

УДК 577.156

ОЧИСТКА И ИЗУЧЕНИЕ СВОЙСТВ ВЫСОКОМОЛЕКУЛЯРНОЙ АСПАРАГИНОВОЙ ПРОТЕИНАЗЫ ИЗ МОЗГА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

БАРХУДАРЯН Н. А., АЗАРЯН А. В.

Используя осаждение сульфатом аммония (30—70%), гель-фильтрацию на колонке с сфадексом G-100, аффинную хроматографию на пепстатин-сефарозе, была выделена в электрофоретически гомогенном состоянии высокомолекулярная аспарагиновая протеиназа. Активность фермента определяли флуориметрически при pH 3,2, используя в качестве субстрата пиридоксилгемоглобин. M фермента 100 кД. K_m относительно пепстатина— 10^{-8} М, K_m относительно субстрата пиридоксилгемоглобина— 10^{-5} М, pI 5,6, а оптимум pH 3,2. По ряду свойств (pH оптимум, субстратная специфичность, чувствительность к ингибиторам) фермент подобен катепсину D, выделенному из того же источника.

В нормальных и патологически измененных тканях различных животных наряду с основной лизосомной аспарагиновой протеиназой—катепсином D [1] была обнаружена высокомолекулярная аспарагиновая протеиназа (M 90—100 кД), классифицируемая одними авторами как катепсин E-подобный фермент [2—4], другими—как димер или предшественник катепсина D [5—9].

В настоящей работе сообщается об очистке и некоторых свойствах высокомолекулярной аспарагиновой протеиназы из коры больших полушарий мозга крупного рогатого скота.

Материалы и методы

Кору больших полушарий мозга крупного рогатого скота получали сразу после забоя животных и хранили при -20° . Навеску в 200 г в 400 мл 0,05 М цитратного буфера, pH 3,9, содержащего 0,2% тритон X-100, гомогенизировали в гомогенизаторе типа Поттер, а затем центрифугировали 1 ч при 100000 g.

Приготовление аминоксилсефарозы-4В. Активированную бромцанном сефарозу-4В на стеклянном фильтре тщательно промывали холодной дистиллированной водой. 3 г геля (мокрый вес) растворяли в 3 мл 10% диаминогексана, предварительно оттитрованного 6 н. HCl до pH 10,1 и медленно перемешивали на магнитной мешалке в течение 24 ч при 4° . Полученную аминоксилсефарозу-4В промывали 1 л холодной дистиллированной воды и 500 мл диоксана.

Пепстатин-аминогексилсефарозу-4В готовили из 3,5 мг пепстатина, 2,1 мг N, N'-дициклогексилкарбодимида и 1,2 мг N-гидроксисукцинимиды, которые растворяли в 1,5 мл N, N'-диметилформамида. Смесь помешивали 24 ч при 4° и к ней добавляли диоксановую суспензию аминогексилсефарозы-4В. Реакция присоединения проходила при постоянном помешивании в течение 24 ч при комнатной температуре. После этого гель промывали последовательно 100 мл раствора диоксан: N, N'-диметилформамида (1:1); 300 мл дистиллированной воды, 300 мл 0,05 М трис-НСI буфером, рН 8,5, содержащим 1 М NaCl, снова дистиллированной водой и 100 мл 0,05 М цитратного буфера, рН 3,9 (уравновешивающий буфер при аффинной хроматографии). Несвязанный пепстатин в промывной жидкости определяли по торможению активности пепсина; для его удаления гель промывали 4 М мочевиной, затем уравновешивающим буфером и упаковывали в колонку (0,8×5 см).

Электрофорез белков в 7,5%-ном ПААГ проводили по методу Davis [10] при 4°. Электродным буфером служил 0,025 М трис-глициновый буфер, рН 8,3. Электрофоретическое разделение вели 2 ч при 4° и силе тока 5 мА на трубку.

Для проведения электрофореза в присутствии додецилсульфата натрия (ДС-Na) белок обрабатывали 5 мин кипячением в 1%-ном ДС-Na, приготовленном на 0,1 М фосфатном буфере, рН 7,4, содержащем 0,1%-ный β-меркаптоэтанол. В электродный и гелевый буферы добавляли 0,1%-ный ДС-Na. Электрофоретическое разделение осуществляли в 10%-ном геле в течение 5—6 ч при комнатной температуре и силе тока 8 мА на трубку, затем гели фиксировали в 20%-ной ТХУ, красили 1%-ным раствором амидочерного 10 В в 7%-ной уксусной кислоте, отмывая до обесцвечивания фона.

Количество белка определяли по Lowry и соавт. [11], используя в качестве стандарта бычий сывороточный альбумин. При фракционировании на колонке с сефадексом G-100, хроматографии на пепстатинсефарозе и при изоэлектрическом фокусировании содержание белка определяли, используя фотометр «Uvicord 2» (ЛКВ, Швеция).

М белков определяли по методу Andrews [12]. Колонку с сефадексом G-150 (5×55 см), уравновешенную 0,025 М фосфатным буфером, рН 7,6, калибровали с помощью голубого декстрана (М 2000 кД), альдолазы (М 147 кД), щелочной фосфатазы (М 86 кД), сывороточного альбумина быка (М 67 кД), овальбумина (М 45 кД).

Активность высокомолекулярной аспаратиневой протенназы определяли флуорометрически [13], в качестве субстрата был использован гемоглобин, ковалентно связанный с пиридоксаль-5'-фосфатом (ПГ). Для определения ферментативной активности пробы объемом 0,6 мл, содержащие 0,05 М цитратный буфер, рН 3,2, 200 мкг субстрата ПГ и необходимое количество фермента, инкубировали при 37° в течение 60 мин. Реакцию останавливали добавлением 0,15 мл 30%-ной ТХУ. После центрифугирования при 5000 г рН проб доводили до 5,5 добавлением 0,3 мл 1 М натрий-цитратного буфера, рН 7,2. Количество кисло-

торастворимых пептидов определяли флуорометрически на спектрофлуориметре фирмы «Fargand Optical Co Inc.» (США). Флуоресценцию измеряли при 410 нм (возбуждение при 330 нм). Контролем служили субстрат и фермент, инкубированные отдельно. За единицу активности фермента принимали такое его количество, которое вызывает в течение 1 ч при 37° образование фосфопиридоксилпептида, соответствующего по флуоресценции 1 нмоль пиридоксамина.

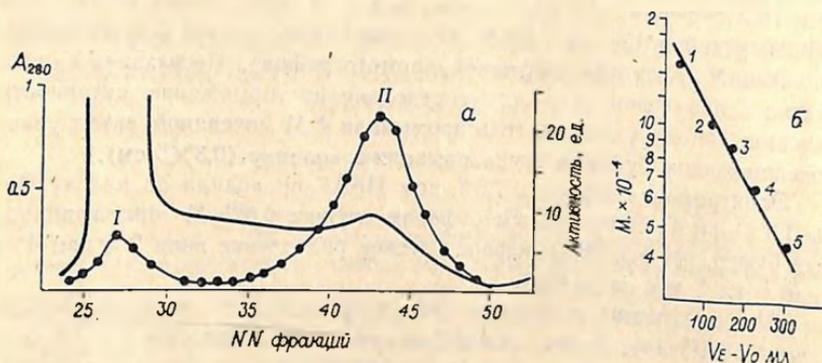


Рис. 1. Фракционирование белков из коры больших полушарий мозга, осажденных сульфатом аммония (30—70%), на сефадексе G-100, а—профиль элюции гидролизата пиридоксилгемоглобина при pH 3,2, элюцию проводили 0,025 М фосфатным буфером, pH 7,6 со скоростью 40 мл/ч. Цифрами обозначены пики эндопептидазной активности; б—определение М аспарагиновой протиназы, 2—аспарагиновая протениназа, 3—щелочная фосфатаза, 4—бычий сывороточный альбумин, 5—овальбумин. V_E —элюционный объем, V_0 —свободный объем

Действие фермента на 1%-ные белковые субстраты (бычий сывороточный альбумин, γ -глобулин, гемоглобин, протамин) определяли с помощью О-фталдигидрида при pH 3,2 [14].

ИЭФ проводили на колонке фирмы «ЛКВ» (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. ИЭФ продолжали 24 ч при 4° и напряжение колонку, достигал постоянной величины. По окончании электрофокусирования содержимое колонки собирали фракциями по 1,25 мл, и в них измеряли pH и ферментативную активность.

Результаты и обсуждение

Очистка фермента. Из коры больших полушарий головного мозга быка растворимые белки осаждали сульфатом аммония (30—70%). Полученный осадок отделяли центрифугированием, растворяли в 30 мл 0,025 М фосфатного буфера, pH 7,6 и наносили на колонку с сефадек-

сом G-100 (5×55 см), уравновешенную 0,025 М фосфатным буфером, рН 7,6. После гель-фильтрации на колонке с сефадексом G-100 были получены два пика с эндопептидазной активностью при рН 3,2 (рис. 1, а). Фермент, содержащийся во втором пике, был идентифицирован нами как катенсин D с М 50 кД. Первый пик, обладающий более высокой М, выходил в свободном объеме колонки, его активность составляла 5% от общей активности, определенной после гель-фильтрации. В данной статье рассматриваются свойства первого пика (рис. 1, а, фракции 26—28). 40 мл раствора белков первого пика доводили концентрированной HCl до рН 3,9 и наносили на колонку с пепстатин-сефарозой (0,8×5 см), уравновешенной 0,05 М цитратным буфером, рН 3,9, затем собирали вышедший белок и промывали колонку 0,05 М цитратным буфером, рН 3,9. Для элюции неспецифически сорбированных белков колонку промывали 0,05 М цитратным буфером, рН 3,9 с 0,5 М NaCl. Далее колонку последовательно промывали дистиллированной водой и элюирующим буфером, 0,1 М Na₂CO₃ с 0,5 М NaCl, рН 8,0 (рис. 2). Было получено 0,4 мг очищенного фермента. Все стадии очистки проводили при 4°.

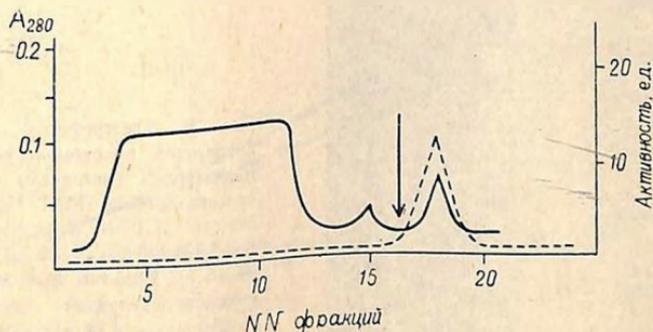


Рис. 2. Профиль элюции высокомолекулярной аспарагиновой протеиназы на колонке с пепстатин-сефарозой (0,8×5 см). (---) — активность фермента; (—) — поглощение при 280 нм. Стрелка показывает начало элюции буфером, 0,1 М Na₂CO₃ с 0,5 М NaCl, рН 8,0

Характеристика препаратов фермента. При электрофорезе в ПААГ (7,5%) очищенного препарата фермента получали 1 полосу. В случае электрофореза в ПААГ в присутствии ДДС-Na и β-меркаптоэтанола также получали 1 полосу, соответствующую М около 100 кД (рис. 3, а).

Методом ИЭФ установили, что высокомолекулярная аспарагиновая протеиназа имеет изоэлектрическую точку при рН 5,6.

При гель-фильтрации на колонке с сефадексом G-150 аспарагиновая протеиназа элюировалась одним симметричным пиком, который соответствует белкам с М 100 кД (рис. 1, б).

К_m исследуемого фермента в реакции гидролиза пиридоксилгемоглобина по методу Лайнуивера-Берка равна 10⁻⁵ М.

Изучена чувствительность фермента к ингибиторам, специфичным для разных классов протеиназ. Оказалось, что активность фермента практически не угнетается 10^{-3} М п-хлормеркурибензоатом, ЭДТА, йодуксусной кислотой, динизопропилфторфосфатом. Ингибитор пепсина β -фениллизин в той же концентрации примерно на 50% ингибирует активность фермента. Пепстатин, который, как известно, является ингибитором пепсина, ренина, гастрина и катепсина D [15—17], при низких концентрациях полностью ингибирует активность высокомолекулярной аспарагиновой протеиназы. Константа ингибирования (K_i) фермента относительно пепстатина по методу Диксона равна 10^{-8} М (рис. 4).

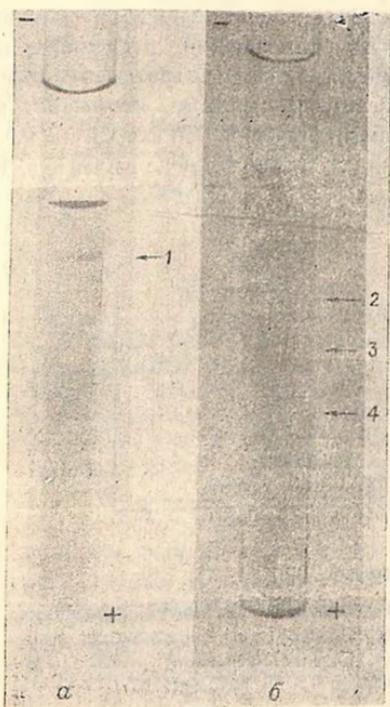


Рис. 3. Электрофорез очищенных препаратов высокомолекулярной аспарагиновой протеиназы (а) и катепсина D (б) в ПААГ (10%) в присутствии ДДС-Na и β -меркаптоэтанола. 1—М 100 кД; 2—50 кД; 3—35 кД; 4—15 кД. Образцы содержали 40 мкг высокомолекулярной аспарагиновой протеиназы и 60 мкг катепсина D.

Исследование pH-зависимости активности высокомолекулярной аспарагиновой протеиназы показало, что максимальная активность фермента приходится на pH 3.2. Его субстратная специфичность тестировалась с помощью следующих белковых субстратов—гемоглобина, альбумина, γ -глобулина, протаминсульфата. Полученные результаты показали, что фермент лучше всего гидролизует гемоглобин, значительно хуже альбумин и γ -глобулин (10 и 5% относительно гидролиза гемоглобина соответственно) и не расщепляет протаминсульфат.

Причислить исследуемый фермент к катепсину E мы не можем, так как оптимум pH катепсина E 2,5, он лучше расщепляет альбумин, чем гемоглобин, и является кислым белком—pI 4,1 [1, 18, 19]. По ряду

свойств—рН оптимум, субстратная специфичность, чувствительность к ингибиторам—фермент подобен катепсину D (КФ. 3.4.23.5), выделенному нами из того же источника.

Казаковой и Ореховичем [8] из миомы матки был выделен катепсин D с M 95 кД. При электрофорезе в присутствии ДДС-На фермент дает фрагменты с M 15,8 кД, 28,6 кД, 45 кД. Этими же авторами были получены очищенные препараты катепсина D из нормальной печени и селезенки, из опухолей селезенки и почки. Все они имеют M 45 кД. При электрофорезе в присутствии ДДС-На эти ферменты дают фрагменты с M 15,8 кД, 28,6 кД и незначительное количество белка с M 45 кД. Эти данные позволяют предположить, что высокомолекулярный катепсин D из миомы матки имеет димерную структуру.

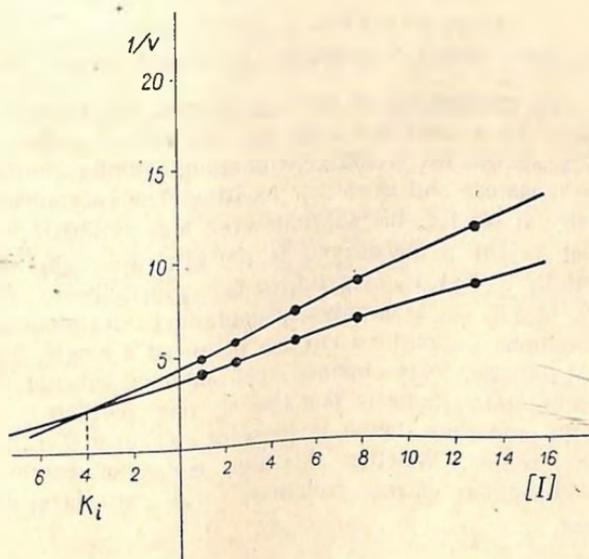


Рис. 4. Определение величины K_i относительно пепстатина. V —относительная флуоресценция: (1)—нг пепстатина в пробе. 10 мкг фермента инкубировали с набором концентраций пепстатина (1—20 нг) в течение 10 мин при комнатной температуре, затем добавляли 200 мкг или 400 мкг субстрата (ПГ) и инкубировали в течение 1 ч при 37°

Препараты выделенной нами высокомолекулярной аспарагиновой протениназы при электрофорезе в ПААГ в присутствии ДДС-На и β -меркаптоэтанола не распадаются на фрагменты. Это говорит о том, что высокомолекулярная аспарагиновая протениназа из коры больших полушарий мозга не является димером катепсина D из того же источника. При электрофорезе в ПААГ в присутствии ДДС-На препарата катепсина D, выделенного из коры больших полушарий головного мозга крупного рогатого скота, были получены фрагменты с M 15 и 35 кД и некоторое количество белка с M 50 кД (рис. 3, б).

Эти результаты согласуются с данными Tang и соавт. [9]. В селенке свиньи ими был обнаружен изофермент катепсина D с M 100 кД, который при электрофорезе в ПААГ в присутствии ДДС-Na дает одну полосу, соответствующую M 100 кД. На основе иммунологических исследований авторы предполагают, что изофермент с M 100 кД является предшественником катепсина D с M 50 кД (КФ. 3.4.23.5).

Дальнейшие исследования будут направлены на выяснение вопроса: является ли выделенная нами высокомолекулярная аспаргиновая протеиназа из коры больших полушарий мозга крупного рогатого скота самостоятельным ферментом или предшественником катепсина D.

A HIGH MOLECULAR WEIGHT ASPARTIC PROTEINASE FROM CATTLE BRAIN. PURIFICATION AND PROPERTIES

BARKHUDARYAN N. A., AZARYAN A. V.

Institute of Biochemistry, Armenian SSR Academy of Sciences, Yerevan

An aspartic proteinase has been purified to electrophoretically homogeneous state by a procedure involving ammonium sulfate fractionation (30–70%), Sephadex G-100 gel filtration, affinity chromatography on pepstatin-Sepharose and isoelectric focusing. The enzyme was assayed fluorometrically at pH 3.2, the substrate used was pyridoxil-hemoglobin. The molecular weight of the enzyme is 100 kDa, it's highly sensitive to pepstatin with K_i 10^{-6} M. K_m of pyridoxil-hemoglobin is 10^{-5} M, pH optimum is 3.2, pI 5.6. On SDS-polyacrylamide gel electrophoresis in the reducing conditions the purified enzyme produced a single band corresponding to M 100 kDa. Data obtained—pH optimum, substrate specificity, sensitivity to inhibitors—indicate that the enzyme purified is an aspartic proteinase with properties similar to those of cathepsin D (E. C. 3.4.23.5) from the same source. Whether this high molecular weight proteinase acts as an independent aspartic proteinase or as a precursor of cathepsin D is not clear.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Barrett A. J. Cathepsin D and other carboxyl proteinases in mammalian cells and tissues (Barrett A. J. ed.), North Holland, Amsterdam, 209—229, 1977.
2. Yamamoto K., Katsuda N., Kato K. Eur. J. Bioch., 92, 499—508, 1978.
3. Yamamoto K., Katsuda N., Nimeno, Kato K. Eur. J. Bioch., 95, 459—567, 1979.
4. Turk V., Kregar J., Gubensek F., Popovic T., Locnikar P., Lah T. FEBS Federation of European Biochemical Societies, 60, 317—330, 1980.
5. Yago N., Bowers W. E. J. Biol. Chem., 250, 4749—4754, 1975.
6. Bowers W. E., Beyer C. F., Yago N. Biochim. Biophys. Acta, 497, 272—280, 1977.
7. Yasani B., Yasani M. K., Talbot M. D. Biochem. J., 169, 287—295, 1978.
8. Казакова О. В., Орехович В. Н. Биохимия, 44, 10, 1762—1767, 1979.
9. Huang J. S., Huang S. S., Tang J. J. of Biological Chem., 254, 22, 11405—11417, 1979.
10. Davis B. J. Ann. N. Y. Acad. Sci., 121, 404—427, 1964.
11. Lowry D. H., Rosebrough N. Y., Farr A. L., Randall R. J. J. Biol. Chem., 193, 265—275, 1951.
12. Andrews P. Biochem J., 96, 595—606, 1965.
13. Акопян Т. Н., Карабациян Л. В., Арутюнян А. А., Галоян А. А. Биол. ж. Армении, 31, 6, 612—615, 1978.
14. Акопян Т. Н., Оганисян А. И., Арутюнян А. А., Арзуманян А. М., Галоян А. А. Биол. ж. Армении, 30, 11, 57—61, 1977.
15. Umezawa H., Aoyagi T., Morishima H., Matsuzaki M., Hamada H., Takachi J. J. Antibiotics, 23, 259—262, 1970.
16. Woessner J. F. Biochim. Biophys. Res. Commun., 47, 965—970, 1972.
17. Marks N., Grynbaum A., Lajtha A. Science, 181, 949—951, 1973.
18. Lapreste C., Webb T. Biochem. J., 84, 455—462, 1962.
19. Lapreste C.—In: Tissue Proteinases (Barrett A. J., Dingle J. T., eds.), North Holland Publishing Co, Amsterdam, p. 135—155, 1971.

Институт биохимии
АН АрмССР, Ереван

Поступила 21. XII 1982