

ОЧИСТКА И НЕКОТОРЫЕ СВОЙСТВА КАТЕПСИНА S ИЗ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

БАРХУДАРЯН Н. А., АЗАРЯН А. В.

Используя осаждение сульфатом аммония (20—80%), фракционирование на колонке с сефадексом G-100 и ионообменную хроматографию на CM-сефадексе С-50, из головного мозга крупного рогатого скота была выделена цистениновая протениназа, идентифицированная как катепсин S. Фермент был очищен приблизительно в 600 раз. Его активность определяли флуорометрически при pH 3,7 в присутствии испстатина. В качестве субстрата был использован пиридоксилгемоглобин. Изоэлектрическое фокусирование очищенного препарата показало, что катепсин S существует в мозгу крупного рогатого скота в виде множественных форм с pI 6,1 и 6,9. Изучены их некоторые физико-химические свойства. Множественные формы высокочувствительны к лейлептину с K_i $1,2 \times 10^{-8}$ М и $1,4 \times 10^{-8}$ М, K_m относительно пиридоксилгемоглобина $2,2 \times 10^{-5}$ М и $2,5 \times 10^{-5}$ М. Фермент имеет широкий оптимум pH (3,7—5,2), $M=25$ кД и обладает узкой субстратной специфичностью: не расщепляет азоказенин, γ -глобулин, альбумин, протамин, а также BANA / α -N-бензоил-DL-аргинил- β -нафтиламид/, ANA /аргинил- β -нафтиламид/, ди- и трипептиды.

Катепсин S (К. Ф. З. 4. 22-), являющийся лизосомной цистениновой протеиназой, расщепляющей гемоглобин при кислых значениях pH в присутствии пепстатина, впервые был выделен из лимфатических узлов теленка [1], затем из бычьей селезенки [2]. Несмотря на то, что имеются данные об участии других цистениновых протеиназ (катепсинов В, L, Н) во внутриклеточном распаде белков [3], роль катепсина S в этом процессе не исследована. Для выяснения возможной роли этого фермента в метаболизме белков, специфичных для нервной ткани, и в процессе образования нейропептидов из предшественников был очищен катепсин S из головного мозга крупного рогатого скота и изучены некоторые его свойства.

Материалы и методы

В экспериментах использовали кору больших полушарий головного мозга крупного рогатого скота, которую извлекали сразу после забоя животных и хранили при -20° .

Определение активности катепсина S осуществляли методом, описанным ранее [4]. В качестве субстрата был применен гемоглобин, ковалентно связанный с пиридоксаль-5'-фосфатом. Измерение активности фермента проводили в пробе объемом 0,6 мл, содержащей 0,05 М ци-

тратный буфер, рН 3, 7, 200 мкг пиридоксилгемоглобина, 100 нг пепстатина и определенное количество фермента. Инкубация длилась 3 ч при 37°. Ферментативную реакцию останавливали добавлением 0,15 мл 30%-ной ТХУ. После центрифугирования при 5000 g рН надосадочной жидкости доводили до 5,5 добавлением 0,3 мл 1 М натрий-цитратного буфера, рН 7,2. Количество кислоторастворимых пептидов определяли флуорометрически на спектрофлуориметре фирмы «Farrand Optical Co. Inc.» (США) при 410 нм (возбуждение 330 нм). Контролем служили субстрат и фермент, инкубированные раздельно. За единицу активности фермента принимали такое его количество, которое вызывало в течение 3 ч при 37° образование фосфопиридоксилпептида, соответствующего по флуоресценции 1 нмоль пиридоксамина.

Электрофорез в ПААГ (10%) проводили по методу Davis [5] при 4° в 0,025 М трис-глициновом буфере, рН 8,3. Электрофоретическое разделение вели 2 ч при силе тока 5 мА на трубку, затем гели фиксировали в 20%-ной ТХУ, красили 1%-ным раствором амидочерного 10 В в 7%-ной уксусной кислоте и отмывали до обесцвечивания фона.

Содержание белка определяли по методу Lowry и соавт. [6], используя в качестве стандарта сывороточный альбумин быка, или на фотометре «Uvicord 2» (ЛКВ, Швеция) при 280 нм.

Величину M находили по методу Andrews [7]. Колонку с сефадексом G-100 (5×55 см), уравновешенную 0,05 М ацетатным буфером, рН 4,8, калибровали с помощью голубого декстрана (M 2000 кД), сывороточного альбумина быка (M 67 кД), катепсина D (M 50 кД), овальбумина (M 45 кД), химотрипсिनогена А (M 25 кД), миоглобина (M 17,8 кД).

Действие фермента на 1%-ные растворы субстратов как белковой, так и пептидной природы—гемоглобин, γ -глобулин, протамин, азоказени, Leu-Gly, Gly-Leu-Тур, Leu-Тур, Leu-Gly-Тур—определяли с помощью о-фталальдегида при рН 5,2 [8].

Для исследования действия фермента на азоказени использовали также метод Langner и др. [9]. Пробы объемом 1 мл содержали 2,5% азоказени, 0,05 М фосфатный буфер, рН 5,6, 5×10^{-3} М ЭДТА, 10^{-3} М дитиотрейтола и 15 мкг фермента. Инкубацию проводили при 37° в течение 3 ч. Ферментативную реакцию останавливали добавлением 1 мл 10%-ной ТХУ. После центрифугирования определяли поглощение супернатанта при 366 нм против контроля, не содержащего фермента.

BANA- и ANA-гидролизующую активность определяли в пробе объемом 0,6 мл, содержавшей 5×10^{-3} М BANA или ANA, 0,05 М фосфатный буфер, рН 5,2, 10^{-3} М дитиотрейтола, 5×10^{-3} М ЭДТА и фермент. Инкубация протекала 1 ч при 37°. Ферментативную реакцию останавливали добавлением 0,15 мл 30%-ной перхлорной кислоты, затем добавляли 0,4 мл 0,8 М боратного буфера, рН 9,7 и 2 мл дистиллированной воды; количество высвободившегося β -нафтиламина определяли флуорометрически на спектрофлуориметре фирмы «Farrand Optical Co. Inc.» (США) при 410 нм (возбуждение 275 нм).

Изоэлектрическое фокусирование проводили на колонке фирмы LKB (Швеция) объемом 110 мл, используя амфолины (1%), обеспечивающие градиент pH 3—10 или 4—8 (смесь амфолинов с pH 4—6 и 6—8) и градиент концентрации сахарозы (40%—0). Образец белка наносили на колонку в виде компонента легкого раствора. Электрофокусирование проводили 24 ч при 4° и напряжении 500 В. Эксперимент заканчивали, когда ток, проходивший через колонку, достигал постоянной величины. По окончании электрофокусирования содержимое колонки собирали фракциями по 1,25 мл, в которых измеряли pH и ферментативную активность.

Результаты и обсуждение

Очистка фермента. Все стадии очистки вели при 4°. 150 г коры больших полушарий головного мозга крупного рогатого скота промывали и гомогенизировали в 300 мл 0,05 М ацетатного буфера, pH 4,0, содержащего 0,2% тритона X-100, 0,3 М NaCl и 10^{-3} М литиотрейтола. Полученный гомогенат центрифугировали при $100000\times g$. Белки надоса-

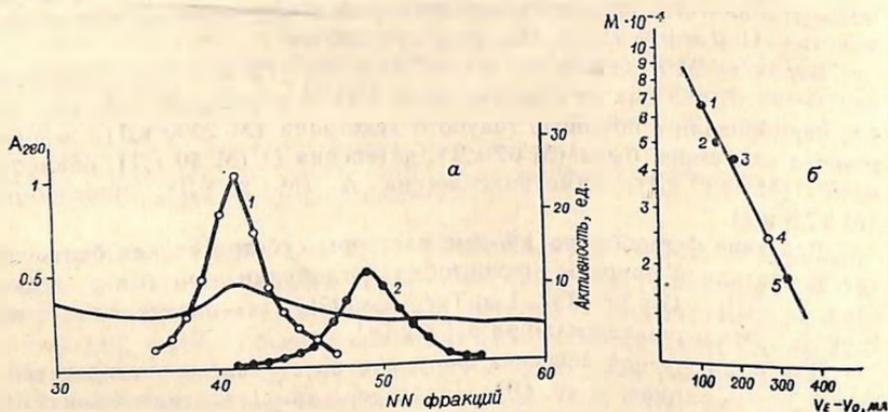


Рис. 1. Хроматография белков, полученных после высаливания сульфатом аммония (20—80%), на колонке с сефадексом G-100: а—профиль элюции гидролизата пиродоксилгемоглобина при pH 3,7. 1—пепстатинчувствительная протеолитическая активность; 2—пепстатиннечувствительная протеолитическая активность; б—определение M катепсина S на колонке с сефадексом G-100, уравновешенной 0,05 М ацетатным буфером, pH 4,8; 1—бычий сывороточный альбумин, 2—катепсин Д, 3—овальбумин, 4—химотрипсиноген А и катепсин S, 5—миоглобин. V_{el}—элюционный объем, V₀—свободный объем

дочной жидкости подвергали осаждению сульфатом аммония (20—80%). Полученный после центрифугирования осадок растворяли в 30 мл 0,05 М ацетатного буфера, pH 4,8 и наносили на колонку с сефадексом G-100 (5×55 см), уравновешенную 0,05 М ацетатным буфером, pH 4,8. Элюцию проводили тем же буфером (рис. 1, а). Собранные с ко-

лонки фракции с пепстатиннечувствительной протеолитической активностью объединяли и наносили на колонку с СМ-сефадексом С-50 (2,5×9 см), уравновешенную 0,05 М Na-фосфатным буфером, рН 6,2. Элюцию проводили тем же буфером с линейным градиентом

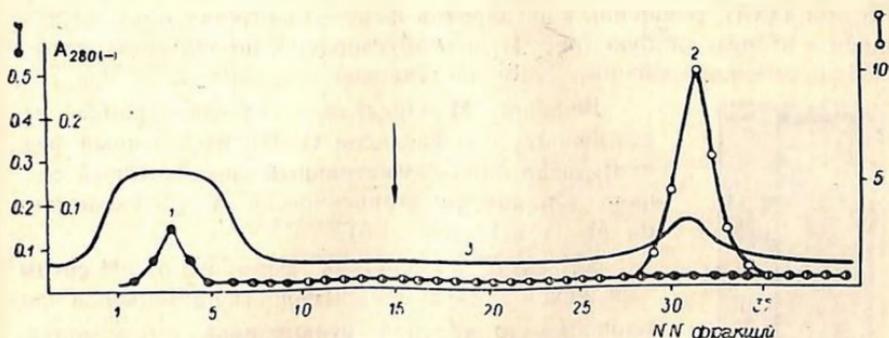


Рис. 2. Ионообменная хроматография на СМ-сефадексе С-50. Колонку (2,5×9 см) уравнивали 0,05 М Na-фосфатным буфером, рН 6,2. Элюцию проводили тем же буфером с линейным градиентом NaCl 0—0,3 М (300 мл) со скоростью 20 мл/ч. Собирали фракции по 6 мл. Стрелка показывает дачу градиента. 1—BANA-гидролизующая активность, 2—протеолитическая пепстатиннечувствительная активность, 3—содержание белка

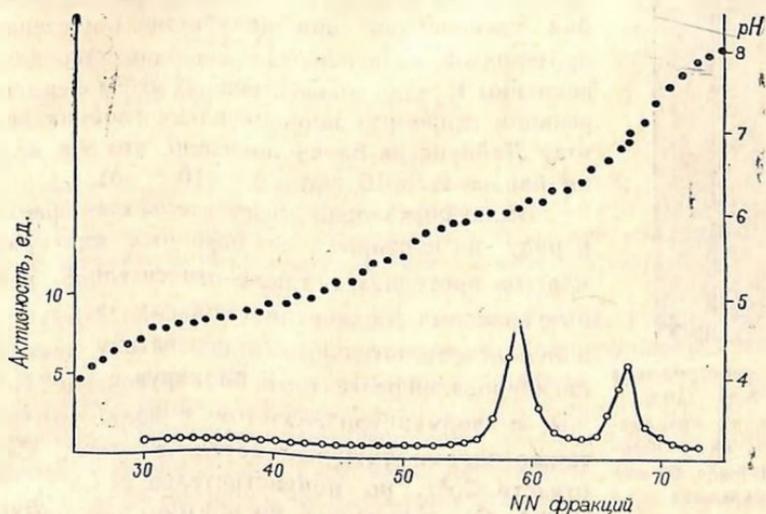


Рис. 3. Электрофокусирование очищенного препарата катепсина S

NaCl 0—0,3 М. На рис. 2 видно появление двух пиков: 1-й пик, который не адсорбировался на колонке, обладал способностью гидролизовать BANA; 2-й пик—первоначально сорбирувавшийся на колонке, а затем элюируемый приблизительно 0,1 М NaCl, обладал пепстатиннечувствительной протеолитической активностью. Фракции, образующие 2-й пик.

объединили и диализовали против дистиллированной воды. Как видно из табл. 1, фермент был очищен в 607 раз.

Характеристика препаратов фермента. Изоэлектрическое фокусирование очищенного препарата цистеиновой протениназы показало наличие множественных форм с pI 6,1 и 6,9 (рис. 3). Электрофорез в 10%-ном ПААГ очищенных препаратов фермента выявил одну четкую полосу и вторую слабую (рис. 4), что обусловлено, по-видимому, существованием множественных форм цистеиновой протениназы.

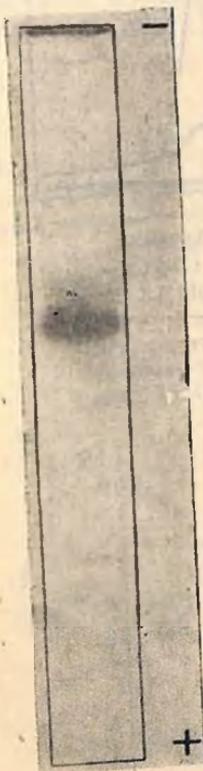


Рис. 4. Электрофорез в ПААГ (10%) очищенного препарата катепсы на S . Образец содержал 60 мкг фермента

Величину M определяли гель-фильтрацией через колонку с сефадексом G-100. Выделенный фермент давал один симметричный пик, который совпадал с пиком химотрипсиногена А, что указывает на M 25 кД (рис. 1,б).

Зависимость действия фермента от pH среды определяли измерением активности цистеиновой протениназы в стандартной реакционной смеси, содержащей 0,05 М цитрат-фосфатные буферы с pH в интервале—2,6—7,0. Очищенный фермент имел широкий оптимум pH активности—3,7—5,2; его субстратная специфичность была тестирована относительно ряда веществ как белковой, так и пептидной природы. Из белковых субстратов только гемоглобин расщеплялся при инкубации с цистеиновой протениназой, из пептидных—ни один. Определение величины K_m для множественных форм фермента в реакции гидролиза пиридоксилгемоглобина по методу Лайнуивера-Берка показало, что эти величины близки $2,2 \times 10^{-5}$ М и $2,5 \times 10^{-5}$ М.

Была определена чувствительность фермента к ряду ингибиторов, специфичных для разных классов протениназ, а также относительно некоторых тиоловых соединений (табл. 2). Фермент оказался нечувствительным к пепстатину, полностью ингибировался реагентами, блокирующими SH-группы— p -хлормеркурибензоатом и йодацетамидом, а также ионами тяжелых металлов— Zn^{2+} , Cu^{2+} и отчасти Co^{2+} , но нечувствителен к Ca^{2+} , Mg^{2+} , ЭДТА. Специфические ингибиторы тиоловых протениназ—лейпептин и антипаин—при низких концентрациях полностью ингибировали активность фермента. Были определены величины K_i для множественных форм цистеиновой протениназы относительно лейпептина по методу Диксона; они оказались равными $1,2 \times 10^{-8}$ и $1,4 \times 10^{-8}$ М. Фермент активировался в значительной степени тиоловыми соединениями— β -меркаптоэтанолом, дитиотрейтолом и цистеином.

Таблица 1

Очистка катепсина S из коры полушарий мозга крупного рогатого скота

Фракция	Объем, мл	Белок, мг/мл	Общий белок	Общая активность	Удельная активность	Выход, %	Очистка
Гомогенат	580	5,8	3364	12180	3,62	100	—
Супернатант 100000×g	220	3,2	704	4840	6,8	39,7	1,8
Сефадекс G-10)	40	0,12	4,8	2920	608	23,9	167,9
СМ-сефадекс С-50	20	0,05	1	2200	2200	18	607

Таблица 2

Влияние некоторых соединений на активность катепсина S

Соединения	Концентрация	Относительная активность, %
Пепстатин	100 мг	100
Лейпестин	" "	0
Ангипалин	" "	0
п-хлормеркурибензоат	10 ⁻³ М	0
Йодоацетамид	" "	0
ЭДТА	" "	100
CoCl ₂	" "	62
ZnSO ₄	" "	0
CuSO ₄	" "	0
CaCl ₂	" "	100
MgCl ₂	" "	100
Бестатин	" "	100
Динизопропилфторфосфат	" "	100
Дитиотрейтол	" "	280
β-Меркаптоэтанол	" "	272
Цистеин	" "	256

Примечание. За 100% принимали активность, полученную при инкубировании 15 мкг фермента с 200 мкг пиридоксальгемоглобина в 0,05 М дитратном буфере, pH 3,7. При тестировании ряда соединений их инкубировали 10 мин при комнатной температуре с 15 мкг катепсина S, затем добавляли 200 мкг субстрата и инкубировали 3 ч при 37°

Таким образом, показано, что в головном мозгу крупного рогатого скота есть цистеиновая протеназа, гидролизующая гемоглобин при кислых значениях pH в присутствии пепстатина и не расщепляющая низкомолекулярные субстраты BANA, ANA, Leu-Gly, Leu-Gly-Tyr и др. и такие белки, как азоказеин, протамин, альбумин, γ-глобулин. Классическим субстратом для цистеиновой протеназы, как и для катепсина D, является гемоглобин, но разделение этих двух ферментов происходит на стадии гель-фильтрации через сефадекс G-100; кроме того, фермент не ингибируется пепстатином—специфическим ингибитором аспарагиновых протеназ.

Для того, чтобы идентифицировать выделенный фермент, необходимо было сравнить его с другими тиоловыми протеназами—катепсинами B, H, L, S, T.

В отличие от катепсина В (преобладающей цистеиновой протеиназы) фермент не расщепляет BANA—классический субстрат для катепсина В—и низкомолекулярные пептиды. Кроме того, гомогенный препарат катепсина В из мозга телят не расщепляет гемоглобин [10]. Отделение катепсина В от выделенной нами цистеиновой протеиназы происходило на стадии хроматографии на СМ-сефадексе С-50 (катепсин В не сорбировался на колонке).

Тот факт, что фермент не расщепляет ариламидные субстраты BANA и не обладал аминопептидазной активностью—не гидролизовал аргинил-2-нафтиламид и не ингибировался бестатином (табл. 2), позволяет исключить его принадлежность к катепсину Н. Фермент не способен к гидролизу азоказеина—классического субстрата для катепсинов L и T [11, 12]. Тиолзависимые катепсины В₂ и С имеют М 50 и 210 кД соответственно и практически не обладают эндопептидазной активностью.

Все это свидетельствует о том, что выделенная нами из мозга крупного рогатого скота цистеиновая протеиназа является катепсином S. Получение в чистом виде этого фермента способствует изучению его роли в метаболизме белков, специфичных для нервной ткани, и в образовании нейропептидов из предшественников.

PURIFICATION AND PROPERTIES OF BRAIN CATHEPSIN S

BARKHUDARYAN N. A., AZARYAN A. V.

Institute of Biochemistry, Armenian SSR Academy of Sciences, Yerevan

Cathepsin S (E. C. 3.4.22—) was isolated from cattle brain by a procedure involving fractionation with ammonium sulfate (20—80%), gel filtration on Sephadex G-100 and CM-Sephadex C-50 ion-exchange chromatography. The enzyme was purified 600-fold. It was assayed fluorometrically at pH 3,7 in the presence of pepstatin, the substrate used was haemoglobin, modified with pyridoxal-5'-phosphate. Isoelectric focusing of the purified enzyme indicates that it exists in cattle brain in two multiple forms with pI 6,1 and 6,9. Some of their properties have been studied. They are highly sensitive to leupeptin with $K_i 1,2 \times 10^{-8}$ M and $1,4 \times 10^{-8}$ M, K_m of pyridoxylhaemoglobin is determined to be $2,2 \times 10^{-5}$ M and $2,5 \times 10^{-5}$ M. Cathepsin S has a broad pH optimum 3,7—5,2 and M about 25 kDa. It hydrolyses neither albumin, γ -globulin, azocasein, protamin nor benzoyl-arginyl- β -naphthylamide, arginyl- β -naphthylamide, di- and tripeptides. The availability of the purified preparation of cathepsin S from brain will facilitate studies on the role of this lysosomal cysteine endopeptidase in the turnover of proteins and in the processing of neuropeptides.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Turnsek T., Kregar I., Lebez D. *Biochim. Biophys. Acta*, 403, 514—520, 1975.
2. Turk V., Kregar I., Gubensek F., Popovic T., Locnicar P., Lah T. *FEBS*, 60, 317—330, 1980.
3. Болей П., Киришке Х., Лангнер Ю., Райман С., Салама З. и др. Структура и функция лизосом (под ред. Дебова С. С.), Новосибирск, с. 3—4, 1980.
4. Акопян Т. Н., Карабаджян Л. В., Арутюнян А. А., Галоян А. А. *Биол. ж. Армении*, 31, 6, 612—615, 1978.
5. Davis B. J. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 121, 404—427, 1964.
6. Lowry D. H., Rosebrough N. Y., Farr A. L., Randall R. J. *J. Biol. Chem.*, 193, 265—275, 1951.
7. Andrews P. *Biochem. J.*, 96, 595—606, 1965.
8. Акопян Т. Н., Оганисян А. И., Арутюнян А. А., Арзуманян А. М., Галоян А. А. *Биол. ж. Армении*, 30, 11, 57—61, 1977.
9. Langner J., Wakil A., Zimmerman M., Ansorge S., Bohley P., Kirschke H., Wiederanders B. *Acta Biol. Med. Germ.*, 31, 1—18, 1973.
10. Suhr A., Marks N. *Eur. J. Biochem.*, 101, 23—30, 1979.
11. Kirschke H., Langner J., Wiederanders B., Ansorge S., Bohley P. *Eur. J. Biochem.* 74, 293—301, 1977.
12. Gohda E., Pitot H. C. *J. Biol. Chem.*, 256, 5, 2561—2572, 1981.

Институт биохимии
АН АрмССР, Ереван

Поступила 21. XII 1982