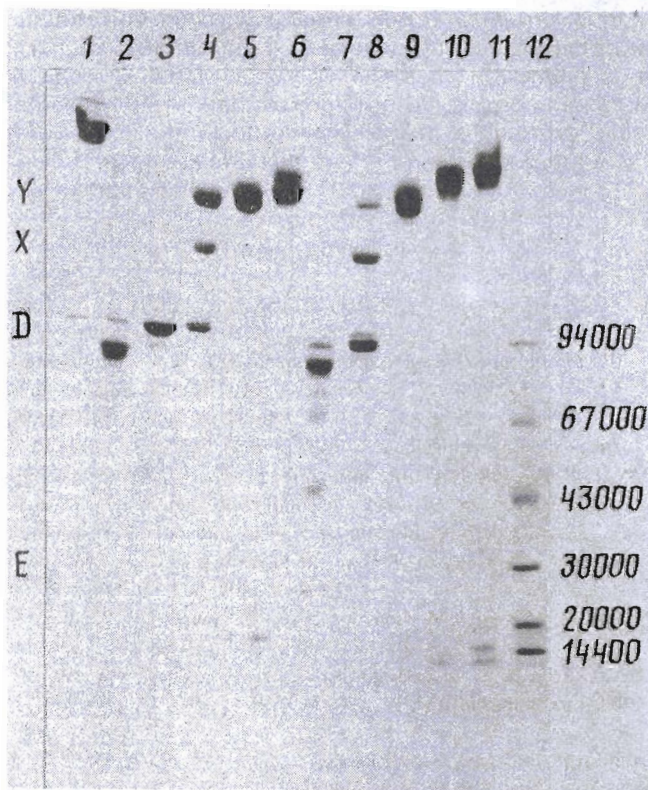


Рис.2. Электрофореграммы продуктов ферментативного гидролиза фибриногена человека в присутствии изоферментов А (2—6) и С (7—11) коллагенолитической протеиназы камчатского краба при концентрации ферментного препарата 200 (2, 7), 60 (3, 8), 20 (4, 9), 6 (5, 10) и 2 мкг/мл (6, 11) соответственно; 1 — нативный белок, 12 — белки-маркеры. Слева от рисунка обозначены миграционные позиции фрагментов Y, X, D и E фибриногена человека

ющихся продуктов, что в свою очередь свидетельствует о различной субстратной специфичности выделенных ферментов.

Протеиназы камчатского краба гидролизуют и денатурированный коллаген типа I (желатин) (рис. 1б), причем со значительно большей скоростью, чем нативный белок. Это объясняется, по-видимому, тем, что в молекуле нативного коллагена существуют участки, способные расщепляться, но маскированные в сложной трехспиральной структуре этого белка. В результате же денатурации после разрушения упорядоченной нативной структуры эти участки обнажаются и легче подвергаются протеолизу протеиназами краба.

Как уже отмечалось выше, коллаген типа III также эффективно расщепляется изоферментами коллагенолитической протеиназы краба (рис. 1в). Однако в отличие от коллагена типа I данный белок легче подвергается протеолизу в присутствии протеиназы А и более стабилен к воздействию протеиназы С.

В отличие от коллагена эластин, другой наиболее распространенный белок соединительной ткани, не гидролизуются в присутствии коллагенолитических протеиназ камчатского краба. Эластин — единственный белок, для которого мы не смогли зарегистрировать процесс расщепления пептидной цепочки белка. Так, нами был зарегистрирован, хотя и в различной степени, гидролиз таких белков, как бычий сывороточный альбумин, овальбумин, цитохром с лошади, иммуноглобулин G мыши, казеин, фибриноген и фибрин человека. В связи с тем что при иммуногистохимическом изучении воздействия коллагенолитических протеиназ краба на гнойно-некротические раны была обнаружена высокая некротическая

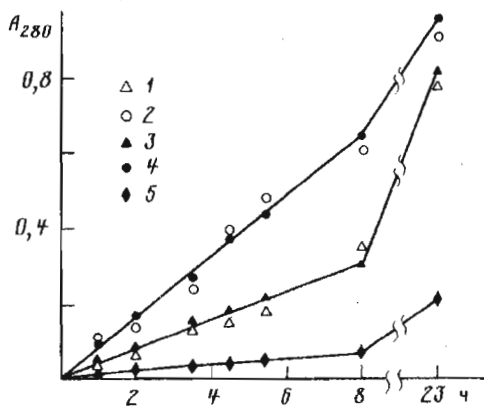


Рис. 3. Кинетика гидролиза фибрина в присутствии изоферментов А (1, 2) и С (3, 4) коллагенолитической протеиназы камчатского краба с концентрацией 0,01 (1,3) и 0,1 мг/мл (2, 4). 5 — спонтанный гидролиз фибрина при рН 7,4

активность исследуемых протеолитических ферментов и было зарегистрировано полное удаление с поверхности раны фибрина и фибриногена [16], процесс ферментативного гидролиза последних белков был исследован более детально.

При анализе продуктов расщепления фибриногена человека коллагенолитическими протеиназами А и С (рис.2) нам удалось отметить следующие особенности. Начальные этапы расщепления (т. е. продукты, получаемые при низких концентрациях ферментов) примерно соответствуют расщеплению фибриногена плазмином с образованием фрагментов Y и X с молекулярными массами около 250 и 150 кДа соответственно. Однако при больших глубинах расщепления наблюдаются отличия от расщепления плазмином. Если в случае расщепления фибриногена плазмином в присутствии ионов кальция относительно стабильны и устойчивы к дальнейшему действию фермента фрагменты D и E с молекулярными массами около 95 и 45 кДа [17], то в случае протеиназ А и С фрагмент аналогичный фрагменту D, лабилен и деградирует дальше. Образование продукта, аналогичного фрагменту E при степени расщепления, соответствующей максимальному образованию продукта с M 95 кДа (дорожки 3 и 8), вообще не удастся зарегистрировать. Возможно, он еще менее стабилен, чем аналог D. При промежуточных степенях расщепления плазмином в нижней части геля обычно наблюдается 3 — 4 фрагмента с молекулярными массами 15 — 20 кДа, образующиеся при расщеплении С-концевой части α A-цепи фибриногена. При расщеплении же коллагеназами краба даже при небольшой степени гидролиза виден лишь конечный продукт, мигрирующий практически с фронтом красителя. Вместе с тем в более высокомолекулярной области наблюдается значительное количество промежуточных продуктов, которые практически отсутствуют при расщеплении плазмином. В сумме все эти особенности свидетельствуют о том, что специфичность исследуемых протеиназ по типам расщепляемых связей, так же как и в случае трипсина [18], значительно шире, чем у плазмينا. Можно так же отметить, что по мере углубления протеолиза набор промежуточных продуктов в случае коллагенолитических протеиназ А и С все больше различается, что можно интерпретировать как несовпадение их субстратной специфичности.

Кроме того, было обнаружено, что обе протеиназы краба эффективно гидролизуют и фибриновый сгусток (рис. 3). При этом надо отметить, что, хотя обе протеиназы краба расщепляют различные пептидные связи в фибриногене, эффективность при гидролизе фибрина для обоих изоферментов оказалась одинаковой.

Экспериментальная часть

Коллагенолитические протеиназы краба А и С были выделены как описано в работах [9, 10]. Коллаген типов I и III, фибриноген человека получены от фирмы Sigma. Тромбин — препарат Каунасского завода медпрепаратов.

Гидролиз белков. Коллаген типа I с концентрацией 2,5 мг/мл в 0,2 М фосфатном буфере, pH 7,8, содержащем 0,2 М NaCl, инкубировали 1 ч при 37 °С с раствором протеиназ краба. Аналогичным образом гидролизовали коллаген типа III и желатин при концентрации субстратов 3 и 2,5 мг/мл соответственно. Реакции гидролиза останавливали прогреванием при 100 °С в течение 5 мин.

Ферментативный гидролиз фибринового геля. Мини-колонку с капроновой сеткой снизу, содержащую фибриновый гель, частично погружали в стаканчик с 5 мл раствора коллагенолитических протеиназ в 0,1 М фосфатном буфере, pH 7,4, и вели гидролиз при постоянном перемешивании и 25° С, периодически измеряя оптическое поглощение ферментного раствора при 280 нм. Фибриновый гель предварительно получали смешиванием в микроколонке 0,5 мл раствора фибриногена с концентрацией 1,2 мг/мл и 0,2 мл раствора тромбина с концентрацией 4 мг/мл с последующей инкубацией при 20° С в течение 1 ч.

Электрофорез проводили в градиентном 7,5 — 18% ПААГ в трис-глициновом буфере по Леммли [19] с окрашиванием белков кумасси R-250.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Harris E. D., Jr., Vater C. A. // *Meth. Enzymol.* 1982. V. 82. P. 423 — 452.
2. Peterkofsky B. // *Meth. Enzymol.* 1982. V. 82. P. 453 — 471.
3. Tong N. T., Dumas J., Keil-Dlouha V. // *Biochim. et biophys. acta.* 1988. V. 955. № 1. P. 43 — 49.
4. Hurion N., Fromentin H., Keil B. // *Arch. Biochem. and Biophys.* 1979. V. 192. № 3. P. 438 — 445.
5. Lecroisey A., De Wolf A., Keil B. // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.* 1980. V. 94. № 4. P. 1261 — 1265.
6. Eisen A. Z., Henderson K. O., Jeffrey J. J., Bradshaw R. A. // *Biochemistry.* 1973. V. 12. № 9. P. 1814 — 1822.
7. Grant G. A., Sacchettini J. C., Welgus H. G. // *Biochemistry.* 1983. V. 22. № 2. P. 354-358.
8. Yoshinaka R., Sato M., Itoko M., Yamashita M., Ikeda S. // *J. Biochem.* 1986. V. 99. № 2. P. 459 — 467.
9. Сахаров И. Ю., Литвин Ф. Е., Артюков А. А., Кофанова Н. Н. // *Биохимия.* 1988. Т. 53. № 11. С. 1844 — 1849.
10. Сахаров И. Ю., Литвин Ф. Е., Артюков А. А. // *Биохимия.* 1992. Т. 57. № 1. С. 40 — 45.
11. Сахаров И. Ю., Литвин Ф. Е. // *Биохимия.* 1989. Т. 54. № 11. С. 1913 — 1918.
12. Gross J., Harper E., Harris E. D. et al. // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.* 1974. V. 61. № 2. P. 606 — 612.
13. Miller E. J., Harris E. D., Chung E., Finch J. C., McCrocker P. A., Butler U. T. // *Biochemistry.* 1976. V. 15. № 6. P. 787 — 791.
14. Grant G. A., Sacchettini J. C., Welgus H. G. // *Biochemistry.* 1983. V. 22. № 2. P. 354 — 358.
15. Welgus H. G., Grant G. A., Jeffrey J. J., Eisen A. Z. // *Biochemistry.* 1982. V. 21. № 21. P. 5183 — 5189.
16. Сахаров И. Ю. Выделение и исследование ферментов из морских организмов и некоторые аспекты их применения (на примере щелочной фосфатазы тюленя и коллагенолитической протеазы краба). Дисс...д-ра хим. наук. М: ВНИПКИ прикладной биохимии, 1992 (48 с.).
17. Doolittle R. F. // *Adv. Protein Chem.* 1973. V. 27. P. 1 — 109.
18. Wallen P., Iwanaga S. // *Biochim. et biophys. acta.* 1968. V. 154. № 3. P. 414 — 417.
19. Laemmli U. K. // *Nature.* 1970. V. 227. P. 680 — 685.

Поступила в редакцию
7.VII.1993

I.Yu. Sakharov, F. E. Litvin, O. V. Mitkevitch***

**HYDROLYSIS OF PROTEINS BY COLLAGENOLYTIC PROTEASES
FROM KING GRAB**

*Chemical Enzymology Division, Department of Chemistry,
M. V. Lomonosov Moscow State University, Moscow;
Immunotech Ltd., Moscow;

***Institute of Experimental Cardiology, Russian AMS, Moscow*

Hydrolysis of collagen molecules in the presence of collagenolytic proteases A and C from the king crab has been studied by electrophoresis. Both proteases are shown to hydrolyze effectively type I and III collagens, patterns of the products differing for the proteases A and C. The thermal denaturation of the type I collagen increased the effectiveness of the enzymatic hydrolysis. The crab collagenolytic proteases catalyze the hydrolysis of such proteins as bovine serum albumin, ovalbumin, horse cytochrome c, mouse immunoglobulin G, casein and human fibrinogen, only elastin being resistant. The mechanisms of the fibrinogen cleavage differ not only for the proteases A and C but also for plasmin, whereas the efficiencies in all the cases are similar.