



УДК 547.963.3:577.113.6:577.152.342\*19'15

## НОВЫЕ СУБСТРАТЫ ЭНТЕРОПЕПТИДАЗЫ I. БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫЕ ГЕПТА-НОНАПЕПТИДЫ

© 2003 г. В. В. Лихарева, Б. В. Васьковский, Н. Э. Шепель,  
С. К. Гаранин, А. Г. Михайлова<sup>#</sup>, Л. Д. Румш

Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,  
117997 ГСП, Москва, В-437, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

Поступила в редакцию 08.11.2001 г. Принята к печати 20.03.2002 г.

Энтеропептидаза (энтерокиназа, КФ 3.4.21.9) обладает способностью гидролизовать пептиды по связям, образованным карбоксильными группами остатков лизина или аргинина, если в положениях  $P_2$ – $P_5$  субстрата находится менее четырех отрицательно заряженных аминокислотных остатков. Определены кинетические параметры энтеропептидазного гидролиза трех субстратов такого типа: ангиотензина II человека (DR ↓ VYIHPF), а также пептидов  $\beta$ -цепи гемоглобина крупного рогатого скота LTAEEK ↓ A [Hb-(2–8)] и MLTAEЕК ↓ AA [Hb-(1–9)]. Значения  $K_m$  для всех этих субстратов ( $\approx 10^{-3}$  М) на порядок превышают соответствующие значения для типичных синтетических энтеропептидазных субстратов или химерных белков с полноразмерным линкером -DDDDK- ( $K_m \approx 10^{-4}$  М). Значения  $k_{cat}$  для AT и Hb-(2–8) также близки и невелики ( $\approx 30$  мин<sup>-1</sup>). Общая эффективность гидролиза таких субстратов составляет не более 1% соответствующей величины для типичных пептидных и белковых искусственных субстратов энтеропептидазы. Однако удлинение с N- и C-конца на один аминокислотный остаток пептида Hb-(2–8) привело к резкому возрастанию каталитической эффективности гидролиза: значение  $k_{cat}$  для Hb-(1–9) составляет 1510 мин<sup>-1</sup>; гидролиз его всего в три раза менее эффективен, чем химерного белка с полноразмерным линкером.

*Ключевые слова:* энтеропептидаза; трипсиноген; пептидные субстраты; химерные белки.

### ВВЕДЕНИЕ

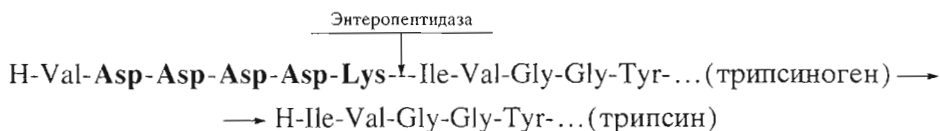
Большинство изученных протеиназ обладает достаточно широкой специфичностью, приводящей к интенсивной деградации разнообразных полипептидных субстратов. Важная роль в организме принадлежит также значительно менее изученным высокоспецифическим протеиназам, имеющим всего один физиологический субстрат и гидролизующим его с высокой точностью лишь в одном положении пептидной цепи. Примерами таких фермент-субстратных пар являются ренин и ангиотензин, химозин и казеин, плазмепсин и гемоглобин, тромбин и фибриноген, энтеропептидаза и трипсиноген. Изучение механизма действия таких ферментов требует в каждом конкретном случае индивидуального применения известных общих закономерностей ферментативного катализа. Высокоспецифические ферменты обладают, как правило, сложной структурой и содержат, помимо каталитического и первичного субстратсвязывающего центра, многочисленные

домены с неизвестными функциями. Изучение тонкой регуляции активности таких ферментов с помощью вторичных взаимодействий во многих случаях приводит к пониманию сложного механизма, по которому удаленные друг от друга домены согласованно определяют высокую эффективность и селективность катализа. В связи с развитием методов генной инженерии большое значение имеет также использование высокоспецифических протеиназ в качестве “белковых рестриктаз”, т.е. инструментов для точного расщепления химерных белков.

Энтеропептидаза (энтерокиназа, КФ 3.4.21.9) – высокоспецифическая протеиназа процессинга, начинающая каскад реакций активации ферментов пищеварения [1]. С помощью этого тонкого механизма организм млекопитающих решает задачу расщепления белков пищи без разрушения собственных белков. Энтеропептидаза активирует трипсиноген, гидролизуя его полипептидную цепь с высокой эффективностью и только после последовательности тетрааспартил-лизин.

Сокращение: AT – ангиотензин II человека.

<sup>#</sup> Автор для переписки (тел.: (095) 335-42-22; эл. почта: anna@enzyme.siocb.ras.ru).



Последовательность -Asp-Asp-Asp-Asp-Lys- в природных белках обнаружена только в составе N-концевых активационных пептидов различных трипсиногенов [2]. Эта особенность делает энтеропептидазу удобным инструментом для специфического расщепления разнообразных химерных белков, содержащих встроенную последовательность тетрааспартил-лизин в произвольном месте полипептидной цепи [3, 4].

За последние годы накопилось, однако, определенное количество фактов, указывающих на то, что энтеропептидаза, помимо своего единственного природного субстрата трипсиногена, обладает способностью достаточно специфично гидролизовать *in vitro* некоторые биологически активные пептиды, например АСТН\*-(1-24) [5], холецистокинин [6],  $\alpha$ -эндорфин [7], а также такие белки, как аполипопротеин А-1 [8] и остеокальцин [9].

Так как во всех этих случаях субстраты не содержали необходимой для энтеропептидазы последовательности -(Asp)<sub>4</sub>Lys-, наблюдаемый их гидролиз первоначально даже приписывали наличию в препаратах энтеропептидазы примесей какого-либо трипсиноподобного фермента [5].

Наш интерес к подобным нетипичным субстратам энтеропептидазы был инициирован обнаруженным нами кальцийзависимым автолизом тяжелой цепи этого фермента, в которой также отсутствуют фрагменты -(Asp)<sub>4</sub>Lys-. Следует подчеркнуть, что мы разработали препаративный метод получения высокоочищенной энтеропептидазы, не содержащей каких-либо примесей других протеиназ [10]. В результате структурных исследований мы выяснили, что этот автолиз происходит по пептидным связям, образованным карбоксильными группами остатков лизина-465 в последовательности -QNMEK<sup>465</sup>-TIFQ-, лизина-360 (-NNYEK<sup>360</sup>-INCN-), аргинина-384 (-NEWER<sup>384</sup>-TQGS-) и аргинина-422 (-GRRER<sup>422</sup>-VGLL-) [10-12].

Анализ этих результатов и литературных данных о расщеплении энтеропептидазой нетипичных для нее субстратов [5-7] привел нас к выводу, что этот фермент может гидролизовать полипептидную цепь после остатка лизина или аргинина, которому в той или иной комбинации на расстоянии от 4 до 1 а.о. предшествуют 1-3 отрицательно заряженных аминокислотных остатка.

Немногочисленные эксперименты с синтетическими низкомолекулярными пептидными субстратами и ингибиторами [13, 14] и с белками, в

которых искусственно создавались такие последовательности (путем карбоксиметилирования остатков цистеина [15]), приводят к выводу, что чем больше число кислых аминокислотных остатков в положениях P<sub>2</sub>-P<sub>5</sub> пептида, тем лучшим субстратом или ингибитором энтеропептидазы он будет. Однако в литературе отсутствуют какие-либо количественные данные об эффективности гидролиза таких пептидов по сравнению с субстратами, содержащими полный линкер -(Asp)<sub>4</sub>Lys-. В то же время при направленном гидролизе энтеропептидазой химерных белков со встроенным линкером -(Asp)<sub>4</sub>Lys- такое неспецифическое расщепление нежелательно и часто служит помехой, например, в случае целевых пептидов АСТН-(1-24) (SYSMEHFR ↓ WGKPVGKRRPVKVYP) [5] и  $\alpha$ -эндорфина (YGGFMTSEK ↓ SQTPLVT) [7].

Представляется перспективным оценить степень гидролиза субстратов энтеропептидазы с укороченным линкером, содержащими в положениях P<sub>2</sub>-P<sub>5</sub> 1-3 остатка глутаминовой или аспарагиновой кислоты вместо четырех у типичного энтеропептидазного субстрата, и выяснить, является ли феномен их гидролиза результатом остаточной активности первичного трипсинового центра фермента, или связывание таких субстратов вторичным центром энтеропептидазы так же характерно, как и связывание трипсиногена. На последнюю мысль нас навело изучение Ca<sup>2+</sup>-зависимого автолиза тяжелой цепи энтеропептидазы после остатка лизина-465 в последовательности -QNMEK<sup>465</sup>-TIF- и предполагаемое автоактивационное разделение тяжелой и легкой цепи энтеропептидазы между остатками лизина-800 и изолейцина-801 в последовательности -EVSPK<sup>800</sup>IV- при активации профермента.

Возможность ответа на этот вопрос предоставляет начатое нами систематическое изучение гидролиза субстратов энтеропептидазы, содержащих линкер переменной длины: A-Asp<sub>m</sub>(Glu<sub>m</sub>)-Xaa<sub>n</sub>-Lys/Arg ↓ B, где Xaa – Asp, Glu или любая аминокислота; m = 0-1; n = 0-3; A и B – защитные группы, аминокислотные остатки, их комбинации.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Первыми в качестве субстратов такого типа мы выбрали биологически активные 7-9-членные пептиды: ангиотензин II человека – DRVYI-NPF [16] и пептиды  $\beta$ -цепи гемоглобина крупного рогатого скота LTAEEKA [Hb-(2-8)] и MLTAEE-KAA [Hb-(1-9)]. Последние два пептида были ранее выделены из экстракта костного мозга круп-

\* Адrenокортикотропный гормон.

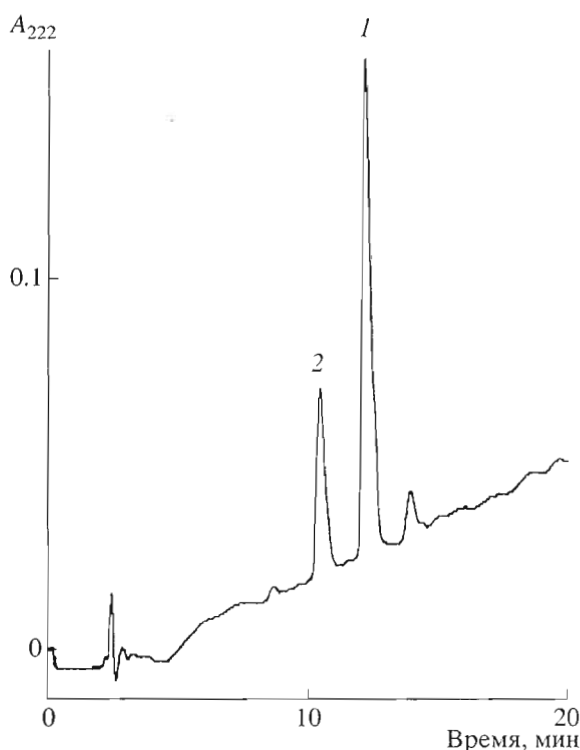
ного рогатого скота [17]. За гидролизом пептидов следили с помощью ВЭЖХ на колонке Nucleosil C8, регистрируя уменьшение площади пика исходного пептида и появление продуктов гидролиза в ходе инкубации с энтеропептидазой (для примера см. рисунок). Продукты гидролиза идентифицировали с помощью масс-спектрометрии (MALDI). Обнаружено, что все исследованные пептиды гидролизуются энтеропептидазой после остатков аргинина и лизина.

Определены значения кинетических констант этого гидролиза (таблица).

Молекула энтеропептидазы состоит из двух цепей – тяжелой (118–800) и легкой (801–1035), соединенных дисульфидной связью. Легкая цепь – трипсиноподобный сериновый фермент и содержит весь набор аминокислотных остатков, необходимых для создания как каталитического центра, так и участка связывания тетрааспартильной последовательности субстрата [18]. Однако этого оказывается недостаточно для обеспечения высокой эффективности гидролиза природного субстрата – трипсиногена.

В результате систематического изучения ферментативных и структурных особенностей энтеропептидазы мы пришли к выводу, что уникальные свойства этого высокоспецифического фермента обусловлены существованием трех субстратсвязывающих центров.

Легкая, или каталитическая цепь энтеропептидазы, содержит два из них. Это первичный центр – остаток Asp<sup>981</sup>, определяющий первичную трипсиновую специфичность легкой цепи, и, кроме того, вторичный связывающий центр Lys<sup>889</sup>, который координирует четыре остатка аспарагиновой кислоты в положении P<sub>2</sub>–P<sub>3</sub> субстрата [18], придавая тем самым ферменту присущую ему высокую специфичность. Для достижения высокой активности энтеропептидазы по отношению к ее природному субстрату трипсиногену при одновременном сохранении высокой специфичности гидролиза требуется участие еще одного вторичного субстратсвязывающего центра, расположенного на участке 118–465 тяжелой цепи фермента [10, 12]. Таким образом, существует строгая иерар-



ВЭЖХ инкубационной смеси субстрата Нб-(2–8) (2.7 мМ) с энтеропептидазой (72.8 нМ) в 0.1 М Трис-НСl, рН 8.0. Время инкубации 8 ч при 37°С. Колонка Nucleosil 7/C8 (4 × 250 мм); градиент ацетонитрила (0–60%) в 0.1% ТФА за 35 мин; скорость потока 1 мл/мин. Исходный пептид LTAEEKA (1); продукт LTAEEK (2).

хия вторичных субстратсвязывающих центров: один обеспечивает специфичность, а второй – эффективность гидролиза.

Взаимодействие молекулы трипсиногена со всеми тремя центрами энтеропептидазы приводит к значительно более прочному связыванию молекулы этого субстрата ( $K_m \approx 10^{-6}$  М) по сравнению с искусственными пептидами и химерными белками ( $K_m \approx 10^{-4}$  М), несмотря на то, что последние также содержат последовательность -(Asp)<sub>4</sub>Lys-. Связывание соответствующей линкерной последовательности с первичным и вторичным субстратсвязывающими центрами легкой цепи фер-

Константы гидролиза ряда субстратов энтеропептидазы при рН 8.0; 37°С

Субстрат*	$K_m$ , мМ	$k_{cat}$ , мин <sup>-1</sup>	$k_{cat}/K_m$ , мМ <sup>-1</sup> мин <sup>-1</sup>
DRVYIHPF (ангиотензин)	3.3 ± 0.5	24.0 ± 2	7.3 ± 1.2
Нб-(2–8); LTAEEKA	4.2 ± 0.8	29.4 ± 3.3	7.0 ± 1.5
Нб-(1–9); MLTAEEKAA	4.0 ± 1	1510 ± 189	378 ± 105
GD <sub>4</sub> KNfa** [11]	0.200	1000	5000
PrAD <sub>4</sub> KP26*** [11]	0.125	157.0	1260

\* Жирным шрифтом выделен сайт, после которого идет разрыв цепи. \*\* Nfa – β-нафтиламид. \*\*\* Химерный белок, содержащий в качестве носителя модифицированный белок А, а в качестве целевого продукта – реоверин.



мента обычно приводит к значениям  $K_m$  или  $K_i$  порядка  $10^{-4}$  М [10–12, 14].

Как и следовало ожидать, укорачивание этой линкерной последовательности за счет уменьшения числа отрицательно заряженных аминокислотных остатков приводит к дальнейшему ухудшению связывания (еще на порядок) таких субстратов с вторичным центром  $Lys^{889}$  легкой цепи фермента. Значения  $K_m$  соответствующих субстратов энтеропептидазы (таблица) составляют более  $10^{-3}$  М, причем не обнаружено какого-либо отличия между субстратом с одним таким остатком (АТ) и двумя [Нб-(2–8) и Нб-(1–9)]. Интересно, что по имеющимся данным рентгеноструктурного анализа, с этим вторичным центром взаимодействуют лишь три остатка аспарагиновой кислоты из четырех ( $P_2$ – $P_4$ ) в энтеропептидажном линкере  $-(Asp)_4Lys$ - специфического ингибитора – соответствующего хлорметилкетона ( $VGD_4K-CH_2Cl$ ) [18]. Мы предполагаем в дальнейшем продолжить эти эксперименты с помощью систематической серии синтетических субстратов.

Что касается каталитической эффективности гидролиза двух первых субстратов – окта- и гептапептида, то соответствующие значения  $k_{cat}$  также близки и невелики (таблица). В результате общая эффективность гидролиза таких субстратов составляет 0.5–1% соответствующей величины для химерного белка PrAP26, содержащего полноразмерный линкер  $-(Asp)_4Lys$ -. Однако неожиданные результаты были получены для третьего изученного субстрата – нонапептида Нб-(1–9). Удлинение с *N*- и *C*-конца на один аминокислотный остаток соответствующего пептида 2–8 привело к резкому возрастанию каталитической эффективности его гидролиза энтеропептидазой (таблица), и это при том, что оба субстрата имеют одинаковую аминокислотную последовательность в положениях  $P'_1$ – $P_6$  (и одинаковые значения  $K_m$ ). Данный пептид становится в результате вполне приличным субстратом энтеропептидазы – его гидролиз всего в три раза менее эффективен, чем гидролиз химерного белка с полноразмерным линкером. Эти неожиданные результаты требуют дальнейшего экспериментального выяснения: что же является причиной столь эффективного гидролиза удлиненного субстрата – общая длина полипептидной цепи или же число аминокислотных остатков в *N*-концевой отщепляемой части. Во всяком случае, продемонстрирован достаточно эффективный гидролиз энтеропептидазой полипептидной цепи после остатка лизина, которому предшествуют всего два остатка глутаминовой кислоты.

Имеет ли обнаруженный нами гидролиз таких пептидов физиологическое значение? В последнее время появился ряд данных о том, что в определенных патологических ситуациях энтеропеп-

тидаза может оказаться в других органах, кроме дуоденума, и стать причиной дальнейшей патологии. Так, дуодено-панкреатический заброс энтеропептидазы происходит при тех или иных нарушениях в сфинктере Одди и в свою очередь приводит к развитию панкреатита [19, 20]. Кроме того, обнаружено, что некоторые опухолевые клетки человека, в частности, желудка, экспрессируют трипсин и энтеропептидазу [21]. В этих случаях становится возможным катализируемый этим ферментом гидролиз пептидов и белков организма в соответствующих местах полипептидной цепи.

Конечно, остается открытым вопрос о том, имеет ли подобный гидролиз место *in vivo*. Считается, что у энтеропептидазы имеется всего один физиологический субстрат – трипсиноген. Мы, однако, предполагаем, что обнаруженный нами  $Ca^{2+}$ -зависимый автолиз тяжелой цепи энтеропептидазы – важная составная часть природного защитного механизма от преждевременной активации ферментов поджелудочной железы (по аналогии с аналогичным механизмом инактивации трипсина [22–25]).

Не исключено также и автоактивационное разделение тяжелой и легкой цепи энтеропептидазы между остатками лизина-800 и изолейцина-801 в последовательности  $-EVSPK^{800}IV-$  при активации профермента\*.

Известно, что трипсиноген, содержащий в своем активационном пептиде последовательность  $-(Asp)_4Lys$ -, является очень плохим субстратом трипсина [26]. Это имеет важный физиологический смысл: трипсин активирует все остальные ферменты пищеварения из их предшественников, кроме самого себя. В этом случае роль активатора принадлежит специализированному ферменту – энтеропептидазе. Только так можно предотвратить активацию проферментов в поджелудочной железе и соответственно разрушение собственных тканей организма. Теоретически зависимость эффективности гидролиза субстратов от возрастания числа отрицательно заряженных аминокислотных остатков в положениях  $P_2$ – $P_5$  должна быть с противоположными знаками для энтеропептидазы и трипсина – увеличиваться для первой и уменьшаться для второго. Способность энтеропептидазы гидролизовать полипептидную цепь в таких последовательностях может быть использована в структурных исследованиях для фрагментирования белков в отличие от трипсинового гидролиза, ведущего к интенсивной деградации молекулы белка, использование энтеропептидазы приведет к крупным фрагментам и, более того, как раз после тех остатков аргинина или лизина, где трипсиновый гидролиз маловероятен.

\* Лихарева В.В., Михайлова А.Г. Неопубликованные результаты; Sadler J.E. Частное сообщение.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали Трис (Merck, Германия), *n*-нитроанилид *N*<sup>ω</sup>-бензоил-*D,L*-аргинина, TFA для ВЭЖХ и трипсиноген быка (Sigma, США), ацетонитрил для ВЭЖХ (Криохим, Россия), реактив Protein Assay для количественного определения белка (Bio-Rad, США), ангиотензин II человека (Serva, Германия). Производные аминокислот и реактивы для пептидного синтеза фирмы Reanal (Венгрия).

Для ВЭЖХ использовали хроматографы Beckman System Gold и Du Pont Instruments Series 8800 (США). Хроматографию проводили на колонках Nucleosil (Macherey-Nagel, Германия).

Пептиды Hb-(2–8) и Hb-(1–9) синтезировали классическим методом в растворе с последовательным наращиванием цепи с C-конца. Конденсацию проводили по методу активированных эфиров, протекание реакции и чистоту промежуточных соединений контролировали методом ТСХ на силикагеле Kieselgel 60 (Merck, Германия). Пептиды очищали после удаления защитных групп методами гель-фильтрационной (Biogel P-2, Bio-Rad, США) и обращенно-фазовой ВЭЖХ (Nucleosil C8). Контроль чистоты и индивидуальности вели методом аналитической ВЭЖХ на колонках Nucleosil C8 и C18. Определение *N*-концевых аминокислот проводили дансильным методом с последующим разделением и идентификацией двухмерной хроматографией на силикагеле Kieselgel 60. Для подтверждения структуры пептидов использовали методы ЯМР (Bruker, Германия), аминокислотного анализа (Biotronik, Германия) и масс-спектрометрии (MALDI).

**Энтеропептидаза** получена из слизистой дуоденума быка и очищена по разработанному нами методу [12]. Активность препаратов фермента определяли по активации трипсиногена [12].

Константы гидролиза пептидов энтеропептидазой определяли при инкубировании не менее шести концентраций соответствующего субстрата (в интервале 1–10 мМ) с 72.8 нМ энтеропептидазы [ангиотензин и Hb-(2–8)] и 33.3 нМ [Hb-(1–9)] в 0.1 М Трис-НСl-буфере, рН 8.0, при 37°C. В определенные интервалы времени, соответствующие не более 20% превращения каждого субстрата, отбирали по 6–8 проб (2–5 мкл), разбавляли 0.1% TFA до 25 мкл и хранили при температуре –70°C. Анализировали состав аликвоты на колонке Nucleosil 7/C8 (4 × 250 мм). Хроматографию проводили в 0.1% TFA с градиентом ацетонитрила 0–60%, скорость элюции 1 мл/мин. Начальную скорость реакции рассчитывали по соотношению площадей пиков субстрата и одного из продуктов; поправку на разницу в молекулярном оптическом поглощении при 222 нм вносили после полного гидролиза.

При определении кинетических параметров гидролиза субстратов ( $k_{cat}$  и  $K_m$ ) расчет проводили по методу Эйзенталь–Корниш–Боуден [27]. Для доказательства структуры продуктов гидролиза собирали аликвоты индивидуальных пиков и анализировали с помощью масс-спектрометрии (MALDI). Так,  $m/z = 762 [M + H]^+$ ; расчетная молекулярная масса MLTAEЕКАА 760.81 Да (пик 1, рисунок) Для пика 2 (рисунок) значение  $m/z = 690.7 [M + H]^+$ , что соответствует LTAЕЕКА (расчетная молекулярная масса 689.74 Да).

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (гранты № 99-04-48362, 02-04-48553).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kunitz M. // J. Gen. Physiol. 1939. V. 22. P. 429–446.
2. Guy O., Bartelt D.C., Amic J., Colomb E., Figarella C. // FEBS Lett. 1976. V. 62. P. 150–153.
3. Добрынин В.Н., Болдырева Е.Ф., Филиппов С.А., Чувпило С.А., Коробко В.Г., Воротынцева Т.И., Михайлова А.Г., Бессмертная Л.Я., Америк А.Ю., Антонов В.К. // Биоорганическая химия. 1987. Т. 13. С. 119–121.
4. Михайлова А.Г., Шибанова Е.Д., Руми Л.Д., Антонов В.К. // Биоорганическая химия. 1994. Т. 20. С. 883–893.
5. Uegaki K., Nemoto N., Shimizu M., Wada T., Kyogoku Y., Kobayashi Y. // FEBS Lett. 1996. V. 379. P. 47–50.
6. Mutt V., Tatamoto K., Carlquist M., Light A. // Bio-science Rep. 1981. V. 1. P. 651–659.
7. Sharma A., Khoury-Christianson A.M., White S.P., Dhanjal N.K., Huang W., Paulhiac C., Friedman E.J., Manjula B.N., Kumar R. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1994. V. 91. P. 9337–9341.
8. Safi W., Maiorano J.N., Davidson W.S. // J. Lipid Res. 2001. V. 42. P. 864–872.
9. Agnihotri R., Crawford H.C., Haro H., Matrisian L.M., Havrda M.C., Liaw L. // J. Biol. Chem. 2001. V. 276. P. 28261–28267.
10. Mikhailova A.G., Rumsh L.D. // Appl. Biochem. Biotechnol. 2000. V. 88. P. 159–174.
11. Михайлова А.Г., Руми Л.Д. // Биоорганическая химия. 1998. Т. 24. С. 282–287.
12. Mikhailova A.G., Rumsh L.D. // FEBS Lett. 1999. V. 442. P. 226–230.
13. Maroux S., Baratti J., Desnuelle P. // J. Biol. Chem. 1971. V. 246. P. 5031–5039.
14. Austen B.M., Cliffe S., Grant D., Hermon-Taylor J. // US Patent. 4.593,018, 3 Jun 1986.
15. Light A., Savithri H.S., Liepnieks J. // J. Anal. Biochem. 1980. V. 106. P. 199–206.
16. Chiu A.T., Peach M.J. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1974. V. 71. P. 341–344.
17. Иванов В.Т., Карелин А.А., Михалева И.И., Васковский Б.В., Свиряев В.И., Назимов И.В. // Биоорганическая химия. 1992. Т. 18. С. 1271–1311.

18. Lu D., Futterer K., Korolev S., Zheng X., Tan K., Waksman G., Sadler J.E. // *J. Mol. Biol.* 1999. V. 292. P. 361–373.
19. Mann N.S., Mann S.K. // *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1994. V. 206. P. 114–118.
20. McCutcheon A.D. // *Arch. Surg.* 2000. V. 135. P. 278–285.
21. Miyata S., Rjshikawa N., Higashi S., Miyagi Y., Nagashima Y., Yanoma S., Kato Y., Yasumitsu H., Miyazaki K. // *J. Biochem.* 1999. V. 125. P. 1067–1076.
22. Varallyay E., Pal G., Patty A., Szilagyi L., Graf L. // *Biochem. Biophys. Res. Com.* 1998. V. 243. P. 56–60.
23. Sahin-Toth M., Graf L., Toth M. // *Biochem. Biophys. Res. Com.* 1999. V. 264. P. 505–508.
24. Sahin-Toth M., Toth M. // *Biochem. Biophys. Res. Com.* 2000. V. 275. P. 668–671.
25. Sahin-Toth M., Toth M. // *Biochem. Biophys. Res. Com.* 2000. V. 278. P. 286–289.
26. Abita J.P., Delaage M., Lazdunski M. // *Eur. J. Biochem.* 1969. V. 8. P. 314–324.
27. Eisenthal R., Cornish-Bowden A. // *Biochem. J.* 1974. V. 139. P. 715–720.

## New Substrates for Enteropeptidase.

### I. Biologically Active Hepta-, Octa-, and Nonapeptides

V. V. Likhareva, B. V. Vas'kovskii, N. E. Shepel',  
S. K. Garanin, A. G. Mikhailova<sup>#</sup>, and L. D. Rumsh

<sup>#</sup> Phone: +7 (095) 335-4222, e-mail: anna@enzyme.siobc.ras.ru

*Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,  
ul. Miklukho-Maklaya 16/10, GSP Moscow, 117997 Russia*

Enteropeptidase (enterokinase, EC 3.4.21.9) hydrolyzes peptide bonds formed by carboxyl groups of Lys or Arg residue provided that less than four negatively charged amino acid residues are in positions  $P_2$ – $P_5$  of its substrate. We determined the kinetic parameters of three substrates of this type: human angiotensin II (AT) (**DR** ↓ VYIHPF) and the Hb(2–8) (LTAEEK ↓ A) and Hb(1–9) (MLTAEEK ↓ AA) peptides of the cattle hemoglobin  $\beta$ -chain. The  $K_m$  values for all the substrates ( $\sim 10^{-3}$  M) were one order of magnitude higher than those of the typical synthetic substrates of enteropeptidase or chimeric proteins with the –DDDDK– full-size linker ( $K_m \sim 10^{-4}$  M). The  $k_{cat}$  values for AT and Hb(2–8) were also close and low ( $\sim 30 \text{ min}^{-1}$ ). The general hydrolysis efficiency of such substrates is no more than 1% of the corresponding value for the typical peptide and protein substrates of the enteropeptidase. However, the elongation of Hb(2–8) peptide by one amino acid residue from its *N*- or *C*-terminus results in a dramatic increase in the catalytic efficiency of the hydrolysis: the  $k_{cat}$  value for Hb(1–9) is  $1510 \text{ min}^{-1}$ , which means that it is hydrolyzed only three times less effective than the chimeric protein with the full-size linker. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2003, vol. 29, no. 2; see also <http://www.maik.ru>.

*Key words:* chimeric proteins, enteropeptidase, peptide substrates, trypsinogen