

## СИСТЕМНАЯ КРАСНАЯ ВОЛЧАНКА: АНАЛИЗ ВОЗМОЖНОЙ ЛОКАЛИЗАЦИИ АКТИВНЫХ ЦЕНТРОВ В БЕЛКОВОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ МОНОКЛОНАЛЬНОЙ ЛЕГКОЙ ЦЕПИ (NGTA1-Me-pro) С ДВУМЯ МЕТАЛЛОПРОТЕАЗНЫМИ АКТИВНОСТЯМИ

© 2019 г. А. М. Тимофеева, Г. А. Невинский\*

\*E-mail: nevinsky@niboch.nsc.ru

*Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения  
Российской академии наук, Новосибирск, Россия*

Поступила: 13.03.2018. Принята: 25.08.2019

Ранее было показано, что моноклональные легкие цепи (МЛЦ), соответствующие фагемидной библиотеке рекомбинантных легких цепей иммуноглобулинов лимфоцитов периферической крови пациентов с системной красной волчанкой (СКВ) специфически гидролизуют основной белок миелина (ОБМ). Препараты одной из легких цепей (NGTA1-Me-pro) демонстрировали два оптимальных значения pH, две оптимальные концентрации ионов металлов и два значения  $K_m$  для ОБМ. Два протеазных активных центра NGTA1-Me-pro были металл-зависимыми. В данной работе впервые проведен анализ гомологии белковой последовательности NGTA1-Me-pro с таковыми для нескольких классических  $Zn^{2+}$ - и  $Ca^{2+}$ -зависимых, а также сериновых протеаз человека. Проведенный анализ позволил выявить белковые последовательности NGTA1-Me-pro, ответственные за связывание ОБМ, хелатирование ионов металлов и непосредственно катализ. Полученные данные обобщены с помощью гипотетических моделей структуры двух активных центров легкой цепи антител.

**Ключевые слова:** системная красная волчанка, моноклональные легкие цепи, протеолитическая активность, активные центры абзимов

**Принятые сокращения:** АТ, антитела; АК, аминокислота; АИЗ, аутоиммунное заболевание; ОБМ, основной белок миелина; МЛЦ, моноклональная легкая цепь; ММР, металлопротеаза; СКВ, системная красная волчанка; ЭДТА, этилендиаминтетраацетат; PMSF, фенилметилсульфонил фторид

DOI: 10.31857/S102872210007037-5

Адрес: 630090 Новосибирск, пр. Лаврентьева, 8, Институт химической биологии и фундаментальной медицины, Невинский Георгий Александрович. Тел. / факс: 007(383)3333–677.

E-mail: nevinsky@niboch.nsc.ru

**Авторы:**

**Тимофеева А. М.**, к.б.н., младший научный сотрудник лаборатории ферментов репарации Института химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения РАН, Новосибирск, Россия;

**Невинский Г. А.**, д.х.н., профессор, главный научный сотрудник, зав. лабораторией ферментов репарации Института химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения РАН, Новосибирск, Россия.

### ВВЕДЕНИЕ

Большое число иммуноглобулинов против химически стабильных аналогов переходных

состояний химических реакций, а также природных антител с каталитическими активностями (абзимов) хорошо описаны в литературе (для обзора см. [1–6]). IgG и/или IgA и IgM антитела, гидролизующие ДНК, РНК, АТФ, полисахариды, пептиды и белки были выделены из крови пациентов с различными аутоиммунными заболеваниями (АИЗ): СКВ, тиреоидит Хашимото, полиартрит, рассеянный склероз, лимфопролиферативные заболевания, полиневриты, злокачественные опухоли, а также при трех вирусных заболеваниях — вирусном гепатите, клещевом энцефалите и иммунодефиците человека ([1–6] и ссылки в них). В то же время, АТ из крови здоровых доноров, а также рядом других заболева-

ний, протекающих без существенных нарушений иммунного статуса, не проявляли заметной каталитической активности [1–6]. Выявление достоверно тестируемых каталитических активностей абзимов возможно на самых ранних стадиях развития различных АИЗ, когда другие иммунологические, биохимические и медицинские показатели этих заболеваний еще статистически достоверно не отличаются от этих показателей для здоровых доноров. Показано, что относительный уровень каталитической активности абзимов может быть использован как для ранней диагностики различного рода АИЗ, так и оценки глубины протекания аутоиммунных процессов [1–6].

Системная красная волчанка (СКВ) является системным аутоиммунным заболеванием, характеризующимся дезорганизацией соединительных тканей, включая повреждения кожи и висцеральных капилляров [7]. К настоящему времени из крови пациентов с СКВ выделены и описаны поликлональные IgG и/или IgA, IgM, гидролизующие ДНК, РНК [8–11], основной белок миелина [12–15] и полисахариды [16–19].

Для получения моноклональных легких цепей (МЛЦ) с ДНКазной и ОБМ-гидролизующей активностями нами была использована библиотека кДНК каппа легких цепей антител периферической крови трех больных СКВ ( $10^6$  вариантов различных легких цепей), которую клонировали в вектор pSANTAB5His6 с помощью стандартных методов [20–23]. Препараты фаговых частиц были получены с использованием *E. coli* TG1 [20–23]. Фаговые частицы, содержащие МЛЦ с различным сродством к ДНК, были разделены хроматографией на ДНК-целлюлозе [24, 25], а к ОБМ – на ОБМ-сефарозе [26, 27]. Было показано, что как минимум 15 из 45 индивидуальных колоний (~ 33%), элюированных с ДНК-целлюлозы 0.5 М NaCl, способны эффективно гидролизовать ДНК [24, 25]. В случае фаговых частиц, элюированных с этого сорбента кислым буфером было выбрано 33 из 687 отдельных колоний. Девятнадцать из 33 клонов (58%) проявили ДНКазную активность [24]. Все 34 гомогенных препарата МЛЦ, выделенные из фагов соответствующих колоний, были активны в гидролизе ДНК, в то время как 30 контрольных препаратов МЛЦ ее не гидролизовали. Все 34 препарата МЛЦ демонстрировали очень индивидуальные зависимости от концентрации ионов металлов и оптимальные концентрации NaCl и KCl, а также различные оптимумы pH [24, 25].

Сродство МЛЦ к ДНК было примерно на 2–3 порядка выше, чем сродство к ДНКазе I.

Фаговые частицы, элюированные с ОБМ-сефарозы с помощью 0.5 М NaCl также были использованы для получения других индивидуальных колоний [26]. В целом, из 440 индивидуальных колоний случайным образом было выбрано 72 колонии. Из 72 колоний 25 (~35%) обладали ОБМ-гидролизующей активностью. Все 25 препаратов электрофоретически гомогенных МЛЦ, соответствующие этим колониям, также эффективно гидролизовали ОБМ. Было показано, что 13 из 23 препаратов МЛЦ являются металлопротеазами; их активность не подавляется PMSF, но сильно ингибируется ЭДТА [26]. Четыре МЛЦ оказались сериновыми протеазами; PMSF подавлял их активность, но не было заметного эффекта ЭДТА. Эффекты PMSF и ЭДТА в случае трех МЛЦ были сопоставимыми: ~40% и 40–60%, соответственно. Совершенно необычными оказались свойства трех других остальных МЛЦ; ЭДТА и PMSF не снижали активности этих препаратов. Эти три МЛЦ оказались тиоловыми протеазами. Все 23 препарата МЛЦ эффективно гидролизовали ОБМ при разных pH оптимумах реакционной среды [26].

Более подробно был проанализирован один препарат МЛЦ с номером 24 [27]. NGTA1-Me-pro (МЛЦ-24) легкая цепь была типичной металлопротеазой; ее активность эффективно ингибировалась только ЭДТА [27]. МЛЦ-24 имела два разных очень хорошо выраженных pH оптимума при pH 6.0 и 8.5. Кроме того, при pH = 6.0 МЛЦ-24 оптимальная концентрация CaCl<sub>2</sub> равна ~6 мМ, а при pH 8.5 – 0,7 мМ. Кажущиеся значения  $K_m$  для ОБМ и  $k_{cat}$  в присутствии CaCl<sub>2</sub> в оптимальной концентрации при pH 6.0 ( $20 \pm 2$  мкМ;  $0.22 \pm 0.02$  мин<sup>-1</sup>), а при pH 8.5 ( $40 \pm 3$  мкМ;  $0.07 \pm 0.005$  мин<sup>-1</sup>) были разными. Все полученные данные однозначно свидетельствовали о том, что NGTA1-Me-pro (МЛЦ-24) имеет два независимых металл-зависимых активных центра [27].

В работах [26, 27] впервые показано, что легкие цепи антител могут содержать от одного до двух (и даже трех) активных центров и катализировать реакции гидролиза ОБМ как протеазы зависимые и независимые от ионов металлов. Эти данные указывали на то, что они могут иметь активные центры в той или иной мере подобные классическим протеазам. Учитывая это, в данной работе впервые проведен анализ белковой последовательности одной из этих МЛЦ

(NGTA1-Me-pro), гомологии ее последовательности с таковыми для различных пептидаз с целью выявления последовательностей подобным таковым для канонических металлопротеаз.

## МЕТОДЫ

### Получение и анализ моноклональных легких цепей

В работе использована фаговая библиотека кДНК рекомбинантных легких цепей к-типа больших СКВ описанная ранее [21]. Амплификацию фага VCSM13 и фракционирование фаговых частиц на ОБМ-сефарозе и получение индивидуальных колоний проводили согласно [21]. Препаративную наработку фаговых частиц, соответствующих отдельным клонам, а также получение гомогенных препаратов моноклональных легких цепей проводили согласно [26, 27].

### ДНК и белковые последовательности NGTA1-Me-pro

Определение нуклеотидной последовательности, соответствующей NGTA1-Me-pro, проводили с использованием полимеразной цепной реакции с использованием праймеров M13 (5'-GGAAACAGCTATGACCATG-3') и FdSeq1 (5'-GAATTTTCTGTATGAGG-3') согласно [21]. Определение нуклеотидных последовательностей VL-фрагментов ДНК проводили с использованием автоматического анализатора ДНК SEQTM 2000XL (Beckman) и специального набора «F»SEQDTCS. Нуклеотидные последовательности и соответствующие аминокислотные

(АК) последовательности МЛЦ анализировали с использованием базовых данных IgBLAST и V-base. Нуклеотидная последовательность рекомбинантной МЛЦ была представлена в Gen Bank (gb-admin@ncbi.nlm.nih.gov): NGTA1.sqn NGTA1-Me-pro KP096221. Гомологию полных последовательностей МЛЦ и канонических металлопротеаз человека анализировали с использованием lalign ([http://www.ch.embnet.org/software/LALIGN\\_form.html](http://www.ch.embnet.org/software/LALIGN_form.html)) и ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>). Анализ типа генов, соответствующих МЛЦ проводили с использованием сервера BLASTN2.2.27+ (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/igblast.cgi>). Сравнение последовательностей ДНК МЛЦ-24 с другими легкими цепями, приведенными в базе данных, показало совпадение с зародышевым VL геном легких цепей IGLV8-61\*01, IGLV8-61\*02, and IGLV8-61\*03 (90.0% идентичности).

## РЕЗУЛЬТАТЫ

### Нуклеотидная и аминокислотная последовательности МЛЦ-24

Была определена нуклеотидная и соответствующей ей аминокислотная последовательность NGTA1-Me-pro (рис. 1). Эти последовательности соответствуют VL генам различных легких цепей (90% идентичности; см. выше).

Интересно, что только одни и те же белки (и ферменты) разных млекопитающих демонстрируют высокий уровень гомологии (70–95%). Сначала был проведен анализ общей гомоло-

## А ДНК последовательность NGTA1-Me-pro

```
ATGCGGCCGCACATCATCATCACCATCACGGGGCCGCAGAA CA AAAA ACTCATCTCA GAAGAGGATCATGGGGCCGCA
TAGACTGTTGAAAGTTGTTC AAAACC TCATACAGAAAATTCATTTACTAACGTCTGGAAAGACGACAAAACCTATCGG
TTACGCTAACATATGAGGGCTGTCTGTGGAATGCTACAGGCGTTGTGGTTTGTA CTGGTGACGAAACTCAGTGTACCG
GTACATGGGTTCCTATTTGGGCTTGCTATCCCTGAAAA TGAGGGTGGTGGCTCTGAGGGTGCCGGTTCTGAGGGTGGC
GGTAAGAAAAACCGTACGGGTACACCTATTCGGGGCTATCTATATCAACCCCTCTCGACGGCCTTATCCGCCTGGT
ACGCAAAACCCCGCTAATCCTAATCCCTCTCTGGAGTCTCAGCCTCTTAATACCTTTATGTTTTCAGAAATAAGTTCCG
AAAGCAGGGTGCATTAACGTGTTATACGGGCATGTTACTCAAGGCACTGACCCCGTTAAAACCTATTACCAGTACAC
TCCTGTATCATCAAAAGCCATGTATGACGCTTACTGGAAACGGTAAATTCAGAGACTGCGCTTTCATTTCTGGCTTTA
ATGAGGATCCCATTCGGTTTGTGAAATTTGAGGCCAAATCGTCTGACCTGCCCTCAACCCCTCTGTCAATGCTGGCGG
CGGGCTCTGGGTGGGTGGTTTCTGGGTGGCGGC
```

## Б Белковая последовательность NGTA1-Me-pro

```
1- MRPННТТТGPQNKNSSQKRIMGPHRLLKVVQNLIQKIHLLTSGKTTKLIVTLTMRA -58
59- VCGMLQALWVFLVTKLSVTVHGFLGLLSLKMRVVALRVAVLRVAVRKTIVRY -110
111- TYSGLYLYQPSRRHLSAWYAKPRSSFSGVSASYFHVSEVPKAGCINCLYGH -161
162- VTQG TDPVKTYTYQYTPVSSKAMYDAYWNGKFRDCAFHSGFNEDPIPFVKL -211
212 -EANRLTCPOPCOCWRRALGGWFLGGG -238
```

Рис. 1. ДНК (А) и белковая (Б) последовательности моноклональной легкой цепи NGTA1-Me-pro (МЛЦ-24).

гии между различными белками с одинаковыми ферментативными функциями. Оказалось, что уровень общей гомологии таких ферментов существенно ниже. Например, было рассчитано, что гомология (полное совпадение АК) между четырьмя сериновыми протеазами (трипсин, химо трипсин, трипсиноген и эластаза) варьирует от 34,4 до 41% идентичности АК (identity).

В литературе описаны человеческие  $Zn^{2+}$ - [28] и  $Ca^{2+}$ -зависимые протеазы [29]. В отличие от классических металлопротеаз, МЛЦ-24 не является ни  $Zn^{2+}$ -, ни  $Ca^{2+}$ -зависимым ферментом, поскольку активируется ионами различных металлов. Ее максимальная активность наблюдается в присутствии ионов  $Ca^{2+}$  (100%), а ионы других металлов активируют МЛЦ-24 не намного хуже (%):  $Mg^{2+}$  (65),  $Ni^{2+}$  (50),  $Co^{2+}$  (46),  $Zn^{2+}$  (45),  $Mn^{2+}$  (41),  $Cu^{2+}$  (36), то есть только в 1,5–2,8 раз [27]. Было не понятно с  $Zn^{2+}$ - или  $Ca^{2+}$ -зависимыми протеазами МЛЦ-24 имеет большее структурное сходство. Учитывая это, мы провели сравнение МЛЦ-24 с описанными в литературе  $Zn^{2+}$ - и  $Ca^{2+}$ -зависимыми протеазами.

Известны белковые последовательности тринадцати канонических человеческих металлопротеаз (ММР) [30]. Гомология ММР1 с другими двенадцатью ММР (ММР2, ММР3 ММР7-ММР12, ММР14, ММР24 и ММР25) варьирует в диапазоне 33,4–61,5% (identity). Кроме того, относительный уровень гомологии между несколькими парами ММР был ниже 32% идентичности: ММР2-ММР25 (31,3%), ММР9-ММР14 (31,4%), ММР9-ММР25 (30,6%) и ММР9-ММР24 (30,3%).

Число АК остатков девяти  $Ca^{2+}$ -зависимых протеаз (Calpains или CAPNs с номерами 1–3, 5–10) варьирует от 640 до 821 [29]. Максимальные величины идентичности и подобия (сходство в структуре) наблюдаются для (%): CAPN1-CAPN2 (63.0 и 87.1), CAPN2- CAPN8 (62.0 и 85.8), а также CAPN1- CAPN8: (59.0 и 83.2). В то же время минимальная идентичность и подобие выявлены для (%): CAPN2- CAPN7 (25.2 и 52.7), CAPN3- CAPN7 (24.9 и 51.1), CAPN7- CAPN10 (26.1 и 52.1), CAPN7- CAPN8 (26.3 и 52.9), CAPN1-CAPN7 (26.7 и 53.0) и CAPN7- CAPN9 (26.7 и 51.6). В целом уровень идентичности для девяти ферментов изменяется от 24.9 до 63%, а подобия от 51,1 до 87,1% (средние значения идентичности  $37,9 \pm 11$  и подобия  $63,2 \pm 10,8\%$ ).

Таким образом, общий уровень гомологии между разными ферментами с одинаковыми функциями может быть относительно низким.

Однако, уровень гомологии между отдельными фрагментами этих ферментов, формирующими их активные центры, обычно существенно выше.

Поскольку МЛЦ-24, обладающая металл-зависимой ОБМ-гидролизующей активностью, является типичной легкой цепью, ее последовательность должна сочетать в себе элементы белковых последовательностей, специфичных для V-генов легкой цепи и каких либо известных металлопротеаз. Принимая во внимание низкий уровень общей гомологии между различными ферментами с одинаковыми ферментативными функциями, было трудно ожидать высокого уровня гомологии между МЛЦ-24 и каноническими металлопротеазами. Гомология между NGTA1-Me-pro, обладающей двумя металл-зависимыми активными центрами, и 13 классическими человеческими металлопротеазами варьировала от 23,3 (ММР1) до 36,7% (ММР7). В целом, эти значения гомологии между МЛЦ-24 и металлопротеазами сопоставимы с таковыми для разных пар самих ММР.

Идентичность между NGTA1-Me-pro и девятью классическими человеческими кальций-зависимыми протеазами варьировала от 21,1 (CAPN9) до 25,6% (CAPN8), а подобие от 44.4 (CAPN1) до 50.2% (CAPN5). Все значения идентичности и подобия были сопоставимыми; среднее значения равны соответственно  $23.4 \pm 1.4$  и  $47.7 \pm 2.0$ . В целом, эти значения гомологии между МЛЦ-24 и металлопротеазами, а также МЛЦ-24 и  $Ca^{2+}$ -зависимыми протеазами сопоставимы с таковыми для разных пар самих ММР и CAPN.

Однако, очевидно, что для сравнения белковых последовательностей активных центров МЛЦ и классических протеаз важен не столько уровень их общей гомологии, сколько непосредственно последовательностей, важных для формирования их активных центров.

#### *Анализ возможного расположения в МЛЦ-24 двух сайтов связывания ОБМ*

МЛЦ-24 содержит 238 АК остатков. Однако, каталитические центры МЛЦ-24 могут быть расположены только в ее переменном участке, то есть примерно от 1 до 131 АК. Число АК остатков различных ММР варьирует от 267 до 707, а  $Ca^{2+}$ -зависимых протеаз от 640 до 821. Во всех ММР аминокислотные остатки, принимающие участие в катализе гидролиза белков, сформированы в виде относительно коротких кластеров, содер-

жащих 7–15 АК. В то же время в Ca<sup>2+</sup>-зависимых протеазах в первичной последовательности три важных для катализа АК (Cys (C), His (H) и Asn (N)), расположены на большом расстоянии друг от друга (от 177 до 229 АК) и сближаются только при формировании третичных структур этих ферментов. Учитывая длину варибельного участка МЛЦ-24 (131 АК) было понятно, что, скорее всего, формирование активных центров МЛЦ-24 может быть в большей степени сходным с таковым для различных ММР. Учитывая это, сначала был проведен анализ возможного подобия МЛЦ-24 с различными ММР.

Все известные человеческие ММР содержат три специфические последовательности, которые важны для связывания белковых субстратов (последовательность типа I), катализа гидролиза белков (последовательность типа II) и хелатирования ионов металлов (последовательность типа III) [28, 30–32]. На **рис. 2** показаны эти три последовательности (I–II), включая наиболее важные для распознавания ферментами субстрата центральные трипептиды, а также концевые АК остатки этих последовательностей (показаны жирным шрифтом). 15-мерные последовательности первого типа в случае различных ММР имеют очень разный уровень совпадения АК (identity), которая варьирует от 28.6 (ММР1–ММР3) до 92.3% (ММР1–ММР-11). Однако такой гомологии, вероятно, может быть достаточно, поскольку эти ММР распознают самые разные белки в основном за счет взаи-

модействия карбонильных групп С=О пептидных связей металлопротеаз с АК, гидролизуемых белков [28, 30–32]. По-видимому, для распознавания белковых субстратов металлопротеазами более важна пространственная структура этих глобулярных молекул и относительное расположение в сайтах ферментов различных АК, ответственных за узнавание субстратов.

Как было показано ранее, МЛЦ-24 имеет два металл-зависимых активных центра [27]. Сравнение белковой последовательности МЛЦ-24 с тринадцатью ММР было проведено с использованием программы LALIGN. Было проанализировано по пять возможных вариантов гомологии (пять выравниваний) для каждой 15-звенной последовательности тринадцати ММР с полной последовательностью МЛЦ-24. На **рис. 3** приведены некоторые примеры анализа гомологии отдельных последовательностей МЛЦ-24 с последовательностями металлопротеаз. Полное совпадение аминокислот этих последовательностей обозначено двоеточием (identity), а АК, имеющих близкие структурные свойства (подобия, similar) – точкой. В последовательности МЛЦ-24 найдено всего два фрагмента, имеющих гомологию с последовательностями тринадцати ММР, ответственными за связывание белкового субстрата. При этом эти последовательности восьми из тринадцати ММР были гомологичны одной из последовательностей МЛЦ-24: 15-KNSSQKRIMGPHRL-29 (**рис. 3А**). Уровень идентичности АК МЛЦ-24 с некоторыми

	I	II	III
MMP1	<b>S</b> pf <del>d</del> gp <b>GGN</b> lahaf <b>Q</b>	- DEDERWT	- <b>Helg</b> H slgls <b>H</b>
MMP2	<b>Y</b> pf <del>d</del> gk <b>DGL</b> lahaf <b>A</b>	- DDDELWT	- <b>Hefg</b> Hamgle <b>H</b>
MMP3	<b>E</b> adimi <b>SFA</b> vrehg <b>D</b>	- DDDEQWT	- <b>Heig</b> H slglf <b>H</b>
MMP7	<b>Y</b> pf <del>d</del> gp <b>GNT</b> lahaf <b>A</b>	- DEDERWT	- <b>Helg</b> Hslgm <b>H</b>
MMP8	<b>S</b> pf <del>d</del> gp <b>NGI</b> lahaf <b>Q</b>	- DAEETWT	- <b>Hefg</b> Hslgla <b>H</b>
MMP9	<b>Y</b> stct <b>s EGR</b> gdgrl <b>W</b>	- DDDELWS	- <b>Hefg</b> Halgld <b>H</b>
MMP10	<b>Y</b> sf <del>d</del> gp <b>GHS</b> lahay <b>P</b>	- DDDEKWT	- <b>Helg</b> Hslglf <b>H</b>
MMP11	<b>L</b> pf <del>d</del> gp <b>GGI</b> lahaf <b>F</b>	- DYDETWT	- <b>Hefg</b> Hvlg <b>lq</b> <b>H</b>
MMP12	<b>H</b> af <del>d</del> gk <b>GGI</b> lahaf <b>G</b>	- DEDEFWT	- <b>Heig</b> Hslglg <b>H</b>
MMP13	<b>Y</b> pf <del>d</del> gp <b>SGL</b> lahaf <b>P</b>	- DDDETWT	- <b>Hefg</b> H slgld <b>H</b>
MMP14	<b>D</b> geggf <b>LAH</b> ayfpg <b>P</b>	- DSAEPWT	- <b>Helg</b> Halgle <b>H</b>
MMP24	<b>D</b> geggf <b>LAH</b> ayfpg <b>P</b>	- DSDEPWT	- <b>Helg</b> Halgle <b>H</b>
MMP25	<b>Y</b> pf <del>d</del> gl <b>GGT</b> lahaf <b>F</b>	- DDEETWT	- <b>Hefg</b> Halglg <b>H</b>

**Рис. 2.** Три специфических фрагмента белковых последовательностей тринадцати человеческих металлопротеаз, которые важны для связывания белковых субстратов (последовательность типа I), катализа реакции гидролиза белкового субстрата (последовательность типа II) и хелатирования ионов металлов (последовательность типа III).

**А** Первый вариант гомологии последовательностей МЛЦ и MMP

МЛЦ	VHGF	(50.0% identity, 100.0% similar)
	...:	
MMP1	ANAF	(GGN; SPFDGPGGNLAHAFAQ)
МЛЦ	KLSVTVHGF	(33.3% identity, 77.8% similar)
	: . . . .:	
MMP2	KDGLLAHAF	(DGL, YPFDGKDGLLAHAFA)
МЛЦ	VLVTKLSVTVHG	(25.0% identity, 75.0% similar)
	. . . . .: :	
MMP3	IMIS-FAVREHG	(SFA, EADIMISFAVREHG)
МЛЦ	YTYSG	(50% identity, 83.3% similar)
	: . .:	
MMP7	YPFDG	(GNT, YPFDGPGNTLAHAFA)
МЛЦ	GPHRLL	(50.0% identity, 83.3% similar)
	:: .:	
MMP11	GPGGIL	(GGI, LPFDGPGGILAHAF)
МЛЦ	KLSVTVHGF	(38.9% identity, 55.6% similar)
	: . . . .:	
MMP12	KGGILAHAF	(GGI, HAFDGKGGILAHAF)
МЛЦ	HLSAWYAKP	(28.6% identity, 85.7% similar)
	: . . . :	
MMP14	H--AYFPGP	(LAH, DGEggFLAHAYFPGP)
МЛЦ	VHGFLLG	(28.6% identity, 85.7% similar)
	. . . . .:	
MMP24	ANAYFPGP	(LAH, DGEggFLAHAYFPGP)
МЛЦ	LSVTV HGF	(44.4 identity, 77.8% similar)
	: . . . .:	
MMP25	LGGTLAHAF	(GGT, YPFDGLGGTLAHAF)

**Б** Второй вариант гомологии последовательностей МЛЦ и MMP

МЛЦ	GPHRLL	(50.0% identity, 83.3% similar)
	:: .:	
MMP8	GPNGIL	(NGI, SPFDGPGNGILAHAFQ)
МЛЦ	SSQKRIMGPHRL	(41.7% identity, 58.3% similar)
	. . . : : :	
MMP9	TSEGR--GDGRL	(EGR. YSTCTSEGRGDGRLW)
МЛЦ	TITGP	(66.7% identity, 66.7% similar)
	. . .:	
MMP10	SFDGP	(GHS, YSFDGPGHSLAHAYP)
МЛЦ	SVTVHGF	(50.0% identity, 66.7% similar)
	. . . .:	
MMP11	GILAHAF	(GG, LPFDGPGGILAHAF)
МЛЦ	GPHRLL	(66.7% identity, 66.7% similar)
	:: .:	
MMP13	GPSGLL	(SFA, E adimiSFAvrehgD)

Рис. 3. Данные по анализу гомологии фрагментов различных MMP, ответственных за узнавание белковых субстратов, с полной белковой последовательностью МЛЦ-24. В последовательности МЛЦ-24 обнаружено только два фрагмента, имеющих гомологию с белок-связывающими кластерами различных MMP. Аминокислоты, идентичные (identity) между двумя парами последовательностей, отмечены двоеточием, тогда как разные АК с сильно и умеренно сходными свойствами (similar)—точкой (А и Б). Локализация этих сайтов в последовательности МЛЦ-24 показана на рис. 3В.

## Гомология последовательностей сайтов связывания белков различными MMP с двумя фрагментами последовательности МЛЦ

1-MRPHITITGPQNKNSSQKRIMGPHRLLKVVQNLIQKIHLLTSGKT  
TKLIVTLTMRAVCGMLQALWFVLVTKLSVTVHGFLLGLLSLKMRVVALR  
VAVLRVAVRKTVRYTYSGLYLYOPSRRLHLSAWYAK-131

**А** Гомология первого МЛЦ каталитического сайта с таковыми для MMP

MLCH1	HLS---AW	(25.0% identity, 62.5% similar)
	:... .:	Специфическая последовательность сайта гидролиза
MMP11	HFDYDETW	(DYDETWT)
МЛЦ	HLS---AW	(25.0% identity, 62.5% similar)
	:... .:	
MMP11	HFDYDETW	(DEDEFWT)
МЛЦ	HLSA---W	(25.0% identity, 50.0% similar)
	:... :	
MMP12	HFDEDEFW	(DEDEFWT)
МЛЦ	HL-SA- W	(50.0% identity, 62.5% similar)
	.. :: :	
MMP14	HFDSAEPW	(DSAEPWT)
МЛЦ	HL-S- AW	(37.5% identity, 50.0% similar)
	.. : :	
MMP24	HFDSDEPW	(DSEEPWT)
МЛЦ	HLS---AW	(25.0% identity, 62.5% similar)
	:... .:	
MMP25	HFDDEETW	(DDEETWT)

**Б** Гомология второго МЛЦ каталитического сайта с таковыми для MMP

МЛЦ	QALWFVLVTK	(40.0% identity, 40.0% similar)
	: : ::	
MMP3	Q--W----TK	(DDDEQWT)
МЛЦ	QALW	(25.0% identity, 50.0% similar)
	. :	
MMP8	EETW	(DAEETWT)
МЛЦ	WFV	(33.3% identity, 66.7% similar)
	: .	
MMP11	WTI	(DYDETWT)
MLCH1	WFV	(66.7% identity, 66.7% similar)
	: :	
MMP14	WTV	(DSAEPWT)
МЛЦ	WFVL	(50.0% identity, 75.0% similar)
	: .:	
MMP24	W-TL	(DSEEPWT)
МЛЦ	QALW-F	(33.3% identity, 50.0% similar)
	. : :	
MMP25	EETWTF	(DDEETWT)

**В** Два гипотетических МЛЦ 7-звенных сайта катализа гидролиза ОБМ выделены крупным шрифтом

**1-MRPHIIITITGPQKNSSQKRIMGPHRLKVVQNLIQKIHLLTSGKTTKLIVTLTMRAVCG-MLQALWF-VL-70**  
**71- VTKLSVTVHGFLGLLSLKMRRVVALRVAVLRVAVRKTVRTYTYGLYLYQPSR-RHLSAWY-AK-131**

Рис. 4. Данные по анализу гомологии фрагментов различных MMP, ответственных за катализ реакции гидролиза белков, с полной белковой последовательностью МЛЦ-24. В последовательности МЛЦ-24 обнаружено только два фрагмента, имеющих гомологию с активными центрами различных MMP. Аминокислоты, идентичные (identity) между двумя парами последовательностей, отмечены двоеточием, тогда как разные АК с сильно и умеренно сходными свойствами (similar) — точкой (А и Б). Локализация этих сайтов в последовательности МЛЦ-24 показана на рис. 4В.

**А** Гомология первого МЛЦ сайта хелатирования ионов металлов с сайтами MMP

МЛЦ	H- GFLLGL	(55.6% identity, 55.6% similar)
	: : :::	
MMP1	HELGHSLGL	<b>В</b> скобках сайт хелатирования ионов MMP (HELGHSLGLSH)
МЛЦ	H- GFLLGL	(55.6% identity, 55.6% similar)
	: : :::	
MMP3	HEIGHSLGL	(HEIGHSLGLH)
МЛЦ	H- GFLLGL	(44.4% identity, 55.6% similar)
	: : :::	
MMP7	HELGHSLGM	(HELGHSLGMGH)
МЛЦ	H -GFLLGL	(55.6% identity, 55.6% similar)
	: : :::	
MMP8	HEFGHSLGL	(HEFGHSLGLAH)
МЛЦ	H- GFLLGL	(55.6% identity, 55.6% similar)
	: : :::	
MMP10	HELGHSLGL	(HELGHSLGLFH)
МЛЦ	H- GFLLGL	(55.6% identity, 66.7% similar)
	: : ::::	
MMP11	HEFGHVLGL	(HEFGHVLGLQH)
МЛЦ	HGFLLG	(50.0% identity, 66.7% similar)
	... ::	
MMP12	HSLGLG	(HeighSslglgH)
МЛЦ	H- GFLLGL	(55.6% identity, 55.6% similar)
	: : :::	
MMP14	HELG-ALGL	(HELGHALGLEH)

**Б** Гомология второго сайта МЛЦ хелатирования ионов металлов с сайтами MMP

МЛЦ	YS-GLY	50.0% identity (83.3% similar)
	.. :::	
MMP3	HSLGLF	(HEIGHSLGLH)
МЛЦ	RYTYS-GL	(37.5% identity, 75.0% similar)
	.. .. ::	
MMP8	EFGHSLGL	(HEFGHSLGLAH)
МЛЦ	YS-GLY	(50.0% identity, 83.3% similar)
	.. :::	
MMP10	HSLGLF	(HELGHSLGLFH)
МЛЦ	RYTYS-GL	(37.5% identity, 75.0% similar)
	.. .. ::	
MMP13	EFGHSLGL	(HEFGHSLGLDH)
МЛЦ	H- GFLLGL	(55.6% identity, 55.6% similar)
	: : :::	
MMP24	HELG-ALGL	(HELGHALGLEH)

**В** Два гипотетических МЛЦ 11-звенных сайта хелатирования ионов металлов выделены крупным шрифтом

**1-MRPНIIITITGPQNKNSSQKRIMGPHRLKVVQNLIQKIHLLTSGKTTKLIVTLTMRVAVCGMLQALWVFLVTK-73**  
**74-LSVTV-HGFLGLLSLK-MRVVALRVAVLRVAVRKT-VRYTYSGLYLY-QPSRRHLSAWYAK-131**

**Рис. 5.** Данные по анализу гомологии фрагментов различных MMP, ответственных за хелатирование ионов металлов, с полной белковой последовательностью МЛЦ-24. В последовательности МЛЦ-24 обнаружено только два фрагмента, имеющих гомологию с метал-связывающими сайтами различных MMP. Аминокислоты, идентичные (identity) между двумя парами последовательностей, отмечены двоеточием, тогда как разные АК с сильно и умеренно сходными свойствами (similar) – точкой (А и Б). Локализация этих сайтов в последовательности МЛЦ-24 показана на рис. 5В.

MMP варьировал от 25 до 50%, а подобию от 55.6 до 100%. В то же время последовательности пяти остальных MMP проявляли гомологию с другой последовательностью МЛЦ-24: 73-KLSVTVHGFLGLLS-87 (рис. 3Б). Уровень идентичности АК варьировал от 50 до 66,7%, а подобию от 58.3 до 83,3%. На рис. 3В показано расположение этих двух сайтов в последовательности МЛЦ.

Следует отметить, что в отличие от классических MMP, гидролизующих разные белки, МЛЦ-24 специфически связывает и гидролизует только ОБМ [27]. Тем не менее, уровень гомологии этих сайтов МЛЦ-24 сопоставим с таковыми для тринадцати разных металлопротеаз (рис. 3). Следует отметить, что сходство пространственных (третичных) структур двух ОБМ-связывающих последовательностей МЛЦ-24 с последовательностями типа I различных MMP может быть значительно выше, поскольку кроме полного совпадения остатков AA (identity), некоторые из неидентичных АК имеют сходные структурные свойства (similar, рис. 3).

#### *Анализ возможной локализации в МЛЦ-24 двух каталитических центров*

Был проведен поиск возможного расположения в последовательности МЛЦ-24 активных центров, осуществляющих гидролиз белков. Глутаминовая кислота (Glu) MMP8 (и других металлопротеаз) связывает и активирует молекулу H<sub>2</sub>O, которая атакует и гидролизует пептидную связь белка-субстрата [28, 30–32]. Некоторые белковые последовательности типа II, содержащие каталитический остаток Glu в тринадцати металлопротеазах, более гомологичны друг другу, чем последовательности типа I: 57% (MMP1-MMP8, MMP1-MMP14) и 100% (MMP1-MMP7). Поиск гомологии показал, что после первой последовательности типа I, МЛЦ-24 содержит последовательность 62-MLQALWF-68: совпадение АК с таковыми для разных MMP 25–50%, а их подобие – 50–62,5% (рис. 4А). Второй центр, гомологичный последовательностям MMP, расположен за вторым сайтом первого типа: 123-RHLSAWY-129: 25–66.7% идентичности и 40–75% подобию АК с таковыми для некоторых MMP (рис. 4Б). Локализация этих сайтов в последовательности МЛЦ показано на рис. 4Б.

Специфической особенностью последовательностей типа II всех MMP является то, что они содержат остаток Trp (W) через одну АК от остатка Glu (E). Интересно, что обе последо-

вательности МЛЦ-24 не содержат остатка Glu, который важен для катализа гидролиза белков всеми MMP. Последовательность второго типа МЛЦ-24 (RHLSAWY) также содержит Trp, но Glu заменен в этой последовательности на остаток Ser (S), который также может связывать и активировать молекулу воды в процессе гидролиза белков [33, 34].

Первый гипотетический активный центр второго типа МЛЦ-24 (MLQALWF) содержит остаток Trp только через две АК от гидрофильного остатка глутамина (Q), также способного активировать молекулу воды [34].

#### *Анализ возможного расположения в МЛЦ-24 центров, хелатирующих ионы металлов*

Рентгеноструктурный анализ Zn<sup>2+</sup>-пептидаз выявил общую структуру белковых последовательностей цинк-связывающих кластеров: NxxxNxxxxxH (рис. 2) [28, 31, 32]. В отличие от классических металлопротеаз, МЛЦ-24 не является Zn<sup>2+</sup>-зависимым ферментом, она активируется ионами Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup> и Zn<sup>2+</sup> [27]. Поэтому было трудно ожидать, что AA-кластер МЛЦ-24, хелатирующий ионы металлов, может быть подобным таковым для классических Zn<sup>2+</sup>-зависимых металлопротеаз. Учитывая это, поиск возможной 11-звенной последовательности типа III, был основан на анализе возможной гомологии каких либо сайтов МЛЦ-24 и последовательностей тринадцати MMP, хелатирующих ионы металлов, а также возможности таких кластеров легкой цепи МЛЦ-24 связывать ионы металлов. Такие хелатирующие кластеры ионов металлов МЛЦ должны содержать три из нескольких известных гидрофильных AA (Ser, Tyr, Thr, Asp, Glu, Asn, Gln, His и Lys), которые способны образовывать донорно-акцепторные связи с различными ионами металлов. В МЛЦ-24 было найдено только две последовательности гомологичные сайтам хелатирования ионов металлов тринадцати MMP. Первый Me<sup>2+</sup>-связывающий сайт МЛЦ-24, гомологичный сайтам связывания ионов цинка MMP имеет следующую структуру: 79-HGFLGLLSLK-89. Уровень идентичности АК с центрами связывания ионов металлов классических металлопротеаз варьирует от 44,4 до 55,6%, а сходства от 55,6 до 66,7 (рис. 5А). Он содержит только один остаток His и еще две АК, способных эффективно взаимодействовать с ионами металлов. Однако, не обязательно, что именно эти три АК остатка хелатируют ионы

металлов. Например, хелатирующий сайт ионов кальция, может включать карбонильные и/или аминокислотные группы пептидных связей остатков Gln, Ile и Arg [35]. Нельзя исключить, что какая-либо из центральных АК этого кластера способна образовывать связи с ионами металлов за счет карбонильной (C=O) или аминокислотной (O=C-NH-) группы.

Функцию второго 11-звенного сайта связывания ионов  $Me^{2+}$  гипотетически может выполнять последовательность 108-VRYTYSGLYLY-118, содержащая семь АК остатков, каждый из которых способен эффективно взаимодействовать с ионами металлов. Эта последовательность МЛЦ содержит 37,5–55,6% идентичных и 55,6–83,3% близких по структуре АК с таковыми для классических металлопротеаз (рис. 5Б). Локализация этих двух кластеров в белковой последовательности МЛЦ показано на рис. 5В.

Все данные поиска двух сайтов связывания ОБМ типа I, каталитических остатков

АА, способных активировать молекулу воды (последовательность типа II), а также кластеров хелатирования ионов  $Me^{2+}$  (последовательность III) были обобщены в виде гипотетической схемы возможного расположения этих структурных элементов в молекуле МЛЦ-24 (рис. 5В).

*Анализ подобия активных центров МЛЦ и  $Ca^{2+}$ -зависимых протеаз*

В гидролизе белков кальций-зависимыми протеазами участвуют при АК остатка: Cys (C), His (H) и Asn (N). В девяти различных протеазах Cys может находиться в положениях от 97 (CAPN9) до 359 (CAPN6) с N-конца. His в зависимости от протеазы расположен от Cys на расстоянии от 133 до 205 АК, а Asn – 179–229 АК. Сближение этих АК при формировании активных центров происходит при образовании третичных структур протеаз. Сначала был проведен анализ гомологии 12-звенных фрагментов, содержащих Cys, в случае девяти CAPN-протеаз.

**Гомология между:**

первым каталитическим центром МЛЦ (АЦ1) и Cys-сайтом CAPN1

АЦ1-МЛЦ GML-QALWFVL 36.4% identity; 54.5% similar

: : . : . :

CAPN1 GALGDC-WL-L

первым каталитическим центром МЛЦ (АЦ1) и Cys-сайтом CAPN3

АЦ1-МЛЦ GML-QALWFVL 45.5% identity; 54.5% similar

: : . : . :

CAPN3 GELGDC-WF-L

первым каталитическим центром МЛЦ (АЦ1) и Cys-сайтом CAPN5

АЦ1-МЛЦ GMLQA--LWFV 45.5% identity; 54.5% similar

: : . : . :

CAPN5 G--QVGNCWFV

**Гомология между:**

вторым каталитическим центром МЛЦ (АЦ2) и Cys-сайтом CAPN5

АЦ2-МЛЦ HL-SAWY-A 22.2% identity; 66.7% similar

. . . : . :

CAPN5 QVGNCWFVA

вторым каталитическим центром МЛЦ (АЦ2) и Cys-сайтом CAPN7

АЦ2-МЛЦ LS-AWY-A 37.5% identity; 50.0% similar

: . : : . :

CAPN7 LGDCWLLA

вторым каталитическим центром МЛЦ (АЦ2) и Cys-сайтом CAPN8

АЦ2-МЛЦ LS-AWY-A 37.5% identity; 50.0% similar

: . : : . :

CAPN8 LGDCWLLA

**Рис. 6.** Данные по анализу гомологии первого и второго каталитических центров МЛЦ-24 с Cys-содержащими сайтами CAPN1, CAPN3 и CAPN5. Обнаружено только два фрагмента CAPN с полной белковой последовательностью МЛЦ-24. Аминокислоты, идентичные (identity) между двумя парами последовательностей, отмечены двоеточием, тогда как разные АК с сильно и умеренно сходными свойствами (similar) – точкой (А и Б).

Уровень совпадения этих последовательностей CAPN1 с девятью другими протеазами варьировал от 55,6–57,1 (CAPN5 и CAPN6) до 100% (CAPN2 и CAPN7); среднее значение  $81,9 \pm 17,5$ . Интересно, что полное подобие этой последовательностей CAPN1 с другими восьмью протеазами наблюдалось не во всех случаях и варьировало от 85,7 до 100%; среднее значение  $94,8 \pm 5,9$ .

Cys-содержащие сайты девяти CAPN демонстрировали гомологию только с двумя фрагментами последовательности МЛЦ (1–135 АК), которые совпадали с активными центрами легкой цепи, выявленными при анализе гомологии этой последовательности с кластерами тринадцати MMP, содержащими каталитический остаток Glu. Несколько примеров гомологии Cys-содержащих последовательностей  $Ca^{2+}$ -протеаз и важных для катализа двух сайтов МЛЦ приведены на **рис. 6**. В целом для 9 CAPN совпадение АК в случае первого активного центра МЛЦ (CGMLQALWFVLV) варьировало от 36,4 до 45,5% (среднее значение  $39,4 \pm 4,6$ ), а подобие от 54,5 до 63,6 (среднее значение  $55,5 \pm 3,0$ ). Совпадение АК для второго активного центра МЛЦ (PSRRHLSAWYAK) варьировало от 22,2 до 50,0% (среднее значение  $36,3 \pm 7,2$ ), а подобие от 50,0 до 75,5 (среднее значение  $57,1 \pm 9,7$ ).

Особенностью  $Ca^{2+}$ -протеаз является то, что после каталитического Cys находится остаток Trp (например, последовательность CAPN1 – GALGDCWLLAAI). Все MMP содержат остаток Trp через одну АК от остатка Glu (например, MMP1 – DEDERWT). Как  $Ca^{2+}$ -протеазы и MMP, так и первый каталитический центр МЛЦ содержит W остаток (MLQALWF), но через две АК от гидрофильного остатка глутамина (Q), также способного активировать молекулу воды. Последовательность второго типа МЛЦ-24 (RHLSAWY), важная для катализа, также содержит Trp, но Glu, соответствующий MMP, заменен в этой последовательности на остаток Ser (S).

Таким образом, при поиске двух возможных активных центров МЛЦ путем анализа гомологии белковой последовательности легкой цепи с активными центрами MMP и CAPN найдены две те же самые последовательности. Особенностью активных центров MMP и CAPN является то, что они содержат рядом с каталитическими Glu или Cys остаток Trp. Однако, обнаружение одних и тех же ответственных за катализ последовательностей МЛЦ при поиске гомологии ее

белковой последовательности с таковыми для MMP и CAPN, указывало на то, что каталитические центры  $Zn^{2+}$ - и  $Ca^{2+}$ -протеаз также могут быть в существенной степени гомологичными. Учитывая это, был проведен анализ гомологии 12-членных последовательностей, окружающих Glu и Cys остатки тринадцати MMP и девяти CAPN, соответственно. Полное совпадение АК варьировало от 25 до 50% (среднее значение  $31,8 \pm 5,8$ ), а подобия от 33,3 до 53,8 (среднее значение  $45,5 \pm 5,2$ ). Эти значения гомологии для каталитических центров 13 MMP и 9 CAPN были сопоставимы для таковых в случае двух центров МЛЦ и CAPN (первый центр совпадение 36,4–45,5% и подобие 54,5–63,6%; второй центр совпадение – 25–50% и подобие 50–75%). Близкая ситуация была выявлена для МЛЦ и MMP: первый центр совпадение АК равно 25–50%, а подобие – 50–62,5%; второй центр совпадение – 25–66,7%, а подобие 40–75%). Таким образом, не смотря на то, что сайты MMP (Glu), CAPN (Cys) и МЛЦ (Gln и Ser), ответственные за катализ, содержат разные АК остатки, непосредственно участвующие в катализе, их белковые последовательности имеют близкий уровень совпадения и особенно подобия АК.

#### *Анализ подобия металл-связывающих центров МЛЦ и $Ca^{2+}$ -зависимых протеаз*

Кластеры, хелатирующие различные ионы металлов, как и важные для катализа АК остатки могут в своем составе содержать некоторое число одинаковых АК. Известны последовательности  $Ca^{2+}$ -хелатирующих сайтов нескольких CAPN, число которых в зависимости от фермента может изменяться от двух до семи [29]. Достаточно подробно описаны два  $Ca^{2+}$ -связывающих сайта каталитической субъединицы CAPN1 и четыре сайта CAPN2 [29].

Сначала был проведен поиск гомологии последовательностей  $Ca^{2+}$ -связывающих сайтов CAPN1 и CAPN2. Результат этого анализа был несколько неожиданным; уровень гомологии  $Ca^{2+}$ -хелатирующих сайтов протеаз был относительно низким (совпадение АК остатков  $\leq 20$ –25%). На **рис. 7** приведены примеры анализа гомологии некоторых CAPN1 и CAPN2 последовательностей с повышенной гомологией. Уровень совпадения АК остатков этих последовательностей варьировал от 33 до 75%, а сходства от 58,3 до 83,3%.

Был проведен анализ гомологии последовательностей  $Ca^{2+}$ -связывающих сайтов CAPN1

Гомология между:  
 первым и вторым  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающим центром CAPN2  
 CAPN2-1s DSDGSGKLGLK-E 38.5% identity; 61.5% similar  
 : : :: . . . :  
 CAPN2-2s DVDRSGTMN-SYE  
 первым  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающим центром CAPN2 и третьим CAPN1  
 CAPN2-1 DSDGSGKLGLKE 75.0% identity; 83.3% similar  
 : ::::: :  
 CAPN1-3 DRDNGKLGLE  
 Вторым  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающим центром CAPN2 и третьим CAPN1  
 CAPN2-2 DVDRSGTMNSYE 33.3% identity; 58.3% similar  
 : : .: . . :  
 CAPN1-3 DRDNGKLGLE  
 Третьим и четвертым  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающим центром CAPN1  
 CAPN1-3 DRDNGKLGLE 33.3% identity; 66.7% similar  
 : : : . . . :  
 CAPN1-4 DLDKSGSMSAYE

Гомология между:  
 первым  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающим CAPN2 и  $\text{Zn}^{2+}$ -хелатирующим сайтом MMP1  
 CAPN2-1 D-G-SGKLGL 50.0% identity; 60.0% similar  
 . : : : :  
 MMP1 ELGHS--LGL  
 первым  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающим CAPN2 и  $\text{Zn}^{2+}$ -хелатирующим сайтом MMP10  
 CAPN2-1 GK-LGLK 57.0% identity; 85.7% similar  
 : . : : : .  
 MMP10 GHVLGLQ  
 первым  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающим CAPN2 и  $\text{Zn}^{2+}$ -хелатирующим сайтом MMP24  
 CAPN2-1 GKLGLE 71.4% identity; 71.4% similar  
 : : : : :  
 MMP24 GALGL-E

Гомология между:  
 вторым  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающим CAPN2 и  $\text{Zn}^{2+}$ -хелатирующим сайтом MMP13  
 CAPN2-2 DVDRS-GTMN 20.0% identity; 60.0% similar  
 . . : : . .  
 MMP13 EFGHSLG-LD  
 вторым  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающим CAPN2 и  $\text{Zn}^{2+}$ -хелатирующим сайтом MMP1  
 CAPN2-2 DVDRS-GTMNSY 25.0% identity; 66.7% similar  
 . . : : : . : .  
 MMP1 ELGHSLG-L-SH  
 вторым  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающим CAPN2 и  $\text{Zn}^{2+}$ -хелатирующим сайтом MMP24  
 CAPN2-2 G-TMNSYE 37.5% identity; 62.5% similar  
 : . . . :  
 MMP24 GHAMG-LE

**Рис. 7.** Данные по анализу гомологии  $\text{Ca}^{2+}$ -хелатирующих центров различных CAPN, двух  $\text{Ca}^{2+}$ -сайтов различных CAPN и  $\text{Zn}^{2+}$ -кластеров разных MMP. Аминокислоты, идентичные (identity) между двумя парами последовательностей, отмечены двоеточием, тогда как разные АК с сильно и умеренно сходными свойствами (similar) – точкой.

и CAPN2 и  $\text{Zn}^{2+}$ -связывающих кластеров MMP. На рис. 7 показано несколько примеров анализа гомологии некоторых  $\text{Ca}^{2+}$ -сайтов CAPN1 и CAPN2 с  $\text{Zn}^{2+}$ -сайтами MMP. В целом уровень совпадения АК остатков этих последовательностей CAPN1 и CAPN2 с  $\text{Zn}^{2+}$ -кластерами

тринадцати MMP варьировал от 25 до 50%, а сходства от 33.3 до 53.8% (средние величины равны  $31,8 \pm 5,8$  и  $45,5 \pm 5,2\%$ , соответственно). Таким образом, уровень гомологии между  $\text{Ca}^{2+}$ -сайтами CAPN1 и CAPN2 и  $\text{Zn}^{2+}$ -кластерами тринадцати MMP вполне сопоставим не смо-

**Гомология первого (79-HGFLGLLSLK-89) и второго (108-VRYTYSGLYLY-118) сайтов связывания ионов металлов МЛЦ с третьим Ca<sup>2+</sup>-связывающим кластером CAPN1**

**Первый Me-связывающий сайт МЛЦ**

**L G L V** (sequence 3 CAPN1: 75.0% identity; 100% similar)

: : : .

**Второй Me-связывающий сайт МЛЦ**

79-H **G F L L G L L S L K** MRVVALRVAVLRVAVRKT**VRYT Y S G L Y L** YQPSRRHLSAWYAK-131

. : : : .

: . : : :

**N G - K L G L V**

**R - DGNG K L G L**

(sequence 3 CAPN1: 50.0% identity; 75.0% similar)

(sequence 3 CAPN1: 50.0% identity; 75.0% similar)

**Гомология первого (79-HGFLGLLSLK-89) и второго (108-VRYTYSGLYLY-118) сайтов связывания ионов металлов МЛЦ с первым Ca<sup>2+</sup>-связывающим кластером CAPN2**

**Первый Me-связывающий сайт МЛЦ**

**G S - G K L G L K** (sequence 1 of CAPN2: 50.0% identity; 60.0% similar)

: : : : :

**Второй Me-связывающий сайт МЛЦ**

80-**G F L L G L L S L K** MRVVALRVAVLRVAVRKT**VRYTYS G L Y L** YQPSRRHLSAWYAK-131

: : : :

: : : :

**G- K L G L** (sequence 1 of CAPN2:

**S G K L G L** (sequence 1 of CAPN2)

66.7% identity; 66.7% similar)

**Рис. 8.** Данные по анализу гомологии первого и второго сайтов связывания ионов металлов МЛЦ с сайтами хелатирования ионов кальция CAPN1 и CAPN2. Фрагменты последовательности МЛЦ (79–131 АК), имеющие гомологию с сайтами CAPN1 и CAPN2, отмечены жирным шрифтом. Аминокислоты, идентичные (identity) между двумя парами последовательностей, отмечены двоеточием, тогда как разные АК с сильно и умеренно сходными свойствами (similar) – точкой.

тря на то, что они хелатируют ионы разных металлов.

Учитывая относительно низкий уровень гомологии между последовательностями Ca<sup>2+</sup>-связывающих сайтов CAPN, трудно было ожидать их хорошей гомологии с двумя сайтами связывания ионов различных металлов МЛЦ. Для поиска возможных сайтов связывания ионов металлов в последовательности МЛЦ (1–131 АК) сначала был проведен поиск фрагментов последовательности МЛЦ, которые имеют гомологию с четырьмя Ca<sup>2+</sup>-хелатирующими кластерами CAPN1. Последовательность 3 (DRDGNGKLGLVE) CAPN1 была гомологичной только двум фрагментам МЛЦ (**рис. 8**). При этом с использованием пяти альтернативных выравниваний третьей последовательности CAPN1 и МЛЦ было выявлено два варианта гомологии с последовательностью первого (CGMLQALWFVLV) и один вариант гомологии с последовательностью второго Me-связывающего кластера (PSRRHLSAWYAK), выявленных при анализе гомологии Zn<sup>2+</sup>-хелатирующих центров MMP и МЛЦ (**рис. 8**). Совпаде-

ние АК указанных последовательностей CAPN1 и МЛЦ варьировало от 50 до 75%, а сходства от 75 до 100% (**рис. 8**). Других участков гомологии третьего сайта CAPN1 с общей последовательностью МЛЦ выявлено не было.

Далее был проведен анализ гомологии двух Ca<sup>2+</sup>-связывающих сайтов каталитической субъединицы CAPN2 с возможными последовательностями МЛЦ. И в этом случае было обнаружено только два фрагмента последовательности МЛЦ гомологичных первой Ca<sup>2+</sup>-хелатирующей последовательности CAPN2 (DSDGSGKLGLKE), которые совпадали с выявленными с помощью последовательности CAPN1 (**рис. 8**). Совпадение АК последовательности CAPN2 и двух фрагментов МЛЦ варьировало от 50 до 66,7%, а сходства от 60 до 67% (**рис. 8**). Таким образом, поиск гомологии возможных Me<sup>2+</sup>-связывающих кластеров МЛЦ с Zn<sup>2+</sup>-хелатирующими последовательностями MMP и Ca<sup>2+</sup>-узнающими сайтами CAPN привел к выявлению двух одних и тех последовательностей легких цепей. Интересно, что уровень совпадения и сходства

**1-ый ОБМ-связывающий сайт**  
**1-MRPНПТТТGРQNKNSSQKRIMGPHRLLKVVQNLIQKINLLTSGKTTK-49**

**1-ый центр катализа**  
**50-LIVTLTMRAVCGMLQALWFVL-70**

**2-ой ОБМсвязывающий сайт**  
**71-VTKLSVTVHGFLLGLLSLKMRVVALRVA-98**  
**79-HGFLLGLLSLK-89**

**1-ый металл-связывающий сайт**  
**2-ой металл-связывающий сайт**  
**99-VLRVAVRKTVRYTYSGLYLYQP-120**

**2-ый центр катализа**  
**121-SRRHLSAWYAKPRSSFS-137**

**138-GVSASYFHVSEVPKAGCINCLYGHVTQGTDPVKTYQYTPVSSKAMYDAYW**  
**NGKFRDCAFHSGFNEDPIPFVKLEANRLTCPQSCQCWRRALGGWFLGGG -238**

**Рис. 9.** Гипотетическая модель структуры (АК-последовательностей) и возможной локализации двух альтернативных наборов фрагментов последовательности NGTA1-Me-pro, которые могут быть ответственны за специфическое распознавание ОБМ (последовательность типа I), двух гипотетических центров катализа гидролиза ОБМ (последовательность II) и двух металл-хелатирующих кластеров (последовательность III).

АК металл-связывающих сайтов МЛЦ сопоставим с таковыми для  $\text{Ca}^{2+}$ -узнающих кластеров CAPN. В целом, уровень гомологии двух  $\text{Me}^{2+}$ -сайтов МЛЦ с кластерами связывающими ионы металлов CAPN и MMP сопоставим с таковыми для самих CAPN и самих MMP, а также CAPN и MMP.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Данные работ [26, 27] свидетельствуют о чрезвычайном разнообразии анти-ОБМ рекомбинантных каппа легких цепей в их родстве к ОБМ и других физико-химических свойствах. В этой статье впервые проведен анализ возможного расположения активных центров в NGTA1-Me-pro, описанной ранее [27]. Анализ ДНК последовательности клона NGTA1-Me-pro показал, что МЛЦ-24 относится к генам VL зародышевой линии.

NGTA1-Me-pro является необычной протеазой, с двумя альтернативными активными центрами металлопротеазы [27]. Известные значения  $k_{\text{cat}}$  для природных абзимов из крови аутоиммунных пациентов, катализирующих многие различные химические реакции, варьируют в ди-

апазоне  $1 \times 10^{-5}$ –40 мин<sup>-1</sup> ([3–6] и ссылки на них). NGTA1-Me-pro характеризовалась двумя относительно высокими значениями  $k_{\text{cat}}$  ( $0,07 \pm 0,005$  и  $0,22 \pm 0,02$  мин<sup>-1</sup>) [27].

По структуре и расположению АК остатков, ответственных за катализ МЛЦ больше похожа на тринадцать MMP. Эти человеческие  $\text{Zn}^{2+}$ -зависимые MMP хорошо описаны ранее [28, 30–32]. Они различаются по длине (267–707 АА остатков), тогда как NGTA1-Me-pro содержит 238 остатков АА (теоретическая мол. масса 26814,6 Да). Гомология между полными белковыми последовательностями тринадцати MMP сильно отличается, 30,3–61,5%. Кроме того, даже для фрагментов последовательностей MMP ответственных за связывание белков, уровень гомологии (идентичность АК) металлопротеаз варьирует от 28.6% (MMP1-MMP3) до 92.3% (MMP1-MMP11). В тоже время с учетом АК, имеющих близкие структурные свойства, сходство в АК этих последовательностей MMP варьирует от 57,1 до 92.3%, соответственно. Нами найдено только два сайта МЛЦ-24, которые имеют гомологию с белок-узнающими последовательностями MMP: 15-KNSSQKRIMGPHRLL-29 и 73-KLSVTVHGFLLGLLS-87; уровень иден-

тичности (25,0–66,7%) и сходства (55,6–100%) их АК с последовательностями MMP (рис. 3) сопоставим с таковым для тринадцати металлопротеаз. Совпадение (37,5%) и сходство (62,5%) АК остатков между этими двумя последовательностями МЛЦ-24 также близко к этому диапазону величин. Данные о сайтах связывания белков CAPN-ферментами в литературе отсутствуют.

Значение  $K_m$  для ОБМ при pH 6,0 (6,0 мМ CaCl<sub>2</sub>) равно  $20 \pm 2$  мкМ ( $k_{cat} = 0,22 \pm 0,02$  мин<sup>-1</sup>) и при pH 8,5 (0,7 мМ CaCl<sub>2</sub>)  $K_m = 40 \pm 3$  мкМ ( $k_{cat} = 0,07 \pm 0,005$  мин<sup>-1</sup>) [27]. Не смотря на то, что эти центры отличаются по сродству к ОБМ только в два раза, они характеризуются существенной разницей в сродстве к CaCl<sub>2</sub> и величинах  $k_{cat}$ .

Для сайтов, ответственных за хелатирование ионов металлов, степень совпадения АК у разных MMP варьирует от 54.5% (MMP2-MMP7) до 90.9% (MMP1-MMP10). Можно было предположить, что именно специфические последовательности MMP, ответственные за катализ, характеризуются более высоким уровнем гомологии. Однако и эти сайты у разных MMP могут существенно отличаться. Для некоторых MMP уровень их гомологии относительно низкий, только 57%. Относительно небольшое число MMP характеризуются степенью гомологии между этими сайтами от 86 до 100%, но в основном для большинства пар MMP он равен 71%

Не смотря на то, что протеазная активность МЛЦ-24 лучше всего активируется ионами Ca<sup>2+</sup>, другие ионы металлов также эффективные кофакторы металл-зависимого активного центра МЛЦ-24 [27]. NGTA1-Me-pro не является Zn<sup>2+</sup>-зависимой протеазой, это абзим с универсальным центром связывания ионов различных металлов. Мы обнаружили только две последовательности МЛЦ-24 с относительно высокой гомологией с сайтами MMP, связывающими ионы цинка: 79-HGFLLGLLSLK-89 и 108-VRYTYSGLYLY-118 (рис. 6). Уровень идентичности (37,5–55,6%) и сходства (55,6–83,3%) АК с таковыми для тринадцати MMP варьирует в широком диапазоне (рис. 5). Сродство одного из этих центров к ионам Ca<sup>2+</sup> (0,7 мМ) примерно в 8,6 раз выше, чем ко второму (6,0 мМ) [27]. Поскольку во второй последовательности 7 из 11 АК остатков способны взаимодействовать с ионами металлов, скорее всего именно этот кластер имеет более высокое сродство к ионам Ca<sup>2+</sup>. Неожиданным в случае первого гипотети-

ческого кластера связывания ионов металлов (79-HGFLLGLLSLK-89) было то, что он частично перекрывается со вторым ОБМ-узнающим сайтом МЛЦ (73-KLSVTVHGFLGLLS-87) (рис. 6). С одной стороны нельзя исключить, что при связывании ОБМ с одним из сайтов его узнавания, этот первый 79–89-кластер может связывать ионы металлов и активировать реакцию гидролиза белка. В то же время, при образовании комплекса ОБМ с 73–87-сайтом, могут функционировать ионы металлов связанные с хелатирующей последовательностью 108–118-кластера.

Было обнаружено только две последовательности МЛЦ-24, гомологичные последовательностям активных центров тринадцати MMP MLQALWF и RHLSAWY. Уровень гомологии этих последовательностей (25–66,7% идентичности) и тринадцати MMP (57–100% идентичности) не на много ниже (рис. 4).

Интересно, что при поиске гомологии Суc-содержащих и Ca<sup>2+</sup>-хелатирующих сайтов различных CAPN с последовательностью МЛЦ обнаружены по два тех же самых кластеров, ответственных за катализ и связывание ионов металлов легкой цепью, что и при поиске этих последовательностей при анализе гомологии Glu-содержащих кластеров и Zn<sup>2+</sup>-узнающих сайтов тринадцати MMP с белковой последовательностью легкой цепи. Учитывая это, все данные по поиску трех типов центров, важных для связывания белков-субстратов, узнавания ионов металлов и катализа обобщены нами на рис. 9. С нашей точки зрения, именно эти гипотетические сайты МЛЦ с очень большой вероятностью выполняют функцию трех типов центров, известных для классических металлопротеаз.

Следует отметить, что МЛЦ-24 демонстрирует два разных pH-оптимума: 6.0 и 8.5 [27]. В случае второго гипотетического активного центра МЛЦ-24 остаток Ser может служить активатором молекулы воды. Как известно, pK Ser в активных центрах разных ферментов колеблется от 8 до 9 [31]. Следовательно, оптимальное значение pH = 8,5 в большей степени согласуется с pK остатка Ser второго активного центра МЛЦ-24 металлопротеазы. Для амидов кислот pK амино-групп обычно находятся между 5,5 и 7,5 [31]. Поэтому Q остаток первого центра лучше соответствует второму оптимальному значению pH 6,0 гипотетического активного центра МЛЦ-24.

Второй активный центр МЛЦ-24 (RHLSAWY) можно рассматривать как необычный гибридный пока не описанный металл-зависимый

центр сериновой протеазы. Учитывая это, был проведен анализ гомологии белковой последовательности МЛЦ-24 с таковыми для классических протеаз (трипсин, химотрипсин и эластаза). Три варианта анализа привели к следующим значениям (идентичность и сходство): трипсин, 24,1–27,0 и 52,3–56,3%; химотрипсин, 26,2–31,4 и 48,6–62,3%; эластаза 25,4–30,6 и 52,9–65,2%. Таким образом, общий уровень гомологии между полными белковыми последовательностями МЛЦ-24 и канонических протеаз также сопоставим с таковыми для самих сериновых протеаз (34,4–41,0%).

В случае сериновых протеаз катализ гидролиза белков осуществляется с помощью остатка Ser, входящего в состав триады: Ser-His-Glu. Однако, в отличие от тринадцати ММР, высокого уровня гомологии каких либо белковых фрагментов МЛЦ-24 с последовательностями трипсина, химотрипсина и эластазы, содержащими АК остатки этой триады, найдено не было. По-видимому, в отличие от сериновых протеаз, активация остатков Ser и Glu двух активных центров МЛЦ может осуществляться с помощью ионов металлов.

В данной работе нами впервые проведен анализ возможного расположения структурных элементов МЛЦ, обладающей двумя металлопротеазными центрами. На основании проведенного анализа предложена гипотетическая модель расположения в легкой цепи сайтов, ответственных за связывание белкового субстрата, хелатирование ионов металлов и непосредственно катализ (рис. 9).

### БЛАГОДАРНОСТИ

Мы очень благодарны S. Paul и S. Plaquet (University of Texas Houston Medical School, USA) за предоставление нам библиотеки cDNA пациентов SLE. Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант 16-15-10103).

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Catalytic antibodies. (E. Keinan eds) Wiley-VCH Verlag GmbH and Co. KGaA, Germany, 2005, pp.1–586
2. *Nevinsky G. A., Buneva V. N.* Natural catalytic antibodies – abzymes. In *Catalytic antibodies* (E. Keinan, Eds). VCH-Wiley press, Germany, 2004, pp. 503–567.
3. *Nevinsky G. A.* (2010) Natural catalytic antibodies in norm and in autoimmune diseases, in: Brenner KJ (ed.), *Autoimmune Diseases: Symptoms, Diagnosis and Treatment*. Nova Science Publishers, Inc., New York, USA, pp. 1–107.
4. *Nevinsky G. A.* Natural catalytic antibodies in norm and in HIV-infected patients. In *Understanding HIV/AIDS Management and Care – Pandemic Approaches the 21<sup>st</sup> Century* (F. H. Kasenga Eds), InTech, Rijeka, Croatia. 2011, pp. 151–192.
5. *Nevinsky G. A.* Autoimmune processes in multiple sclerosis: production of harmful catalytic antibodies associated with significant changes in the hematopoietic stem cell differentiation and proliferation. In *Multiple sclerosis* (A. Gonzales-Quevedo Eds), InTech, Rijeka, Croatia, 2016, pp 100–147.
6. *Nevinsky G. A.* Catalytic antibodies in norm and systemic lupus erythematosus. In *Lupus* (Khan W.A, ed.), InTech, Rijeka, Croatia, 2017, pp. 41–101.
7. *Hhachn B. Ch.* Systemic lupus erythematosus (Braunvald, E.E., Isselbacher, K.D., Petersdorf, R.G., Wilson, D.D., Martin, D.B., and Fauchi, A.S., eds), *Medicine*, Moscow: Internal diseases, 1996, pp. 1–407.
8. *Shuster A. M., Gololobov G. V., Kvashuk O. A., Bogomolova A. E., Smirnov I. V., Gabibov A. G.* DNA hydrolyzing autoantibodies. *Science*, 1992, 256, 665–667.
9. *Andrievskaya O. A., Buneva V. N., Baranovskii A. G., Gal'vita A. V., Benzo E. S., Naumov V. A., Nevinsky G. A.* Catalytic diversity of polyclonal RNA-hydrolyzing IgG antibodies from the sera of patients with systemic lupus erythematosus. *Immunol. Lett.*, 2002, 81, 191–198.
10. *Andrievskaya O. A., Buneva V. N., Naumov V. A., Nevinsky G. A.* Catalytic heterogeneity of polyclonal RNA-hydrolyzing IgM from sera of patients with lupus erythematosus. *Med. Sci. Monit.*, 2000, 6, 460–470.
11. *Бунева В. Н., Андриевская О. А., Романникова И. В., Гололобов Г. В., Ядав П. П., Ямковой В. И., Невинский Г. А.* Взаимодействие каталитически активных антител с олигорибонуклеотидами. *Молекуляр. биология*, 1994, 28, 738–743.
12. *Bezuglova A. M., Konenkova L. P., Doronin B. M., Buneva V. N., Nevinsky G. A.* Affinity and catalytic heterogeneity and metal-dependence of polyclonal myelin basic protein-hydrolyzing IgGs from sera of patients with systemic lupus erythematosus. *J. Mol. Recognit.*, 2011, 24, 960–974.
13. *Bezuglova A. M., Konenkova L. P., Buneva V. N., Nevinsky G. A.* IgGs Containing light chains of the lambda- and kappa- type and of all subclasses (IgG1-IgG4) from the sera of patients with systemic lupus erythematosus hydrolyze myelin basic protein. *Int. Immunol.*, 2012, 24, 759–770.
14. *Bezuglova A. M., Konenkova L. P., Doronin B. M., Buneva V. N., Nevinsky G. A.* Affinity and catalytic heterogeneity and metal-dependence of polyclonal myelin basic protein-hydrolyzing IgGs from sera of patients with systemic lupus erythematosus. *J. Mol. Recognit.*, 2011, 24, 960–974.
15. *Bezuglova A. M., Dmitrenok P. S., Konenkova L. P., Buneva V. N., Nevinsky G. A.* Multiple sites of the cleavage of 17- and 19-mer encephalytogenic oligopeptides corresponding to human myelin basic protein (ОБМ) by specific anti-ОБМ antibodies from patients with systemic lupus erythematosus. *Peptides*, 2012, 37, 69–78.
16. *Savel'ev A. N., Eneyskaya E. V., Shabalin K. A., Filatov M. V., Shabalin K. A.* Autoantibodies with amylolytic activity. *Prot. Pept. Lett.*, 1999, 6, 179–184.

17. *Ivanen D. R., Kulminskaya A. A., Ershova N. A., Eney-skaya E. V., Shabalin K. A., Savel'ev A. N., Kanyshkova T. G., Buneva V. N., Nevinsky G. A., Neustroev K. N.* Human autoantibodies with amylolytic activity. *Biologia*, 2002, 11, 253–260.
18. *Savel'ev A. N., Kulminskaya A. A., Ivanen D. R., Nevinsky G. A., Neustroev K. N.* Human antibodies with amylolytic activity. *Trends Glycosci. Glycotechnol.*, 2004, 16, 17–31.
19. *Neustroev K. N., Ivanen D. R., Kulminskaya A. A., Brumer I. H., Saveliev A. N., Nevinsky G. A.* Amylolytic activity and catalytic properties of IgM and IgG antibodies from patients with systemic lupus erythematosus. *Hum. Antibodies*, 2003, 12, 31–34.
20. *Tyutyulkova S., Gao Q. S., Thompson A., Rennard S., Paul S.* Efficient vasoactive intestinal polypeptide hydrolyzing autoantibody light chains selected by phage display. *Biochim. Biophys. Acta*, 1996, 1316, 217–223.
21. *Paul S., Tramontano A., Gololobov G., Zhou Y. X., Taguchi H., Karle S., Nishiyama Y., Planque S., George S.* Phosphonate ester probes for proteolytic antibodies. *J. Biol. Chem.*, 2001, 276, 28314–28320.
22. *Clackson T., Hoogenboom H. R., Griffiths A. D., Winter G.* Making antibody fragments using phage display libraries. *Nature*, 1991, 352, 624–628.
23. *McCafferty J., Fitzgerald K. J., Earnshaw J., Chiswell D. J., Link J., Smith R., Kenten J.* Selection and rapid purification of murine antibody fragments that bind a transition-state analog by phage display. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 1994, 47, 157–173.
24. *Botvinskaya A. V., Kostrikina I. A., Buneva V. N., Nevinsky G. A.* Systemic lupus erythematosus: molecular cloning of several recombinant DNase monoclonal kappa light chains with different catalytic properties. *J. Mol. Recognit.*, 2013, 26, 450–460.
25. *Kostrikina I. A., Buneva V. N., Nevinsky G. A.* Systemic lupus erythematosus: Molecular cloning of fourteen recombinant DNase monoclonal kappa light chains with different catalytic properties. *Biochim. Biophys. Acta*, 2014, 1840, 1725–1737.
26. *Timofeeva A. M., Buneva V. N., Nevinsky G. A.* Systemic lupus erythematosus: molecular cloning and analysis of 22 individual recombinant monoclonal kappa light chains specifically hydrolyzing human myelin basic protein. *J. Mol. Recognit.*, 2015, 28, 614–627.
27. *Timofeeva A. M., Buneva V. N., Nevinsky G. A.* Systemic lupus erythematosus: molecular cloning and analysis of recombinant monoclonal kappa light chain NGTA1-Me-pro with two metalloprotease active centers. *Mol. Biosyst.*, 2016, 12, 3556–3566.
28. *Соловьева Н. И.* Матриксные металлопротеиназы и их биологические функции. *Биоорган. Химия*, 1998, 24, 245–255.
29. Site: <https://www.uniprot.org/uniprot/?query=calpain&fil=organism%3A%22Homo+sapiens+%28Human%29+%5B9606%5D%22&sort=score>
30. MMP последовательности: 1) <https://www.uniprot.org/uniprot/Q9L7Q2>; 2) <https://www.uniprot.org/uniprot/Q65JJ2>; 3) <https://www.uniprot.org/uniprot/B7JJ20>
31. *Verma R. P., Hansch C.* Matrix metalloproteinases (MMPs): chemical-biological functions and (Q)SARs. *Bioorg Med Chem* 2007, 15, 2223–2268.
32. *Whittaker M., Floyd C. D., Brown P., Gearing A. J.* Design and therapeutic application of matrix metalloproteinase inhibitors. *Chem. Rev.*, 1999, 99, 2735–2776.
33. *Polgár L.* The catalytic triad of serine peptidases. *Cell. Mol. Life Sci.*, 2005, 62, 2161–72.
34. *Fersht A.* *Enzyme Structure and Mechanism*, 2<sup>nd</sup> ed., W. H. Freeman, Co., New York, 1985.
35. *Hou H., Wang S., Zhu X., Li Q., Fan Y., Cheng D., Li B.* A novel calcium-binding peptide from Antarctic krill protein hydrolysates and identification of binding sites of calcium-peptide complex. *Food Chem.*, 2018, 243, 389–395.

**SYSTEMIC LUPUS ERYTHEMATOSUS: ANALYSIS OF POSSIBLE  
LOCALIZATION OF ACTIVE SITES IN A PROTEIN SEQUENCE  
OF MONOCLONAL LIGHT CHAIN (NGTA1-Me-pro)  
WITH METALLOPROTEASE ACTIVITIES**

© 2019 А. М. Тимофеева, Г. А. Невинский\*

\*E-mail: nevinisky@niboch.nsc.ru

*Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine of the Siberian Branch  
of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia*

**Received:** 13.03.2018. **Accepted:** 25.08.2019

It was shown previously that monoclonal light chains (MLCh) corresponding to the phagemid library of recombinant light chains of immunoglobulin of peripheral blood lymphocytes of patients with systemic lupus erythematosus (SLE) specifically hydrolyze only the myelin basic protein (MBP). The preparations of one of the light chains (NGTA1-Me-pro) demonstrated two optimal pH values, two optimal concentrations of metal ions and two  $K_m$  values for MBP. Two protease active centers of NGTA1-Me-pro were metal-dependent. In this paper, the homology of protein sequence NGTA1-Me-pro with those for several classical  $Zn^{2+}$ - и  $Ca^{2+}$ -dependent as well as serine human proteases was analyzed for the first time. The analysis revealed possible protein sequences NGTA1-Me-pro responsible for the binding of MBP, chelation of metal ions and direct catalysis. The data obtained are generalized by means of hypothetical models of the structure of two active centers of the light chain of antibodies.

*Key words:* Systemic lupus erythematosus, monoclonal light chain, proteolytic activity, active centers of abzymes

**Authors:**

**Timofeeva A. M.**, PhD, Junior researcher, Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia;

**Nevinisky G. A.**, ☒ doctor of chemistry, professor, chief researcher, Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia. **E-mail:** nevinisky@niboch.nsc.ru