

ОЧИСТКА ЦИСТАТИНОВ ИЗ МОЗГА БЫКА

А. Г. АГАДЖАНИН, Т. Н. АКОПЯН, А. М. АРЗУМАНЯН, А. А. АРУТЮНЯН,
Р. А. КАЗАРЯН, Л. В. КАРАБАШЯН

Институт экспериментальной биологии АН Армянской ССР, Ереван

Ключевые слова: мозг, цистеиновые протеиназы, белковый ингибитор.

Исследования последних лет позволяют многие нейроактивные пептиды рассматривать в качестве нейротрансмиттеров или нейромодуляторов [11]. Поскольку для большинства пептидов не удается обнаружить системы обратного захвата нервными окончаниями, протеолитическое расщепление представляется наиболее вероятным путем их биологической инактивации. Рядом авторов установлено, что как цитозоль, так и плазматические мембраны синапсом содержат спектр ферментов, способных расщеплять биоактивные пептиды [4, 5]. Результаты изучения влияния различных ингибиторов на эти ферменты показали, что в процессе деградации пептидов основную роль играют цистеиновые и металлосодержащие протеазы. Хотя исследования по изучению расщепления нейропептидов под действием изолированных ферментов и ферментативных систем ЦНС интенсивно развиваются, мало что известно о путях регуляции этих ферментов.

Известно, что регуляция действия протеолитических ферментов в клетке может осуществляться путем их взаимодействия со специфическими ингибиторами белковой природы. В частности, установлено, что ряд тканей животных и человека содержат белковые ингибиторы (мол. масса 10—14 кДа), подавляющие активность цистеиновых протеиназ [6, 8]. По предложению Барретта [2], эти ингибиторы, по аналогии с выделенным из яичного белка ингибитором цистеиновых протеиназ, были названы цистатинами.

В данной работе приводятся результаты очистки и изучения некоторых свойств двух ингибиторов цистеиновых протеиназ из мозга быка.

Материал и методика. Определение молекулярной массы очищенных ингибиторов проводили с помощью гель-фильтрации на предварительно откалиброванной колонке гелфадекса G-75 (Pharmacia, Швеция) [3]. В качестве стандартных белков использовали альбумин—67, овальбумин—45, миоглобин—17,8, цитохром С—12,3 кДа (Serva, ФРГ). Иммобилизацию папаина на сефарозе 4В, активированной ВгCN-ом, проводили по описанному методу [2]. Электрофорез в ПААГ в присутствии ДДС-натрия проводили, не используя 15%-ный гель в трис/глициновом буфере (pH 8,9) [9]. Гели окрашивали в 0,5%-ном кумаси R-250. Белок определяли по методу Лоури [10], используя

зую в качестве стандартного белка альбумин бычьей сыворотки. Изoeлектрофокусирование проводили в колодке ($V=110$ мл, IKB), используя амфолины при pH 3—10 (Pharmacia, Швеция). Активность папаина оценивали по реакции расщепления пиримидиаль-Р-гемоглобина [1]. Ингибиторную активность полученных белков определяли в пересчете на степень ингибирования папаина. За единицу активности ингибиторного белка принимали такое его количество, которое ингибирует активность 0,1 мкг папаина. При изучении свойств цистатинов SH-связывающие, восстанавливающие и деиндурирующие реагенты отдельно инкубировали с цистатином в течение 30 минут. Значение K_i высчитаны по [7].

Результаты и обсуждение. Очистку цистатинов проводили следующим образом: экстракт мозга (0,025 М фосфатный буфер, pH 6,5, содержащий 10^{-3} М ЭДТА, 1%-ный NaCl и 1%-ный бутанол) после центрифугирования при 2000 г подвергали щелочной обработке (pH 11) с помощью 3 н NaOH и после 2-часового охлаждения pH раствора доводили до 6,5 добавлением 2 н HCl. Смесь вновь охлаждали в течение 2 ч, после чего центрифугировали 2000 г 30 минут. Ингибиторный материал выделяли из полученного супернатанта путем фракционирования ацетоном (50—70%). Полученный осадок растворяли в 0,05 М фосфатном буфере (pH 6,5), содержащем 0,5 М NaCl и 0,1%-ный тритон X-100. Экстракцию ингибиторной активности проводили в течение 18 ч при 4° на магнитной мешалке. Смесь центрифугировали, и разделение белков в супернатанте проводили путем гель-фильтрации на колонке сефадекса G-75 (4,5×45 см), уравновешенной 0,05 М фосфатным буфером (pH 6,5). Ингибиторный материал элюировался двумя пиками активности, соответствующими молекулярным массам 25 и 11 кДа. Дальнейшую очистку ингибиторов осуществляли с помощью аффинной хроматографии на колонке сефарозы 4В, на которой предварительно был иммобилизован карбоксиметилированный папаин. На колонку, уравновешенную 0,05 М NaCl и 0,1%-ным тритоном X-100, в отдельности наносили ингибиторный материал с M_r 25 и 11 кДа и проводили элюцию балластных белков тем же буфером. Цистатины элюировали с колонки с помощью 0,05 М K_2HPO_4 (pH 11,5), содержащего 0,5 М NaCl и 0,1%-ный тритон X-100. Полученные белковые зоны с ингибиторной активностью сгущали с помощью фильтра Амикон (UM-2). При электрофорезе в ПААГ в присутствии ДДС натрий цистатин с молекулярной массой 11 кДа обнаруживается в виде одной белковой полосы, мигрирующей параллельно с цитохромом С.

В табл. 1 просуммированы результаты очистки цистатинов из мозга быка. Как видно из приведенных данных, один мкг каждого из очищенных ингибиторов подавляет активность 1,6 и 0,83 мкг папаина соответственно, что указывает на эквимоллярную стехиометрию ингибирования. Значения K_i равны $2,8 \times 10^{-11}$ М для белка с молекулярной массой 25 кДа и $1,3 \times 10^{-11}$ М для белка с молекулярной массой 11 кДа.

Изучение некоторых свойств изолированных цистатинов показывает, что на активность ингибиторов не влияют SH-связывающие реагенты, такие, как α -ЛМБ, 5,5'-дитиобис(2-нитробензойная кислота), практически не действуют также и восстанавливающие агенты — дитиотре-

Таблица 1. Очистка цистатинов из мозга быка

Стадии очистки	Белок, мг	Общая активность, ед.	Удельная активность, ед./мг	Выход активности, %
Экстракт после щелочной обработки	18650	87600	4.9	—
Фракционирование ацетоном	1140	63200	54.5	72.2
Сефадекс G-75	1—280	9880	35.3	11.3
	11—155	41450	274	47.3
КМ—папаин сефароза 4В	1—0.625	5630	8160	6.4
	11—1.4	27825	19570	31.8

Таблица 2. Влияние некоторых соединений на активность цистатинов из мозга быка

Соединение	Концентрация, М	Активность, %	
		Инг. I (25кДа)	Инг. II (11кДа)
L-цистеин	10^{-2}	82	95
Дитиотрейтол	10^{-9}	85	90
n-ХМБ	5×10^{-4}	100	100
Дитионис (2-нитробенз. кислота)	5×10^{-4}	100	100
Мочевина	6	86	100
Гуанидин хлорид	4	75	50
pH 7 (экспозиция 10 мин при 80°)		46	57
pH 2 (экспозиция 10 мин при 80°)		53	48

тол. цистеин. Активность ингибиторов понижается на 10–40% в присутствии депатурирующих агентов—мочевины (6 М), гуанидин гидрохлорида (4 М) (табл. 2). Экспозиция цистатинов при 80° и pH 2 и 7 приводит примерно к пятидесятипроцентной потере активности.

Изоэлектрическое фокусирование цистатинов показало, что белок с молекулярной массой 25 кДа локализуется в основном в зоне pH 4,7 (минорные компоненты обнаруживаются в областях pH 5,82; 7,3; 8,95), а ингибитор с молекулярной массой 11 кДа—в области pH 5,23. Исследование спектра действия ингибиторов показало, что очищенные цистатины, кроме папаина, подавляют активность и других цистеиновых протеиназ, таких, как фичин, катепсины В и Н, но не влияют на активность трипсина, химотрипсина, катепсина Д, субтилизина и термолизина.

Одна из возможных биологических функций этих ингибиторов может состоять в защите нейрoактивных пептидов и других важных растворимых белков от протеолиза, в частности, под действием лизосомальных протеиназ. В настоящее время этот вопрос находится в стадии изучения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Akopyan T. N., Barchudaryan N. A., Karabashyan L. V., Arutunyan A. A., Lajtha A. *Neurochem. Res.*, 4 365—370, 1979.
2. Anastasi A., Brown M. A., Kumbhani A. A., Nicklin M. J. H., Sayers C. A., Senter D. C., Barrett A. J. *Biochem. J.*, 211, 129—138, 1983.
3. Andrews P. *Biochem. J.*, 96, 595—606, 1965.
4. Arzumanyan A. M., Arutunyan A. A., Akopyan T. N. *Neurochem. Res.*, 10, 12, 1623—1634, 1985.
5. Berger H., Fechner K., Albrecht E., Niedrich H. *Biochem. Pharmacol.*, 28, 3173—3180, 1979.
6. Green G. D. J., Kumbhani A. A., Davis E., Barrett A. J. *Biochem. J.*, 218, 3, 939—946, 1984.
7. Green N., Work E. *Biochem. J.*, 54, 347—352, 1953.
8. Kopitar M., Stern F., Marks N. *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, 112, 3, 1000—1006, 1983.
9. Laemli V. K. *Nature*, 227, 680—685, 1970.
10. Lowry O. H., Resenbrough N. J., Farr A. L., Randal R. I. *J. Biol. Chem.*, 193, 265—275, 1951.
11. Snyder S. H., Innis R. B. *Ann. Rev. Biochem.*, 4, 755—782, 1979.

Поступило 24.XI 1986 г.

Бюлл. ж. Армении, т. 40, № 4, 323—325, 1987

УДК 579.842.11.083.131

ГЕМОЛИТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ У НЕКОТОРЫХ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ СЕМЕЙСТВА *ENTEROBACTERIACEAE*

С. Т. МНАЦКАНОВ

Армянский НИИ эпидемиологии, вирусологии и медицинской
паразитологии им. А. Б. Алексаняна

Ключевые слова: гемолитическая активность, гемолизины, энтеробактерии.

Гемолитическая активность энтеробактерий, в частности *Escherichia coli*, является одним из первых факторов патогенности, обнаруженных у представителей семейства *Enterobacteriaceae*.

Еще в 1925 году А. Н. Добрихотова отмечала значительную роль гемолитических *E. coli* в этиологии токсических диспепсий у детей. Гемолитические эшерихии были выделены во многих регионах, особенно при групповых кишечных заболеваниях неустановленной этиологии [5]. Установлено, что у штаммов кишечной палочки, выделенных при диареех, частота продукции гемолизиннов колебалась в пределах 53—86,5% [1, 8]. Гемолитические эшерихии играют большую роль в инфекционной патологии животных [2, 3, 4]. Однако способность к продукции гемолизиннов выявляется не только у *E. coli*. Показано, что гемолитическая активность высокостабильна и резко выражена у сальмонелл [7]. Способность к синтезу гемолизина была обнаружена и у штамма *Proteus morganii*, выделенного у ребенка с тяжелой токсической диспепсией [5].

В то же время остается малоизученной частота распространения способности продуцировать гемолизины у многих представителей семей-