

ОЦЕНКА СУБСТРАТНОЙ СПЕЦИФИЧНОСТИ КОЛЛАГЕНАЗЫ, СВОБОДНОЙ И ИММОБИЛИЗОВАННОЙ НА МАТРИЦЕ ХИТОЗАНА

В. А. Королева¹, Т. Н. Беляева², М. Г. Холявка^{2,3}, В. Г. Артюхов²

1 - ФГБОУ ВО «Воронежский государственный медицинский университет им. Н.Н. Бурденко»

2 - ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет»

3 - ФГАОУ ВО «Севастопольский государственный университет»

Поступила в редакцию 10.12.2020 г.

Аннотация. Бактериальные коллагеназы являются металлопротеиназами, участвующими в разложении внеклеточного матрикса клеток животных из-за их способности гидролизовать нативный коллаген. Патогенные микроорганизмы (в основном *Clostridium histolyticum*), известные как продуценты микробной коллагеназы, могут расщеплять каждую полипептидную цепь коллагена на несколько участков. Известно, что они действуют как экзотоксин и нарушают метаболизм соединительной ткани за счет гидролиза коллагена в клетках. Коллаген является основным белком внеклеточного матрикса тканей, таких как сухожилия, кожа, хрящи и кровеносные сосуды, а также органическим компонентом зубов, костей и рогами. Коллагеназы часто используются для выделения клеток из тканей в медицинских исследованиях. Эти ферменты успешно применяют для удаления и перемещения клеток поджелудочной железы. Сегодня коллагеназу рассматривают в качестве лекарственного средства и, по-видимому, она может заменить некоторые инвазивные методы лечения заболеваний, при которых чрезмерное отложение коллагена вызывает нарушения физиологических функций организма. Коллагеназа гидролизует нативный коллаген, денатурированный коллаген и желатин. Фермент осуществляет протеолиз по пептидным связям остатков пролина и оксипролина.

В настоящей работе была изучена субстратная специфичность коллагеназы по отношению к следующим субстратам: бычий сывороточный альбумин (БСА), липаза из поджелудочной железы, α_{s1} -казеин молока, α -амилаза из поджелудочной железы, фосфатаза, гемоглобин, яичный альбумин, цитохром с, сывороточный альбумин человека (САЧ), каталаза, коллаген. Активность фермента определяли методом Лоури (по разности между содержанием белка в растворе субстрата без и с 30 минутной инкубацией с ферментом при 37 °С). Установлено, что только коллаген с высокой скоростью гидролизует коллагеназой. По отношению к остальным белкам (бычьему сывороточному альбумину, липазе, гемоглобину, каталазе, казеину молока, амилазе, яичному альбумину, цитохрому с, фосфатазе и сывороточному альбумину человека) была выявлена низкая каталитическая способность нативной и иммобилизованной на матрице хитозана коллагеназы. Снижение протеазной активности иммобилизованной коллагеназы по сравнению со свободной, вероятно, связано со стерическими ограничениями доступа высокомолекулярных субстратов (белков) к активному центру фермента, обусловленными матрицей хитозана.

Ключевые слова: коллагеназа, хитозан, иммобилизация, субстратная специфичность

Бактериальные коллагеназы являются металлопротеиназами, участвующими в разложении внеклеточного матрикса клеток животных из-за их способности гидролизовать нативный коллаген. Эти ферменты являются важными факторами вирулентности для множества патогенных

бактерий [1-8]. Патогенные микроорганизмы, в основном *Clostridium histolyticum*, известны как продуценты микробной коллагеназы [9, 10]. Коллагеназы могут расщеплять каждую полипептидную цепь коллагена на несколько участков [11]. Известно, что они действуют как экзотоксин и нарушают метаболизм соединительной ткани за счет гидролиза коллагена в клетках [12]. Рекомбинантные бактериальные коллагеназы способны

© Королева В. А., Беляева Т. Н., Холявка М. Г., Артюхов В. Г., 2021

гидролизовать как водонерастворимые нативные коллагены, так и водорастворимые денатурированные коллагены [13].

Коллаген является основным белком внеклеточного матрикса тканей, таких как сухожилия, кожа, хрящи и кровеносные сосуды, а также органическим компонентом зубов, костей и роговицы. Чрезмерная агрегация коллагена может вызвать нарушение этиологии органелл [9].

Коллагеназы часто используют для выделения клеток из тканей в медицинских исследованиях. Эти ферменты успешно применяют для удаления и перемещения клеток поджелудочной железы, которая вырабатывает инсулин (у пациентов с диабетом) [14]. Используя коллагеназы, можно также выделить интактные клетки паренхимы печени, жировых клеток и надпочечников [15], которые затем можно использовать для выращивания клеточных культур [16]. Сегодня коллагеназу рассматривают в качестве лекарственного средства и, по-видимому, она может заменить некоторые инвазивные методы лечения заболеваний, при которых чрезмерное отложение коллагена вызывает нарушения физиологических функций организма [17, 18].

Коллагеназа гидролизует нативный коллаген, денатурированный коллаген и желатин. Она осуществляет гидролиз по пептидным связям остатков пролина и оксипролина. Скорость гидролиза субстрата снижается при наличии в нем аргинина [19].

На получение дополнительных сведений о субстратной специфичности коллагеназы в свободном и иммобилизованном состояниях и направлена наша статья.

МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

В качестве объекта исследования была выбрана коллагеназа из *Clostridium histolyticum* фирмы «Sigma-Aldrich», носителями для иммобилизации – кислоторастворимые средномолекулярный ($M_r = 200$ кДа, степень деацетилирования – 82 %) и высокомолекулярный хитозаны ($M_r = 350$ кДа, степень деацетилирования – 94.85%) фирмы ЗАО «Биопрогресс». Иммобилизацию коллагеназы на хитозане осуществляли методом простой адсорбции [20].

Для исследования субстратной специфичности коллагеназы использовались следующие белки: бычий сывороточный альбумин (БСА) (*Bos taurus*, 66 кДа), липаза из поджелудочной железы (*Sus scrofa*, 48 кДа), α 1-казеин молока (*Bos taurus*, 22-23 кДа), α -амилаза из поджелудочной железы (*Sus scrofa*, 51-54 кДа), фосфатаза (*Bos taurus*,

димер ~160 кДа), гемоглобин (*Homo sapiens*, 66.8 кДа), яичный альбумин (*Gallus gallus*, 44-45 кДа), цитохром с (*Homo sapiens*, ~15 кДа), сывороточный альбумин человека (САЧ) (*Homo sapiens*, 66.4 кДа), каталаза (*Bos taurus*, тетрамер ~250 кДа), коллаген (*Homo sapiens*, ~300 кДа).

Активность ферментов определяли методом Лоури (по разности между содержанием белка в растворе субстрата без и с 30 минутной инкубацией с ферментом при 37 °C) [21, 22].

Статистическая обработка полученных результатов проводилась традиционным способом при уровне значимости 5 % с использованием t-критерия Стьюдента.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Основываясь на литературных данных о предпочитаемых коллагеназой и избегаемых ею пептидных связях для гидролиза [9, 17-19], была составлена таблица, в которой приведены абсолютные и относительные значения, а также соотношение предпочитаемых и избегаемых связей для гидролиза.

Установлено, что только коллаген (отношение предпочитаемых и избегаемых связей составляет 6.1) с высокой скоростью гидролизует коллагеназой. Снижение каталитической способности по отношению к коллагену иммобилизованного фермента по сравнению со свободным, вероятно, связано со стерическими ограничениями доступа высокомолекулярных субстратов (белков) к активному центру коллагеназы, обусловленными матрицей хитозана.

Низкая каталитическая способность нативной и иммобилизованной на матрице хитозана коллагеназы была выявлена к остальным белкам: бычьему сывороточному альбумину (отношение предпочитаемых и избегаемых связей – 1.2), липазе (1.4), гемоглобину (2.3), каталазе (0.9), казеину молока (3.1), амилазе (0.9), яичному альбумину (1.0), цитохрому с (2.0), фосфатазе (1.8) и сывороточному альбумину человека (1.0) (рис.1, табл. 1).

Анализируя данные рисунка и таблицы, можно сделать вывод о том, что уровень активности коллагеназы по отношению к тому или иному субстрату связан с соотношением предпочитаемых для гидролиза и избегаемых пептидных связей. Чем выше процентное содержание предпочитаемых и ниже количество избегаемых связей в субстрате, тем выше активность фермента по отношению к нему. Снижение каталитической способности иммобилизованной коллагеназы по

Таблица 1.

Количество предпочитаемых и избегаемых пептидных связей для гидролиза коллагеназой

Субстрат	Предпочитаемые аминокислотные остатки и пептидные связи			Избегаемые аминокислотные остатки	Отношение предпочитаемых аминокислотных остатков к избегаемым
	Пролин	Лейцин-глицин	Сумма, абсолют. / %	Аргинин, абсолют. / %	
Бычий сывороточный альбумин [<i>Bos taurus</i>] 607 aa GenBank: CAA76847.1	28	3	31 / 5.0	26 / 4.0	1.2
Липаза [<i>Sus scrofa</i>] 465 aa GenBank: ADD71520.1	25	4	29 / 6.0	21 / 4.5	1.4
Казеин молока [<i>Bos taurus</i>] 214 aa GenBank: ACG63494.1	17	2	19 / 9.0	6 / 2.8	3.1
Амилаза [<i>Sus scrofa</i>] 511 aa GenBank: AAF02828.1	21	3	24 / 5.0	28 / 5.5	0.9
Фосфатаза [<i>Bos taurus</i>] 533 aa GenBank: AAA30571.1	31	4	35 / 6.5	20 / 4.0	1.8
Гемоглобин [<i>Homo sapiens</i>] 574 aa PDB: 1S14_A PDB: 1S14_B PDB: 1S14_C PDB: 1S14_D	26	6	32 / 5.5	14 / 2.0	2.3
Яичный альбумин [<i>Gallus gallus</i>] 386 aa GenBank: AAB59956.1	14	1	15 / 4.0	15 / 4.0	1.0
Цитохром с [<i>Homo sapiens</i>] 105 aa NCBI Reference Sequence: NP_061820.1	4	0	4 / 4.0	2 / 2.0	2.0
Сывороточный альбумин человека [<i>Homo sapiens</i>] 609 aa GenBank: AAN17825.1	24	4	28 / 4.5	28 / 4.5	1.0
Каталаза [<i>Bos taurus</i>] 527 aa NCBI Reference Sequence: NP_001030463.1	28	1	29 / 5.5	32 / 6.0	0.9
Коллаген [<i>Homo sapiens</i>] 1678 aa GenBank: BAA04809.1	275	16	291 / 17.0	47 / 2.8	6.1

Аминокислотные последовательности субстратов были взяты из базы данных NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)

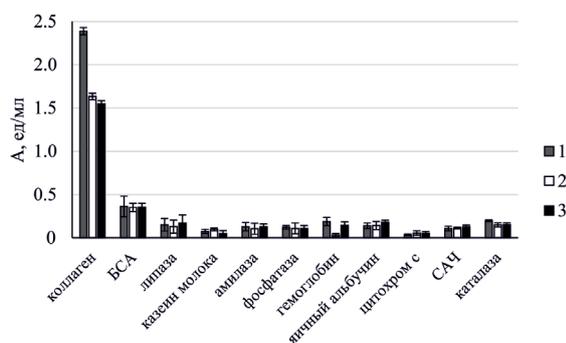


Рис. 1. Каталитическая активность (ед/мл) коллагеназы по отношению к различным белкам, где 1 – растворимая коллагеназа, 2 – коллагеназа, иммобилизованная на среднемолекулярном хитозане, 3 – коллагеназа, иммобилизованная на высокомолекулярном хитозане

сравнению со свободной, вероятно, связано со стерическими ограничениями доступа высокомолекулярных субстратов (белков) к её активному центру, обусловленными матрицей хитозана. Полученные сведения о субстратной специфичности коллагеназы в свободном и иммобилизованном

состояниях могут быть использованы при разработке новых фармакологических агентов и позволят с большей долей вероятности интерпретировать результаты клинических исследований.

Работа выполнена при финансовой поддержке в форме гранта Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых – докторов наук МД-1982.2020.4. Соглашение 075-15-2020-325.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Duarte A.S., Correia A., Esteves A.C. // *Critical Reviews in Microbiology*, Vol. 201442(1), pp. 106-126.
- Sekhon B.S., *Res Rep Biol*, 2010, Vol. 1, pp. 1-20.
- Howes J.M., Pugh N., Knäuper V., Farndale R.W., *J Thromb Haemost*, 2015, Vol. 13(12), pp. 2253-2259.
- Nezafat N., Negahdaripour M., Gholami A., Ghasemi Y., *Trends Pharm Sci*, 2015, Vol. 1(4), pp. 213-222.
- Ace B., *Afr J Microbiol Res*, 2012, Vol. 6, pp. 2373-2379.

6. Bond M.D., Wart HEV., Biochemistry (US), 1984, Vol. 23, 3085-3091.
7. Bosman F.T., Stamenkovic I., J Pathol, 2003, Vol. 200, pp. 423-428.
8. Charvolin J., Sadoc J.F., Interface Focus, 2012, Vol. 2, pp. 567-574.
9. Alipour H., Raz A., Zakeri S., Djadid N.D. // Asian Pac J Trop Biomed, 2016, Vol. 6(11), pp. 975-981.
10. Bauer R, Wilson JJ, Philominathan STL, Davis D, Matsushita O, Sakon J. // J Bacteriol, 2013, Vol. 195(2), pp. 318-327.
11. Schlage P, Kockmann T, Kizhakkedathu J.N. // Proteomics, 2015, Vol. 15(14), pp. 2491-2502.
12. Prabakaran M., In: Ramawat K.G., Mérillon J.M., editors. Polysaccharides: bioactivity and biotechnology. Gewerbestrasse, Springer International Publishing, 2015, pp. 1609-1625.
13. Müller-Herrmann S, Scheibel T. // ACS Biomater Sci Eng, 2015, Vol.1(4), pp. 247-259.
14. Maimets M., Bron R., de Haan G., van Os R., Coppes R.P. // Radiother Oncol, 2015, Vol. 116(3), pp. 443-448.
15. Tuohetahunttila M., Spee B., Kruitwagen H.S., Wubbolts R., Brouwers J.F., van de Lest C.H., Molenaar M.R., Houweling M., Bernd Helms J., Vaandrager A.B. // Biochim Biophys Acta, 2015, Vol. 1851(2), pp. 220-230.
16. Huch M., Gehart H., van Boxtel R., Hamer K., Blokzijl F., Versteegen M.M., et al. // Cell, 2015, Vol. 160(1-2), pp. 299-312.
17. Peak T.C., Mitchell G.C., Yafi F.A., Hellstrom W.J. // Biologics, 2015, Vol. 9, pp. 107-116.
18. Nanchahal J., Midwood K.S., Patent US № 9138458 B2, 2015.
19. Мосолов В.В., Протеолитические ферменты. Москва, Наука, 1971, 404 с.
20. Королева В.А., Холявка М.Г., Сазыкина С.М., Ольшанникова С.С., Артюхов В.Г. // Вестник Воронежского Государственного Университета. Серия: Химия. Биология. Фармация. 2015. № 4. С. 85-89.
21. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. // J. Biol. Chem., 1951 Vol. 19, pp. 265-275.
22. Королева В.А., Холявка М.Г., Артюхов В.Г. // Вестник Воронежского Государственного Университета. Серия: Химия. Биология. Фармация. 2020. № 4. С. 50-56.

Воронежский государственный медицинский университет им. Н.Н. Бурденко

**Королева В. А., ассистент кафедры биологии
E-mail: koroleva_victoria@bk.ru*

*Воронежский государственный университет
Беляева Т. Н., магистрант 2 года обучения кафедры биофизики и биотехнологии*

*Холявка М. Г., доктор биологических наук, доцент кафедры биофизики и биотехнологии, профессор кафедры «Физика», Севастопольский государственный университет
E-mail: holyavka@rambler.ru*

*Артюхов В. Г., доктор биологических наук, профессор, зав. кафедрой биофизики и биотехнологии
E-mail: artyukhov@bio.vsu.ru*

*Voronezh State Medical University N.N. Burdenko
Koroleva V. A., Assistant Professor, Department of Biology

E-mail: koroleva_victoria@bk.ru

*Voronezh State University, Voronezh
Belyaeva T. N. student., Department of Biophysics and Biotechnology*

*Holyavka M. G., PhD., DSci., Associate Professor, dept. Biophysics and Biotechnology; Full Professor of Physics Department, Sevastopol State University
E-mail: holyavka@rambler.ru*

*Artyukhov V. G., PhD., DSci., Full Professor, Head of the Department of Biophysics and Biotechnology
E-mail: artyukhov@bio.vsu.ru*

ESTIMATION OF SUBSTRATE SPECIFICITY OF FREE AND IMMOBILIZED ON A CHITOSAN MATRIX COLLAGENASE

V. A. Koroleva¹, T. N. Belyaeva², M. G. Holyavka^{2,3}, V. G. Artyukhov²

1 - Voronezh State Medical University after N.N. Burdenko

2 - Voronezh State University

3 - Sevastopol State University

Abstract. Bacterial collagenases are metalloproteinases involved in the degradation of the extracellular matrix of animal cells due to their ability to hydrolyze a native collagen. Pathogenic microorganisms (mainly *Clostridium histolyticum*), known as producers of microbial collagenase, can break down each collagen polypeptide chain into several sites. They are known to act as an exotoxin and disrupt connective tissue metabolism by hydrolysis of collagen in cells. Collagen is a major protein in the extracellular matrix of tissues such as tendons, skin, cartilage and blood vessels, and an organic component of teeth, bones and cornea. Collagenases are often used to isolate cells from tissues in medical research. These enzymes have been used successfully to remove and move cells from the pancreas. Collagenase is now being considered a medicine and it is likely to replace some invasive treatments for diseases in which excessive collagen deposition causes physiological dysfunction. Collagenase hydrolyzes native collagen, denatured collagen and gelatin. The enzyme carries out proteolysis at the peptide bonds of proline and hydroxyproline residues.

In this work, the substrate specificity of collagenase with respect to the following substrates was studied: bovine serum albumin (BSA), lipase from the pancreas, α 1-casein of milk, α -amylase from the pancreas, phosphatase, hemoglobin, ovalbumin, cytochrome c, serum albumin human (HSA), catalase, collagen. The enzyme activity was determined by the Lowry method (by the difference between the protein content in the substrate solution without and with 30 minutes incubation with the enzyme at 37 °C). It has been found that only collagen is hydrolyzed by collagenase at a high rate. In relation to other proteins (bovine serum albumin, lipase, hemoglobin, catalase, milk casein, amylase, ovalbumin, cytochrome c, phosphatase, and human serum albumin), a low catalytic ability of native collagenase and collagenase immobilized on the chitosan matrix was revealed. A decrease in the protease activity of immobilized collagenase as compared to free collagenase is probably associated with steric restrictions on the access of high molecular weight substrates (proteins) to the active center of the enzyme, caused by the chitosan matrix.

Keywords: collagenase, chitosan, immobilization, substrate specificity

REFERENCES

1. Duarte A.S., Correia A., Esteves A.C., Critical Reviews in Microbiology, Vol. 201442(1), pp. 106-126.
2. Sekhon B.S., Res Rep Biol, 2010, Vol. 1, pp. 1-20.
3. Howes J.M., Pugh N., Knäuper V., Farndale R.W., J Thromb Haemost, 2015, Vol. 13(12), pp. 2253-2259.
4. Nezafat N., Negahdaripour M., Gholami A., Ghasemi Y., Trends Pharm Sci, 2015, Vol. 1(4), pp. 213-222.
5. Ace B., Afr J Microbiol Res, 2012, Vol. 6, pp. 2373-2379.
6. Bond M.D., Wart HEV., Biochemistry (US), 1984, Vol. 23, 3085-3091.
7. Bosman F.T., Stamenkovic I., J Pathol, 2003, Vol. 200, pp. 423-428.
8. Charvolin J., Sadoc J.F., Interface Focus, 2012, Vol. 2, pp. 567-574.
9. Alipour H., Raz A., Zakeri S., Djadid N.D., Asian Pac J Trop Biomed, 2016, Vol. 6(11), pp. 975-981.
10. Bauer R, Wilson JJ, Philominathan STL, Davis D, Matsushita O, Sakon J., J Bacteriol, 2013, Vol. 195(2), pp. 318-327.
11. Schlage P, Kockmann T, Kizhakkedathu J.N., Proteomics, 2015, Vol. 15(14), pp. 2491-2502.
12. Prabakaran M., In: Ramawat KG, Mérillon JM, editors. Polysaccharides: bioactivity and biotechnology. Gewerbestrasse, Springer International Publishing, 2015, pp. 1609-1625
13. Müller-Herrmann S, Scheibel T., ACS Biomater Sci Eng, 2015, Vol.1(4), pp. 247-259.
14. Maimets M., Bron R., de Haan G., van Os R., Coppes R.P., Radiother Oncol, 2015, Vol. 116(3), pp. 443-448.
15. Tuohetahunttila M., Spee B., Kruitwagen H.S., Wubbolts R., Brouwers J.F., van de Lest C.H., Molenaar M.R., Houweling M., Bernd Helms J.,

Vaandrager A.B., *Biochim Biophys Acta*, 2015, Vol. 1851(2), pp. 220-230.

16. Huch M., Gehart H., van Boxtel R., Hamer K., Blokzijl F., Verstegen M.M., et al., *Cell*, 2015, Vol. 160(1-2), pp. 299-312.

17. Peak T.C., Mitchell G.C., Yafi F.A., Hellstrom W.J., *Biologics*, 2015, Vol. 9, pp. 107-116.

18. Nanchahal J., Midwood K.S., Patent US no. 9138458 B2, 2015.

19. Mosolov V.V., *Proteoliticheskie fermenty*. Moskva, Nauka, 1971, 404 s.

20. Koroleva V.A., Holyavka M.G., Sazykina S.M., Olshannikova S.S., Artyuhov V.G., *Proceedings Voronezh State University. Series: Chemistry. Biology. Pharmacy*, 2015, Vol. 4, pp. 85-89.

21. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J., *J. Biol. Chem.*, 1951 Vol. 19, pp. 265-275.

22. Koroleva V.A., Holyavka M.G., Artyuhov V.G., *Proceedings Voronezh State University. Series: Chemistry. Biology. Pharmacy*, 2020, Vol. 4, pp. 50-56.