



УДК 577.152

УМБЕЛЛИФЕРИЛ-ГЕМОГЛОБИН—НОВЫЙ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЙ СУБСТРАТ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АКТИВНОСТИ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ

АЗАРЯН А. В., ВОЗНЫЙ Я. В., ГАЛОЯН А. А.

Институт биохимии АН АрмССР, Ереван

Осуществлен синтез гемоглобин-6-амидсукцинил-4-метилумбеллиферона и разработан флуоресцентный метод определения активности пептидгидролаз на его основе. Определение активности эндопептидаз проводится путем измерения сигнала флуоресценции умбеллиферильных остатков ТХУ-растворимых пептидов, образующихся в процессе ферментативного гидролиза. Метод применен для определения активности трипсина, пепсина, панаина и пептидгидролаз головного мозга: катепсина D (КФ 3.4.23.5), катепсина В (КФ 3.4.22.1) и высокомолекулярной аспартильной пептидазы (ВАП) (КФ 3.4.23.—). Предложенный метод позволяет определить не менее 10 пмоль превращения субстрата.

В последнее время для определения активности пептидгидролаз все шире применяются низкомолекулярные флуоресцентные пептиды [1—4]. Однако для рутинного (особенно в ходе очистки) определения активности пептидаз, отдающих предпочтение макромолекулярным субстратам (аспартильные катепсины), целесообразнее использовать белки (гемоглобин, казеин и др.), содержащие радиоактивную метку [5, 6] или флуорофор [7—12].

Производные кумарина относятся к числу наиболее мощных флуорофоров [13, 2], и конъюгаты 4-метилумбеллиферона (4-МУФ) широко используются для определения активности лизосомных гидролаз [14—18]. В литературе описан случай применения производного 4-МУФ в качестве субстрата пептидаз, однако 4-МУФ-казеин оказался резистентным к действию катепсина В [19].

Задачей настоящего исследования являлась разработка нового метода определения активности пептидаз с применением в качестве субстрата умбеллиферильного производного гемоглобина для сопоставления его по эффективности, с одной стороны, с 4-МУФ-казеином, с другой— с дансил-гемоглобином [12].

Материалы и методы

В работе использовали денатурированный гемоглобин лошади («Worthington», США), пепсин («Nutritional Biochem, Co», США) и 108

папаин («Fluka», Швейцария), спектральные измерения производили на спектрофотометре («Unicam», Великобритания) и спектрофлуорометре («Perkin Elmer MPF 44A», США). ТСХ проводили на пластинках Silufol UV—254 (УССР) с обнаружением пятен УФ-облучением и последующим опрыскиванием раствором бромкрезолового пурпурного. Хроматомасс-спектр 4-метил-6-амидосукциноил-7-гидроксикумарина снимали на приборе MS-30 («Kratos», ФРГ).

Ферменты. Катепсин В выделяли из коры больших полушарий головного мозга быка согласно методу, предложенному для одновременной очистки катепсинов В, Н и L из мозговой ткани [20]. Активность катепсина В при выделении фермента определяли флуорометрически при рН 6,0 в присутствии 2 мМ дитиотрептола и 2 мМ Na_2 ЭДТА по гидролизу 4-метокси- β -нафтиламида карбобензокси-L-аргинил-L-аргинина по методу, описанному в литературе [21]. Активность катепсина В по гидролизу β -нафтиламида бензонил-D, L-аргинина составляла 4,3 ед./мг белка.

Катепсин D и высокомолекулярную аспартильную пептидазу (ВАП) выделяли из того же источника с помощью процедуры, включающей аффинную хроматографию на пепстатин-сефарозе, как описано ранее [22, 23]. Активность катепсина D и ВАП по гидролизу пиридоксилгемоглобина составляла 90 000 и 10 000 ед./мг белка соответственно.

Индивидуальность полученных препаратов ферментов доказана диск-электрофорезом в ПААГ и ИЭФ.

Синтез субстрата гемоглобин-6-амидосукциноил-4-метилумбеллиферона.

4-метил-6-амидосукциноил-7-гидроксикумарин. 100 мг 4-метил-6-амино-7-гидроксикумарина (т. пл. 270°, R_f 0,50 в этилацетате) и 100 мг янтарного ангидрида перемешивали в течение часа в 5 мл 96% этанола. Затем прибавляли 25 мл этанола, нагревали до кипения, фильтровали через бумажный фильтр и выдерживали при -10° в течение ночи. Выпавшие кристаллы отфильтровывали и высушивали на воздухе. Получили 90 мг (выход 58%) 4-метил-6-амидосукциноил-7-гидроксикумарина, т. пл. 255—257°, R_f 0,35 в этилацетате, в масс-спектре молекулярный ион отсутствует, самый интенсивный ион 274 (МН— H_2O).

N-гидроксисукцинимидный эфир 4-метил-6-амидосукциноил-7-гидроксикумарина. 90 мг 4-метил-6-амидосукциноил-7-гидроксикумарина растворяли при нагревании в 30 мл абсолютного ТГФ, раствор охлаждали до комнатной температуры и прибавляли 42 мг N-гидроксисукцинимид и 74 мг дициклогексилкарбодимида. Выдерживали при 10° в течение ночи. Осадок отфильтровывали, раствор упаривали и получали 120 мг (100%) кристаллического активированного эфира, который использовали без дополнительной очистки.

Гемоглобин-6-амидосукциноил-4-метилумбеллиферон (4-МУФ-гемоглобин). 100 мг денатурированного гемоглобина растворяли в 10 мл 0,08 М Na-боратного буфера, рН 9,1 и постепенно добавляли 24 мг N-гидроксисукцинимидного эфира 4-метил-6-амидосукциноил-7-гидроксикумарина. Реакцию проводили в течение 5 ч при комнатной температуре

с непрерывным помешиванием. Полученный гемоглобин-6-амидосуцинионил-4-метилумбеллиферон (4-МУФ-гемоглобин) диализовали против дистиллированной воды 48 ч и хранили при -10° .

Измерение активности ферментов с помощью 4-МУФ-гемоглобина. Пробы для измерения активности пепсина, папаина и трипсина объемом 0,6 мл содержали 400 мкг МУФ-гемоглобина и различные количества фермента в 0,05 М буфере, рН 3,2, 6,0 и 8,0 соответственно. После инкубации при 37° в пробу добавляли 0,15 мл 30%-ной ТХУ и центрифугировали при 6000 об/мин. Надосадочную жидкость разводили в 10 раз добавлением 0,2 М Na-глицинового буфера, рН 10,3 и измеряли интенсивность флуоресценции полученного раствора на спектрофлуориметре ($\lambda_{\text{возб.}}$ 365 мн, $\lambda_{\text{исп.}}$ 455 нм). Контролем служили образцы субстрата и фермента, инкубированные раздельно.

Результаты и обсуждение

Характеристика 4-МУФ-гемоглобина. Для обеспечения достаточной степени модификации гемоглобина мы использовали 40-кратный молярный избыток N-гидроксисуцинимидного эфира 4-метил-6-амидосуцинионил-7-гидрокси-кумарина. Эффективность привязки флуорофора была доказана появлением полосы поглощения при 355—365 нм у растворов конъюгированного гемоглобина при рН 10,3 (рис. 1); у неконъюгированного гемоглобина эта полоса практически отсутствует.

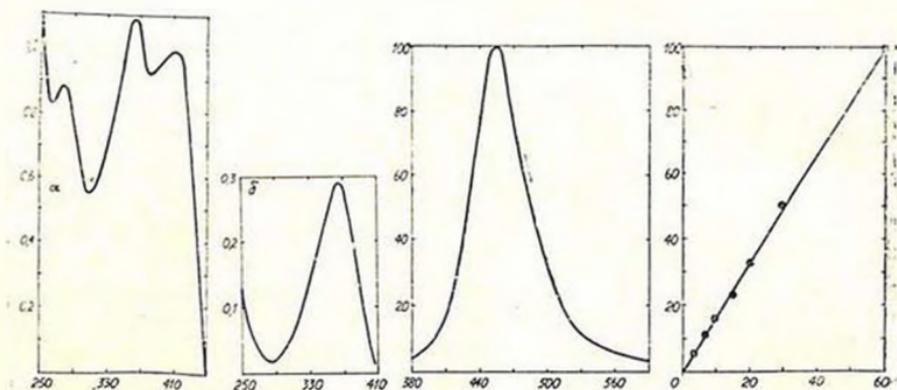


Рис. 1. Спектр поглощения (а) и дифференциальный спектр поглощения (б) 4-МУФ-гемоглобина. Концентрация белка—0,86 мг/мл, 0,2 М Na-глициновый буфер, рН 10,3. По оси абсцисс—длина волны, нм; по оси ординат—оптическая плотность, усл. ед.

Рис. 2. Спектр флуоресценции 4-МУФ-гемоглобина ($\lambda_{\text{возб.}}$ 365 нм). Концентрация 4-МУФ-гемоглобина 60 мкг/мл, 0,2 М Na-глициновый буфер, рН 10,3. По оси абсцисс—длина волны, нм; по оси ординат—относительная флуоресценция, усл. ед.

Рис. 3. Зависимость интенсивности сигнала флуоресценции от концентрации 4-МУФ-гемоглобина, рН 10,3. По оси абсцисс—концентрация 4-МУФ-гемоглобина, мкг/мл; по оси ординат здесь и на рис. 4. 5—относительная флуоресценция при 455 нм ($\lambda_{\text{возб.}}$ 365 нм), усл. ед.

Регистрация спектров флуоресценции полученного 4-МУФ-гемоглобина показала, что при возбуждении 365 нм максимум его флуоресценции—455 нм (рис. 2). Те же параметры были получены для аргинил-6-амидосукциноил-МУФ, 6-амидосукциноил-умбеллиферона и продуктов гидролиза 4-МУФ-гемоглобина трипсином, пепсином и папанином.

Квантовый выход флуоресценции 6-амидосукциноил-МУФ в этаноле и бикарбонатном буфере, рН 10,0 равен соответственно 1,16 и 1,2 (рассчитано относительно квантового выхода 4-МУФ в этаноле). Интенсивность флуоресценции 6-амидосукциноил-МУФ велика и зависит от рН: при рН 10,3 на 36% выше, чем при рН 7,4, и на 90% выше, чем при рН 4,6. Так как интенсивность флуоресценции 6-амидосукциноил-МУФ максимальна при рН 10,3, когда гидроксильная группа в положении 7 полностью ионизирована, при определении ферментативной активности рН надосадочной жидкости (после осаждения негидролизованного МУФ-гемоглобина) доводили до 10,3 с помощью 0,2 М Na-глицинового буфера.

Обнаружена линейная зависимость между интенсивностью флуоресценции и концентрацией субстрата в исследованном интервале концентраций 4-МУФ-гемоглобина 3—60 мкг/мл (рис. 3).

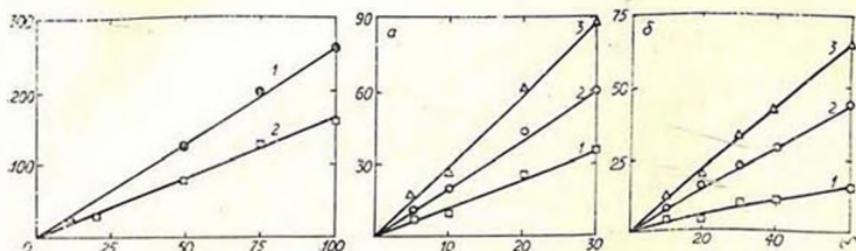


Рис. 4. Зависимость расщепления 4-МУФ-гемоглобина от концентрации пепсина (1) и папанина (2). Фермент инкубировали с субстратом при 37° 30 мин в случае пепсина и 1ч в случае папанина. По оси абсцисс—концентрация фермента, нг/мл.

Рис. 5. Зависимость расщепления 4-МУФ-гемоглобина пепсином (а) и папанином (б) от времени инкубации при 37°. По оси абсцисс—время инкубации фермента с субстратом, мин; а—инкубационная смесь содержала 400 мкг субстрата и 8,0 (1), 16,0 (2) и 25,0 (3) нг пепсина, рН 3,0; б—инкубационная смесь содержала 400 мкг субстрата и 15,0 (1), 30,0 (2) и 45,0 (3) нг папанина, рН 6,0.

Критерии оценки метода определения пептидгидролазной активности. Пропорциональность ферментативной активности концентрации фермента и времени инкубации с субстратом являются важными критериями оценки нового метода определения активности ферментов. Тест на пропорциональность ферментативной активности времени инкубации с субстратом был проведен с пепсином и папанином (рис. 5). Было показано, что 30-минутная инкубация пепсина с субстратом достаточна для получения максимального сигнала флуоресценции; в случае папанина необходима

одночасовая инкубация. Пропорциональность ферментативной активности концентрации фермента при фиксированном времени инкубации установлена для пепсина и папаина (рис. 4).

Чувствительность метода. Разработанный метод был использован для определения активности трипсина, пепсина, папаина, а также пептидгидролаз головного мозга быка, активных при кислых значениях pH: катепсинов В, D и ВАП. За единицу активности фермента при использовании в качестве субстрата 4-МУФ-гемоглобина принято такое количество фермента, которое вызывает в течение часа при 37° высвобождение R-6-амидосукциноил-МУФ, соответствующее по флуоресценции 0,15 мкмоль 6-амидосукциноил-МУФ. Метод позволяет определить нанограммовые количества папаина и пепсина и 0,1—0,3 мкг катепсинов В, D и ВАП. Кажущаяся K_m в реакции гидролиза 4-МУФ-гемоглобина катепсинами В и D составляет соответственно $4,6 \cdot 10^{-5}$ M и 10^{-5} M (определено по методу Лайнуивера-Берка). Таким образом, в отличие от 4-МУФ-казеина, данный субстрат может быть использован для определения активности как аспартильных, так и цистеиновых внутриклеточных пептидаз и по своей чувствительности не уступает дансил-гемоглобину [12].

Авторы выражают благодарность канд. хим. наук Козловой И. К. за ценные советы по синтезу 4-метил-6-амино-7-гидрокси-кумарина и Трушкиной И. В. за масс-спектральный анализ.

UMBELLIFERYL-HEMOGLOBIN- A NOVEL FLUORESCENT SUBSTRATE FOR PROTEINASE ASSAY

AZARYAN A., WOZNEY Y., GALOYAN A.

Institute of Biochemistry, ArmSSR Acad. Sci., Yerevan

Hemoglobin-6-amidosuccinoyl-4-methylumbelliferone has been synthesized and a fluorescent method for endopeptidase assay is developed using it as a substrate. Enzyme activity is estimated by measuring the fluorescence of TCA-soluble 4-methyl-umbelliferyl-conjugated peptides, produced by enzymatic hydrolysis, at 455 nm (excitation at 365 nm). The method satisfies the conditions for linearity of reaction velocity and incubation time and for proportionality with enzyme concentration. This substrate was utilized to determine activity of pepsin, papain, trypsin and peptidases from brain tissue: cathepsin B (EC 3.4.21.1), cathepsin D (EC 3.4.23.5) and high molecular weight aspartic proteinase. The apparent Michaelis constant for the catalysis of this substrate by cathepsin B and cathepsin D is $4,6 \cdot 10^{-5}$ M and 10^{-5} M respectively. In contrast with 4-methylumbelliferyl-casein, that is not split by cathepsin B, umbelliferyl-derivative of hemoglobin may be useful as a sensitive fluorescent macromolecular substrate for both cysteine and aspartic intracellular proteinases.

ЛИТЕРАТУРА

1. McDonald J. K., Ellis S. *Life Sci.*, v. 17, p. 1269—1276, 1975.
2. Barrett A. J., *Biochem. J.*, v. 187, p. 909—912, 1980.
3. Филиппова И. Ю., Лысогорская Е. Н., Оксенойт Е. С., Комаров Ю. Е., Степанов В. М. *Биоорг. химия*, т. 12, с. 1172—1180, 1986.
4. Kuromizu K., Shimokawa Y., Abe O., Izumitya U. *Anal. Biochem.*, v. 151, p. 534—539, 1985.
5. Hille H., Barrett A. J., Dingle J. T. *Exp. Cell. Res.*, v. 61, p. 470—472, 1970.
6. Bohley P., Mische C., Mische M. *Acta biol. et med. ger.*, v. 28, p. 323—330, 1972.
7. Chen R. *Arch. Biochem. Biophys.*, v. 128, p. 163—175, 1968.
8. De Lumen B. O., Tappel A. L. *Anal. Biochem.*, v. 35, p. 22—29, 1970.
9. Schwabe C. *Anal. Biochem.*, v. 53, p. 484—490, 1973.
10. Twining S. *Anal. Biochem.*, v. 143, p. 30—34, 1984.
11. Tisljar U., Denker H.—W. *Anal. Biochem.*, v. 152, p. 34—37, 1986.
12. Азарян А. В., Акопян Т. Н., Арутюнян А. А. *Лабор. дело*, т. 6, с. 337—339, 1981.
13. Crosby D., Berthold R. *Anal. Biochem.*, v. 4, p. 349—357, 1962.
14. Robinson D., Jordan T., Harsbergh T. *J. Neurochem.*, v. 19, p. 1975—1985, 1972.
15. Contractor S., Shane B. *Biochem. J.*, v. 128, p. 11—18, 1972.
16. Tallman J., Brady R., Quirk J., Ballalbe M., Gal A. *J. Biol. Chem.*, v. 249, p. 3489—3499, 1974.
17. Jacks T., Kircher H. *Anal. Biochem.*, v. 21, p. 279—285, 1967.
18. Isemura M., Kosaka H., Ikenaka T., Kido R., Yoshimura T. *J. Biochem.*, v. 84, p. 627—632, 1978.
19. Khalfan H., Abuknesha R., Robinson D. *Biochem. J.*, v. 203, p. 265—267, 1983.
20. Azaryan A., Galoyan A. *Neurochem. Res.*, v. 12, p. 207—214, 1987.
21. Barrett A. J., Kirschke H. *Methods Enzymol.*, v. 80C, p. 535—551, 1981.
22. Azaryan A., Акопян Т., Бунятян Н. *Biomed. Biochim. Acta*, v. 42, p. 1237—1246, 1983.
23. Azaryan A., Wiederanders B., Barkhudaryan N., Galoyan A.—In: *Aspartic Proteinases and their Inhibitors* (ed. V. Kostka), p. 123—127. W. de Gruyter, Berlin, 1985.

Поступила 14. VII 1987'