

УДК 615: 595

**НОВЫЙ ПСИХРОФИЛЬНЫЙ КАТЕПСИН L ИЗ ГЕПАТОПАНКРЕАСА
КРАСНОГО КОРОЛЕВСКОГО КРАБА (PARALITHODES
CAMTSCHATICUS)****Исаев В.А., Балашова М.В., Шагин Д., Шагина И., Еремеев Н.Л., Руденская Г.Н.***Биологический факультет Московский государственный университет Москва,
e-mail: trinita@rmt.ru*

Психрофильные и психотолерантные организмы некоторое время или постоянно живущие при низких температурах продуцируют "cold – adapted" ферменты. Известно, что около 90% биосферы существует при температурах ниже 10°C. На поверхности земли преобладают низкотемпературные условия на арктическом и антарктическом континентах, горных районах и морских водах, которые покрывают 70% этой площади и располагаются ниже 1000 м уровня моря, температура не превышает 5°C. Психрофильные организмы живут при таких низких температурах, при которых большинство других видов не может расти и для выживания они нуждаются в ферментах, способных успешно осуществлять катализ в этих экстремальных условиях. Принято считать, что отличительный признак психрофильных ферментов – более высокая активность при низких и умеренных температурах, чем у аналогичных мезофильных ферментов [1, 2]. Эффективность катализа - kcat/КМ и значительное увеличение термостабильности предположительно связаны с большей подвижностью полипептидной цепи.

Ключевые слова: катепсин L, психотолерантные организмы, коллаген**NOVEL PSYCHROTROPIC CATHEPSIN L FROM THE HEPATOPANCREAS OF
RED KING CRAB (PARALITHODES CAMTSCHATICUS)****Isaev V.A., Balashova M.V., Shagin D., Shagina I., Eremeev N.L., Rudenskaya G.N.***Department of Biology Moscow State University, Moscow, e-mail: trinita@rmt.ru*

Psychrofilny and psychotolerant organisms some time or constantly living at low temperatures produce «cold – adapted» enzymes. It is known that about 90% of the biosphere exist at temperatures below 10 °C. On the Earth's surface low-temperature conditions on the Arctic and Antarctic continents, mountainous areas and sea waters which cover 70% of this area prevail and lower than 1000 m of sea level are located, temperature doesn't exceed 5 °C. Psychrofilny organisms live at such low temperatures at which the majority of other types can't grow and for survival they need the enzymes capable to successfully perform a catalysis in these extreme conditions. It is considered to be that a distinctive sign the psychrofilnykh of enzymes – higher activity at low and moderate temperatures, than at similar mesophilic enzymes [1, 2]. Efficiency of a catalysis - kcat/KM and significant increase in thermostability are presumably connected with bigger mobility of a polypeptide chain.

Keywords: cathepsin L, psychrotrophic, collagenolytic

Членистоногие по количеству видов и распространенности могут считаться самой процветающей группой живых организмов, они обитают практически повсеместно и способны жить в экстремальных условиях. Протеиназы этих организмов являются необычными ферментами, заметно отличающимися по энзиматическим характеристикам от своих аналогов позвоночных и, особенно, млекопитающих. Многие ферменты членистоногих обладают уникальными свойствами и находят практическое применение в различных отраслях промышленности и медицине. Однако в настоящее время наиболее изучены психрофильные и психротолерантные ферменты из микроорганизмов [3,4].

Камчатский краб относится к отряду Decapoda, подотряду Anomura, семейству Lithodidae, подсемейству Uthodinae, роду Paralithodes. Этот краб – наиболее крупный из четырех промысловых видов северо-западной части Тихого океана. Обитание камчатского краба на родине приурочено

к определенным водным массам – крабы совершают вертикальные миграции. По температурному режиму воды шельфа Берингова и Охотского морей в верхней части склона делятся на 3 слоя. Это поверхностный слой со значительными сезонными колебаниями – от высоких значений летом до отрицательных зимой, слой остаточного зимнего охлаждения с постоянно отрицательными значениями (-1,2°C) и промежуточный слой с постоянно низкой, но положительной температурой (около +1,5°C) У ракообразных (крабов, раков и креветок) гепатопанкреас является органом, совмещающим функции печени и поджелудочной железы. Из-за особенностей питания отряда Decapoda гепатопанкреас секретирует большое количество пищеварительных ферментов, гидролизующих все классы природных полимеров и обладающих широкой специфичностью и необычно высокой активностью. Ранее в нашей лаборатории было выделено и изучено несколько коллагеназ *P. camtschaticus* [5-7]. Цель этого исследо-

вания – изучение нового психротрофного катепсина from *P. camtschaticus*, определение его первичной структуры и энзиматических свойств. Цистеиновые лизосомальные катепсины, принадлежащие к С1 клану, по MEROPS классификации, играют важную роль в метаболизме белка в клетке [8]. Катепсины декапод мало изучены [9], хотя они представляют несомненный интерес для фундаментальной энзимологии и прикладных исследований.

Выделение и очистка протеиназ камчатского краба

Трудности получения гомогенных эндопептидаз крабов связаны с тем, что в их гепатопанкреасе обнаруживается множество ферментов, лишь незначительно отличающихся молекулярной массой, изоэлектрической точкой, обладающих смешанной субстратной специфичностью. Ранее в нашей лаборатории был получен суммарный препарат протеиназ гепатопанкреаса камчатского краба «Морикраза», который применяется в составе мази для лечения ожогов, гнойно-трофических язв и послеоперационных рубцов.

В растворе Морикразы была обнаружена катепсиновая активность – гидролиз хромогенного субстрата Z-Ala-Phe-Arg-pNA [10] и частичное ингибирование этой активности при преинкубации препарата с раствором $HgCl_2$. Активность по хромогенному субстрату усиливалась в присутствии цистеина и сохранялась при pH=5. Это дало основание полагать, что в Морикразе присутствует цистеиновая протеиназа катепсин. Для выделения фермента на первом этапе была проведена анионообменная хроматография на DEAE-Toyorearl в градиенте NaCl. После проведения ионообменной хроматографии, фракции, обладающие активностью по ZD-Ala-Phe-Arg-pNA и ингибирующиеся Hg^{2+} , были собраны, сконцентрированы методом ультрафильтрации и нанесены на сефадексе G-50 fine. Пик, обладающий искомой активностью, был сконцентрирован методом ультрафильтрации и исследован методом SDS-электрофореза в ПААГ.

В итоге была достигнута степень очистки в 582 раза. Выход по активности составил 8,23%, однако результат может быть заниженным, так как многие протеиназы, содержащиеся в исходном материале, активны по субстрату ZD-Ala-Phe-Arg-pNA (в особенности мажорная сериновая протеиназа PC1 и трипсин).

Для того чтобы удостовериться в гомогенности полученной катепсиновой фракции, на SDS-электрофорез было нанесено

избыточное количество белка (рис. 1). Видно, что присутствующая примесь незначительна, возможно это остаток неактивированного профермента.

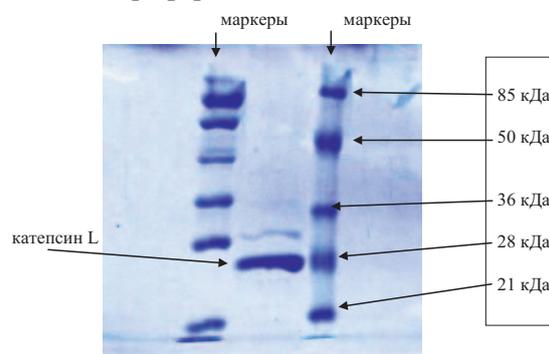


Рис. 1. Аминокислотная последовательность катепсина L из гепатопанкреаса of Red King Crab (*P. camtschaticus*)

Далее был получен и секвенирован полноразмерный ген катепсина L камчатского краба. Нуклеотидная последовательность была транслирована в аминокислотную последовательность профермента (рис. 2).

```
DDTLPAEVDWRTKGAIVPVKDQKACGSCWAFSATGSLGQHFLKDGKLVLSLE
QNLVDCSTKQGDHGCCGGLMDFAFYIKDNGGIDTEASYPYEATDGKCYNPANSQ
ATVTGYVDVEHSDALQKAVATIGPISVAIDASRSTFHFYHKGYVDKCCSSTLSDH
GVLAVGYGTQDGTIDYWLKNSWNITWGNHGFIEMSRNRNNCGIATQASYPLV
DDTLPAEVDWRTKGAIVPVKDQKACGSCWAFSATGSLGQHFLKDGKLVLSLE
QNLVDCSTKQGDHGCCGGLMDFAFYIKDNGGIDTEASYPYEATDGKCYNPANSQ
ATVTGYVDVEHSDALQKAVATIGPISVAIDASRSTFHFYHKGYVDKCCSSTLSDH
GVLAVGYGTQDGTIDYWLKNSWNITWGNHGFIEMSRNRNNCGIATQASYPLV
```

Рис. 2. SDS-PAGE катепсина L PC. Электрофорез образцов в 12% полиакриламидном геле, где: (1) полоса фракции очищенного фермента соответствует 28 kDa (катепсин L). Полоса, соответствующая 32 kDa, принадлежит проэнзиму. (2) стандарты (85-21 kDa, Fermentas SM-0441)

Анализ кДНК гена и транслированной аминокислотной последовательности показал, что профермент содержит 324 аминокислотных остатка, рассчитанная молекулярная масса 35,4 кДа; pI = 4,88.

Известно, что катепсины L как прокариот, так и эукариот, содержат высококонсервативную лидерную последовательность (16-18 аминокислотных остатков), за которой следует про-последовательность (60-100 аминокислотных остатков).

Лидерная последовательность состоит преимущественно из гидрофобных аминокислотных остатков, что облегчает транспорт катепсина по секреторному пути. Про-последовательность необходима для корректного фолдинга белка, временного ингибирования протеазной активности и транспорта неактивного профермента в эндосомы. В данном случае, аминокислотная

последовательность начинается с метионина, который впоследствии отщепляется. Лидерная последовательность выражена слабо, скорее всего, она представлена 19 аминокислотными остатками и заканчивается на Thr19. Это наиболее вариабельный участок последовательности.

На основе сравнения с известными катепсинами других членистоногих было предположено место расщепления пропоследовательности для получения зрелого фермента (обозначено красной стрелкой). Обычно, при созревании катепсина L у членистоногих, расщепление происходит вблизи участка высокой консервативности DWR. Более того, в участке P2' преимущественно находится Pro, реже – другая гидрофобная аминокислота (например, Ala). Зрелая форма исследуемого катепсина камчатского краба содержит предположительно 220 аминокислотных остатков, рассчитанная молекулярная масса составляет 23,78 кДа. Согласно SDS-электрофорезу в ПААГ молекулярная масса катепсина составляет 29 кДа, однако, следует учитывать, что на электрофорезе значения масс обычно бывают завышенными. Низкая изоэлектрическая точка, pI=4,82, является характерной чертой большинства ферментов членистоногих.

Для выявления особенностей в первичной структуре исследуемого катепсина, было выполнено сравнение его аминокислотной последовательности с аминокислотными последовательностями катепсинов других членистоногих (Рис. 3).

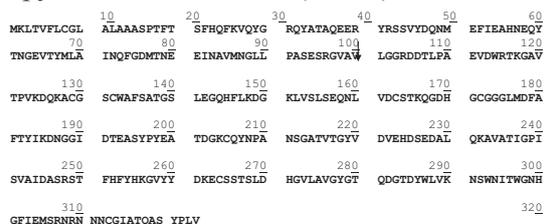


Рис. 3. MALDI-MS анализ

Из приведенных данных видно, что исследуемый катепсин проявляет высокую степень сходства аминокислотной последовательности с катепсинами L других членистоногих (95-97% сходства). В целом, N-конец более вариабельный, С-конец более консервативный. Интересно, что С-концевые 5 аминокислотных остатка SYPLV присутствуют у подавляющего большинства представителей цистеиновых катепсинов членистоногих. Исследуемая аминокислотная последовательность содержит консервативный мотив GCNGG, характерный для большинства цистеино-

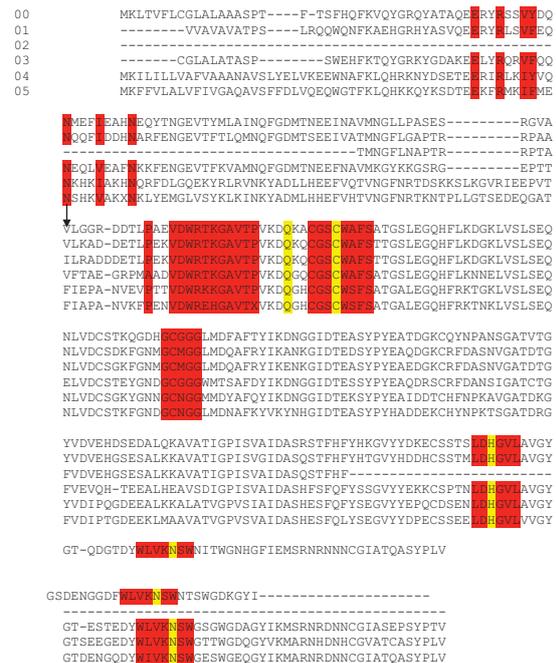


Рис. 4. Сравнение первичной структуры катепсинов L из различных Decapoda. Высококонсервативный район отмечен красным, аминокислотные остатки, которые образуют активный центр – желтым, Cys образующий дисульфидные связи – in голубым. Сайт расщепления про-энзима указан стрелкой.

00 – катепсин L из Red King Crab (*Paralithodes camtchatica*); 01 – катепсин L из cathepsin L from Whiteleg Shrimp (*Litopenaeus vannamei*); 02 – катепсин L из cathepsin L from Giant Tiger Prawn (*Penaeus monodon*); 03 – катепсин L из катепсин L из cathepsin L from Norway lobster (*Nephrops norvegicus*); 04 – катепсин L из – катепсин L из cathepsin L from African mosquito (*Culex aegypti*); 05 – катепсин L из cathepsin L from dermestid beetle (*Dermestes frischii*)

вых протеиназ. В нашем случае, Asn заменен на Gly. Это, вероятно, связано с психротрофностью фермента и увеличивает его лабильность. Катепсин L камчатского краба содержит мотив ERFNIN (EX3RX2(V/I)FX2NX3IX3N), характерный для всех представителей подсемейства катепсинов L. Однако Phe заменен на Tyr. Каталитический Cys окружен участком высокой консервативности. Шесть высококонсервативных остатков Cys, формирующих дисульфидные связи в папаине в позициях 22-65, 56-98, 157-207, присутствуют и в исследуемом катепсине. Общее низкое содержание Arg (4% от всех аминокислот) и отсутствие явных гидрофобных кластеров свидетельствует об адаптации катепсина L камчатского краба к работе при низких температурах (психротрофность). Третичная структура (рис. 5)

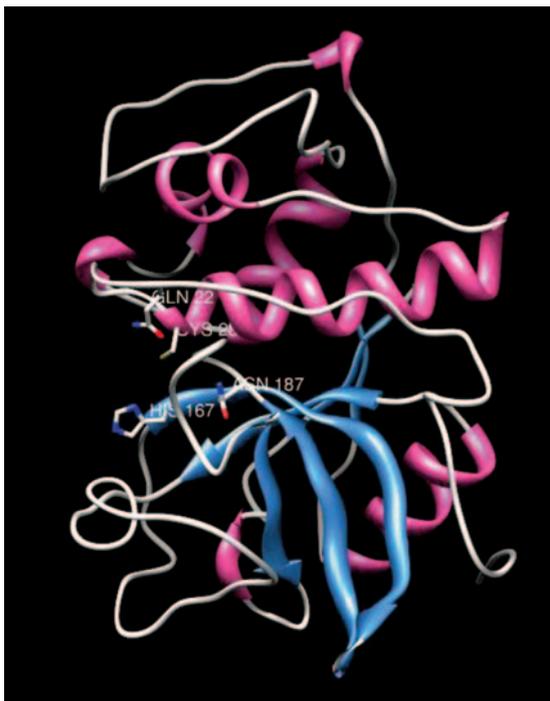


Рис. 5. Модель третичной структуры катепсина L PC. Розовым отмечены α -спирали, синим – β -слои, белым – петли. Активный центр в красном квадрате

представляет собой две цепи – тяжелая и легкая, связанные дисульфидными и водородными связями. Между цепями находится активный центр фермента и субстрат-связывающий участок. N-концевой домен образован 3 α -спиралями, C-концевой домен образован 1 α -спиралью и 4 β -листами. Такая организация вторичной структуры является типичной для цистеиновых катепсинов. Относительно большое количество петельных структур на поверхности белковой глобулы является характерной особенностью строения психротрофных ферментов. β -листы находятся, в основном, внутри глобулы и в районе субстрат-связывающего участка. На рис. 6 розовым цветом обозначены α -спиральные участки, синим – β -листы, белым – петли. Красным прямоугольником выделен активный центр фермента (аминокислотные остатки Gln22, Cys28, His167, Asn187). N-концевой домен образован тремя α -спиралями, C-концевой домен образован 1 α -спиралью и 4 β -листами. Такая организация вторичной структуры является типичной для цистеиновых катепсинов. Относительно большое количество петельных структур на поверхности белковой глобулы является характерной особенностью строения психротрофных ферментов. β -листы находятся, в основном, внутри глобулы и в районе субстрат-связывающего участка.

Методом MALDI-MS было показано 100% соответствие первичной структуры выделенного катепсина, определенной по кДНК.

Рис.6. MALDI-MS анализы

Цветом обозначены идентичные участки сравниваемых последовательностей. Гидролиз трипсином (90.9% идентичности); Гидролиз глутамилэндопептидазой (81.4% идентичности):

Так как катепсины, в основном, являются лизосомальными ферментами, то обычно они активны при кислых pH. Так, для катепсина L из жука-кожееда pH оптимум составляет 4,5; для катепсина L из тихоокеанской белой креветки - 5; большинство катепсинов L млекопитающих обладают наибольшей активностью при pH = 5,5.

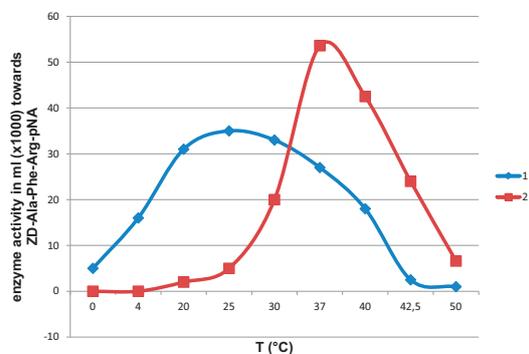


Рис. 6. Температурный оптимум. Активность фермента измерена по субстрату Z-Ala-Phe-Arg-pNA. 1 – катепсин L из краба *P.camtschaticus*; 2 – катепсин L из жука *Dermestes frisii*

Однако исследуемый катепсин камчатского краба показал наибольшую ферментативную активность по хромогенному субстрату ZD-Ala-Phe-Arg-pNA при слабощелочных условиях, с оптимумом pH = 8,0. При этом, катепсин L камчатского краба также сохраняет активность при кислых pH. Исходя из этих данных, можно предположить, что исследуемый катепсин является секретлируемым белком, а не лизосомальным. Температурный оптимум катепсина камчатского краба находится при 25 °C (рис.6). Однако, было обнаружено, что фермент способен гидролизовать хромогенный субстрат при температуре ниже 20 °C, и даже при 0 °C. Это позволяет отнести исследуемый фермент к психротрофным. При повышении температуры до 50-60 °C происходит резкое падение активности. Если провести 30-минутную пре-инкубацию фермента при 60 °C и только потом добавить субстрат, то активность падает до 0. Это говорит о тепловой денатурации катеп-

Таблица 1

Выделение катепсина камчатского краба

этапы очистки	количество белка (мг)	Общая активность	Активность в мл по ZD-Ala-Phe-Arg-pNa (мМ/мин·мл)	Удельная активность в мл (мМ/мин·мг белка)	Степень очистки
исходный материал	800	1312	262,4	1,6	1
DEAE-ToyoPearl	5	97	64,6	19,4	12
G-50 fine	0,116	108	39,3	931	582

сина при данной температуре. Также в ходе работы было замечено, что исследуемый катепсин быстро теряет свою каталитическую активность при температуре выше 35 °С (падение удельной активности ~ на 25% за 4 часа нахождения при температуре 37 °С).

Сравнение с катепсином L жука выделенным из *Dermestes frischii* Т оптимум которого находится при 37°С, показало, что температурах меньше 10°С фермент жука не активен, при 42°С, в отличие от катепсина краба, сохраняет 24% активности.

Субстратная специфичность

Из таблицы 2 видно, что исследуемый катепсин обладает амидазной активностью и эффективно гидролизует синтетические хромогенные субстраты. С наибольшей эффективностью расщепляется синтетический субстрат ZD-Ala-Phe-Arg-pNA. № 2-6 являются стандартными субстратами для

сериновых и трипсиноподобных протеиназ, как видно, некоторые из них (№ 2, 3) исследуемый катепсин хорошо гидролизует, другие (№ 4, 6) практически не гидролизует. Arg в положении P1 является важным фактором гидролиза субстрата данным ферментом. При сравнении активности катепсина по субстратам № 2 и 3, видно, что замена Arg на Lys в положении P1 уменьшает уровень гидролиза на 27%. Субстрат трипсина (BZ-Arg-pNA) исследуемым катепсином практически не гидролизует, несмотря на наличие Arg в положении P1. № 13, 14 являются классическими субстратами папаина и бромелаина. Для исследуемого катепсина, по всей видимости, эти субстраты являются слишком короткими для эффективного связывания, поэтому их гидролиз идет на низком уровне. Нахождение Leu вместо Ala в положении P1 в субстрате № 14 сильно снижает степень гидролиза. Также практически

Таблица 2

Действие катепсина L PC на синтетические субстраты. Все исследования были проведены при pH=8,0, 25 °С, в присутствии 5mM Cys

Cleavage site	Organism	Supposed/ proved
104 R-DDTLPAEVDWRTK	<i>Paralithodes camtschaticus</i>	Proved on the basis of N-terminal sequence
83-TLPEKVDWTKG	<i>Litopenaeus vannamei</i>	Proved on the basis of N-terminal sequence ¹¹
106-MAADVWRNK	<i>Pandalus borealis</i>	Proved on the basis of N-terminal sequence ¹²
121-KFPENVDWREH	<i>Dermestes frischii</i>	Suggested ¹³
118-QLPGQIDWRDK	<i>Tenebrio molitor</i>	Proved on the basis of N-terminal sequence ¹⁴
115-KLPAKVDWRQK	<i>Triatoma infestans</i>	suggested ¹⁵
120-KLPDVTWDRDK	<i>Sitophilus zeamais</i>	Suggested ¹⁶
113-SWPWSKKVDWRSK	<i>Frankliniella occidentalis</i>	Suggested ¹⁷
116-ADPNVQAVEVDWRDS	<i>Diabrotica virgifera</i>	Proved on the basis of N-terminal sequence ¹⁸
123-VIPSKVDWREK	<i>Aphis gossypii</i>	suggested ¹⁹
126-TLAASIDWRTK	<i>Tetrahymena</i>	Proved on the basis of N-terminal sequence ²⁰

не гидролизуются субстраты эластаз (№ 18) и пролиновых эндопептидаз (№ 19).

Для изучения особенностей гидролиза пептидных связей был проведен гидролиз полученным катепсином физиологически активных пептидов известного строения – мелиттина, А и В цепей инсулина. Рис 7а.

Стрелками обозначены места гидролиза пептидов исследуемым катепсином. Красными стрелкам выделены места, наиболее предпочтительные для гидролиза.

Из приведенных данных видно, что исследуемый катепсин обладает широкой субстратной специфичностью. В положении P1 предпочитает полярные, положительно заряженные аминокислотные остатки, особенно Arg. Чуть менее интенсивно идет гидролиз, если Arg в P1 заменить на Lys. Однако, если в положении P1 находится His, то гидролиз не идет. Также, для активного гидролиза субстратов исследуемым катепсином важно, чтобы в положении P2 находились гидрофобные аминокислотные остатки, что характерно для цистеиновых протеиназ. Предпочтительно, чтобы положение P2 занимали Leu, Val, Ile Phe. Менее интенсивно катепсин расщепляет пептиды

когда в положении P2 находится Thr или Ala. Удивительно, что в отличие от своих аналогов у других организмов (например, катепсины L из жука-кожееда и тихоокеанской белой креветки) исследуемый катепсин может гидролизовать субстраты с Asp в положении P2. В нативных пептидных субстратах возможен гидролиз после полярных незаряженных аминокислотных остатков в положении P1: Thr, Tyr, Ser. Также было установлено, что данный фермент не гидролизует небольшие пептиды. Это, скорее всего, связано с особенностями строения субстрат-связывающей впадины: из-за отсутствия “запирающей петли” исследуемый катепсин не проявляет экзопептидазную активность. Продолговатая форма субстрат-связывающей впадины, образованной, в основном, незаряженными аминокислотными остатками не способствует эффективному связыванию небольших пептидов.

Общая коллагенетическая активность исследуемого катепсина была проверена в постепени гидролиза азоколлагена. Удельная активность по азоколлагену составляет 3,25 М/мин/мг белка. Далее был проведен гидролиз коллагена в течение 2 и 4 часов

Таблица 3

Гидролиз синтетических хромогенных субстратов.

№	Субстрат	активность в мл (мМ/(мин · мл))	Удельная акт. (мМ/(мин · мг белка))	относительная акт. (в % относительно субстрата ZD-Ala-Phe-Arg-pNA)
1	ZD-Ala-Phe-Arg-pNA	39,3	802	100
2	Ac-Leu-Leu-Arg-pNA	25,0	511	64
3	Ac-Leu-Leu-Lys-pNA	18,6	380	47
4	D-Val-Leu-Lys-pNA	0,2	5	1
5	ZD-Ala-Leu-Arg-pNA	11,1	226	28
6	Gly-Arg-pNA	2,3	46	6
7	BZ-Arg-pNA	0,4	08	1
8	Glp-Ala-Ala-Leu-pNA	4,0	82	10
9	ZD-Ala-Asp-Ala-pNA	15,7	320	40
10	ZD-Ala-Glu-Ala-pNA	2,6	54	7
11	ZD-Ala-Ala-Phe-pNA	0,4	8	1
12	ZD-Gly-Gly-Leu-pNA	0,0	1	0
13	Glp-Phe-Ala-pNA	9,3	191	24
14	Glp-Phe-Leu-pNA	0,8	17	2
15	ZD-Ala-Ala-Phe-Asp-pNA	2,6	52	6
16	ZD-Ala-Ala-Met-Asp-pNA	0,9	17	2
17	ZD-Glu-pNA	0,2	5	1
18	Ac-Ala-Ala-Ala-pNA	2,1	43	5
19	ZD-Ala-Ala-Pro-pNA	0,3	5	1

Таблица 3

Действие ингибиторов на катепсин L PC. Активность определяли по синтетическому субстрату ZD-Ala-Phe-Arg-pNA. При t pH=8,0, 25 °C. Преинкубация 60 min

	катепсин камчатского краба			катепсин жука		
T, °C	4	23	37	4	23	37
Km, mM	0,043	0,033	0,16	0	0,12	0,050
tm, mM/c	4,9	0,13	0,74	0	0,98	0,68
kcat, 1/c	26	0,69	3,9	0	5,2	3,6
kcat/Km, л/ммоль/с	605	21	25	0	42	72

расчёт по методу Лайнуивера-Бёрка

при комнатной температуре. Результаты приведены на SDS электрофорезе в ПААГ (рис. 7). Из приведенных данных видно, что исследуемый катепсин обладает коллагенолитической активностью. Коллаген X типа гидролизуется несколько быстрее, чем коллаген VI типа. В обоих случаях первые признаки гидролиза заметны уже через 2 часа инкубации фермента с коллагеном, причем в первую очередь расщеплению подвергаются β-цепи. После 4 часов инкубации катепсина с коллагеном VI типа α и β цепи полностью гидролизованы и коротких пептидов на электрофореграмме не видно. В случае коллагена X типа, за 4 часа происходит полный гидролиз всех трех видов цепей.

Гидролиз мелиттина



Гидролиз А-цепи инсулина



Гидролиз В-цепи инсулина



Рис. 7. Сайты расщепления природных пептидов катепсином L PC. Красные стрелки показывают главные позиции гидролиза, черными стрелками показаны отдельные сайты расщепления

Таблица 3. Сравнение кинетических параметров исследуемого катепсина с катепсином L из жука-кожееда по субстрату Z-Ala-Phe-Arg-pNA. Из приведенных в таблице 3 данных видно, что исследуемый катепсин из краба показывает относительно высокое сродство к синтетическому хромогенному субстрату Z-Ala-Phe-Arg-pNA. Эффективность катализа исследуемого

катепсина при температурах выше +20°C сравнима с таковой термофильного катепсина L из жука-кожееда. Заметные отличия наблюдаются при температурах +4 °C: в то время как фермент из жука-кожееда не проявляет протеолитической активности, фермент из краба демонстрирует высокую эффективность катализа – на порядок выше, чем при температурах выше +20 °C.

Ингибиторный анализ

Таблица 4

Действие ингибиторов на катепсин L камчатского краба

№	Ингибитор	A ₄₁₀	Остаточная акт. (мМ/мин·мл)	% ингибирования
1	HgCl ₂	0	0	100
2	E-64	0.049	0,99	82
6	Лейпептин	0.056	1,1	80
3	Йодацетамид	0,069	1,38	75
5	PMSF	0.091	1,8	67
7	Соевый ингибитор трипсина	0.231	4,6	16
8	Эндогенный ингибитор сериновых протеиназ из гепатопанкреаса камчатского краба	0.216	4,3	21
	Контроль	0.275	5,5	

Таблица 4 Действие ингибиторов на катепсин L камчатского краба Исследуемый фермент полностью ингибируется хлоридом ртути, специфическим ингибитором цистеиновых протеиназ. Катионы ртути могут конкурентно необратимо связываться с цистеином активного центра. 82% ингибирование исследуемой протеиназы E-64 и 80% ингибирование лейпептином

Таблица 5

Объект	M (кДа)	pI	T оптимум (°C)	pH оптимум
Камчатский краб (<i>Paralithodes camtschatica</i>)	23,78	4,82	25	8,0
Тихоокеанская белая креветка (<i>Litopenaeus vannamei</i> ¹)	31,5	4,63	-	5,1
Северная креветка (<i>Pandalus borealis</i>)	29	-	40	6,0
Омар американский (<i>Homarus americanus</i> ²)	28	4,8	25	4,5
Клоп триатомовый (<i>Triatoma infestans</i>)	23	4,7	37	5,5
Жук-кожед (<i>Dermestes frischii</i>)	24	4,7	40	4,5
Мучной хрущак (<i>Tenebrio molitor</i>)	30	4,3	47	5,0

лишний раз подтверждает принадлежность фермента к семейству папаиноподобных катепсинов. Чуть хуже на данный фермент действует йодацетамид – достигается 75% ингибирования активности. Соевый ингибитор трипсина практически не подавлял активность катепсина (16% ингибирование). Более того, эндогенный ингибитор сериновых протеиназ из гепатопанкреаса камчатского краба снижал катепсиновую активность только на 21%. В целом, полученный профиль ингибирования является характерным для катепсинов L.

Таблица 5 Сравнение молекулярных и ферментативных свойств катепсинов L некоторых членистоногих.

В настоящее время сведения о катепсинах ракообразных очень скудные. Как видно из Таблицы 5, энзиматические свойства катепсинов L хорошо изучены не у всех видов членистоногих. В отличие от многих катепсинов L, катепсин камчатского краба обладает аномально щелочным оптимумом pH. Более того, заметен низкий температурный оптимум, идентичный температурному оптимуму катепсина L из американского омара, но гораздо ниже чем у обитающей в сходных температурных условиях северной креветки. pI и молекулярная масса исследуемого фермента лежат в стандартном диапазоне.

Таким образом, на основании проведенных исследований катепсин из гепатопанкреаса Red King Crab (*Paralithodes camtschaticus*) можно классифицировать как цистеиновую протеиназу клана SA, семейства C1, субсемейства A. Фермент обладает психрофильными свойствами и может эффективно гидролизовать коллаген.

Список литературы

1. G.Gianese, P.Argos & S.Pascarella, Structural adaptation of enzymes to low temperatures, 2002, 14: 141-148

2. J.Gomes, W.Steiner, "The Biocfflytic Pjntial of Extremophiles and Extremophiles" Food Technol. Biothechnol., 2004, 42,(4),223-239

3. M.Kuddus, P.W.Ramieke, "Recent developments in production and biotechnological applications of cold-active microbial proteases", Crit.Rev.Microbiol. 2012, 38, 330-338

4. M.Fombacke, M.Clarsund, "Cold-adapted Proteases as an Emerging Class of Therapeutics", Infect. Dis.Ther., 2013 2 (1), 15-26

5. A.M.Shmoilov, G.N.Rudenskaya, V.A.Isaev, A.V.Baydakov, R.D.Zhantiev, O.S.Korsunovskaya, L.V.Ageeva, N.V.Starikova, A comparative study of collagenase complex and new homogeneous collagenase preparations for scar treatment. Journal of drug delivery science and technology, 2006, 16: 285-292

6. G.N.Rudenskaya, Y.A.Kislitsin, D.V. Rebrikov, Collagenolytic serine protease PC and trypsin PC from king crab *Paralithodes camtschaticus*: cDNA cloning and primary structure of the enzymes, BMC Structural Biology, 2004, 2: 20-24

7. A.I.Papisova, S.A.Semenova, Y.A.Kislitsyn, G.N.Rudenskaia, Characteristics of substrate hydrolysis by endopeptidases from the hepatopancreas of the king crab, Bioorg Khim (Mosc), 2008, 34-4: 479-86

8. M.E.McGrath, The lysosomal cysteine proteases, Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 1999, 28: 181-204

9. Aoki H., Ahsan M.N., Watabe S., "Molecular cloning and functional characterization of crustapain: a distinct cysteine proteinase with unique substrate specificity from northern shrimp *Pandalus borealis*", 2003, J Biochem., 133(6): 799-810

10. I.B.Leshchinskaya, E.V.Shakirov, E.L.Itskovitch, N.P.Balaban, A.M.Mardanov, M.R.Sharipova, E.V.Blagova, V.M.Levdikov, I.P.Kuranova, G.N.Rudenskaya, V.M.Stepanov, Glutamyl endopeptidase of *Bacillus intermedius* strain 3-19. Purification, properties, and crystallization, Biochemistry (Mosc), 1997, 62: 903-908

11. L.T. Voyushina, E.Yu. Terent'eva, V.M. Stepanov, The synthesis of chromogenic peptide substrates containing p-nitroanilides of arginine and lysine, catalyzed by proteinases adsorbed on support material, Biomed. Biochim. Acta. 1991, 50: 209-212

12. B.F.Erlanger, N.Kokowsky, W.Cohen, The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin, Arch. Biochem. Biophys. 1961, 95: 271-288

13. R. Jr. Chavira, T.J. Burnett, J.H. Hageman, Assaying proteinases with azocollagene, Anal Biochem. 1984, 136: 446-450

14. H.Kirschke, A.A.Kembhavi, P.Bohley and A.J.Barrett, Action of rat liver cathepsin L on collagen and other substrates, Biochem J. 1982, 201-2: 367-72

15. S. Al-Jassabi, Purification and characterization of cathepsin L from skeletal muscle of the lizard *Agama stellio stellio*, Biochemistry (Mosc), 200, 65-8: 959-62

16. Boulay C., Van Wormhoudt A., Sellos D., "Cloning and expression of cathepsin L-like proteinases in the hepatopancreas of the shrimp *Penaeus vannamei* during the intermolt cycle", 1996, *J Comp Physiol B*, 1996,166(5): 310-318
17. Papisova A.I., Javadov A.S., Rudenskaya Yu. A., Balandina G.N., Zhantiev R.D., Korsunovskaia O.S., Dunaevsky Y.E., Rudenskaya G.N. "Novel cathepsin L-like protease from dermestid beetle *Dermestes frischii* maggot", *Biochimie*, 2011, 93 (2): 141-148
18. Cristofolletti P.T., Ribeiro A.F., Terra W.R., "The cathepsin L-like proteinases from the midgut of *Tenebrio molitor* larvae: sequence, properties, immunocytochemical localization and function", *Insect Biochem Mol Biol.*, 2005, 35(8): 883-901
19. Kollien A.H., Waniek P.J., Nisbet A.J., Billingsley P.F., Schaub G.A., "Activity and sequence characterization of two cysteine proteases in the digestive tract of the reduviid bug *Triatoma infestans*", *Insect Mol Biol.*, 2004,13(6): 569-79
20. Matsumoto I., Abe K., Arai S., Emori Y., "Functional expression and enzymatic properties of two *Sitophilus zeamais* cysteine proteinases showing different autolytic processing profiles in vitro", *J Biochem.*, 1998, 123(4): 693-700
21. Kuipers A.G., Jongsma M.A., "Isolation and molecular characterization of cathepsin L-like cysteine protease cDNAs from western flower thrips (*Frankliniella occidentalis*)", *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.*, 2004, 139(1): 65-75
22. Bown D.P., Wilkinson H.S., Jongsma M.A., Gatehouse J.A., "Characterisation of cysteine proteinases responsible for digestive proteolysis in guts of larval western corn rootworm (*Diabrotica virgifera*) by expression in the yeast *Pichia pastoris*", *Insect Biochem Mol Biol.*, 2004, 34(4): 305-320
23. Deraison C., Darboux I., Duportets L., Gorojankina T., Rahbé Y., Jouanin L., "Cloning and characterization of a gut-specific cathepsin L from the aphid *Aphis gossypii*", *Insect Mol Biol.*, 2004, 13(2): 165-177
24. Laycock M.V., MacKay R.M., Di Fruscio M., Gallant J.W., "Molecular cloning of three cDNAs that encode cysteine proteinases in the digestive gland of the American lobster (*Homarus americanus*)", *FEBS Let.*, 1991, 292(2): 115-20
25. Kerrer K.M., Peiffer S.L., DiTomas M.E. "Two distinct gene subfamilies within the family of cysteine protease genes", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993, 90: 3063-3067
26. E.Lindskog, I.Svensson, L.Häggström, A homologue of cathepsin L identified in conditioned medium from Sf9 insect cells, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2006, 71: 444-449