



УДК 577.153.156

КРИСТАЛЛИЗАЦИЯ КАТЕПСИНА D ИЗ ПЕЧЕНИ БЫКА

*Казакова О. В., Шуцкевер Н. Е., Орехович В. Н.**Институт биологической и медицинской химии
Академии медицинских наук СССР, Москва;**Институт молекулярной биологии Академии наук СССР, Москва*

Катепсин D из печени быка был выделен в гомогенном состоянии путем хроматографии на биоспецифическом сорбенте — пепстатин-сефарозе. Кристаллизацию фермента проводили путем медленного осаждения белка смесью этилового спирта и диоксана при pH 5, т.е. в изоэлектрической точке катепсина D. Получены кристаллы, разнообразные по форме, размером 50—300 мк.

В настоящее время внутриклеточные протеиназы животного происхождения (катепсины) активно изучаются в различных аспектах. Многие из этих ферментов выделены в высокоочищенном состоянии, однако ни один катепсин до последнего времени не был получен в кристаллическом виде. Разработка метода аффинной хроматографии катепсинов D (КФ 3.4.4.23) на базе конкурентного ингибитора кислых протеиназ — пепстатина [1] позволила во много раз сократить время препаративной процедуры и получать гомогенные высокоактивные препараты ферментов практически в одну стадию. Нами недавно были описаны кристаллы катепсина D из печени кур, полученного методом хроматографии на биоспецифическом сорбенте — пепстатин-сефарозе [2]. Однако нам пока не удалось получить кристаллы этого фермента размером более 50 мк, что, возможно, объясняется высоким содержанием углеводов в молекуле этого фермента. В связи с этим мы решили провести кристаллизацию катепсина D, в молекуле которого содержание углеводов значительно ниже. В качестве источника такого фермента мы взяли печень крупного рогатого скота.

Печень крупного рогатого скота измельчали в гомогенизаторе с равным объемом 0,05 M цитратного буфера (pH 3) в присутствии 0,2% детергента «Тритон-X-100». Цитратный экстракт фракционировали сульфатом аммония. Фракцию, выпадающую от 40 до 70% насыщения, обессоливали на колонках с сефадексом G-25, подкисляли 1 M CH_3COOH до pH 4, отделяли незначительный осадок, выпадающий при подкислении, и прозрачный раствор пропускали через колонку (80 × 22 мм) с пепстатин-сефарозой, содержащей 12 мл геля. При этом катепсин D полностью сорбировался на колонке. Колонку промывали 0,5 M раствором NaCl (pH 4) для удаления неспецифически сорбированных белков (раствор А на рис. 1), затем пропускали через нее небольшой объем воды. Как было показано нами ранее, комплекс пепстатина с катепсином D полностью диссоциирует в слабощелочной среде [3]. Фермент элюировали с пепстатин-сефарозы 0,1 M раствором бикарбоната Na, содержащим 0,5 M NaCl (раствор Б).

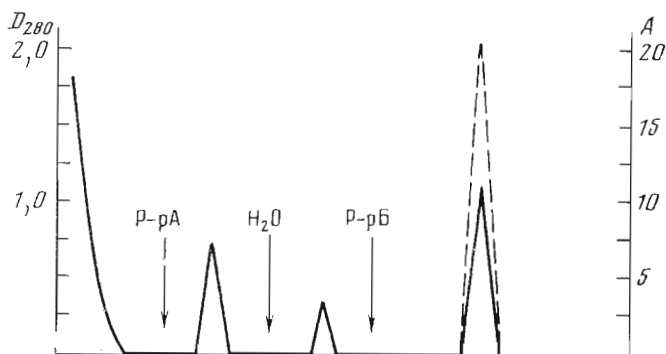


Рис. 1. Выделение катепсина D на пепстатин-сефарозе. Сплошная линия — оптическая плотность при 280 нм, пунктирная — протеолитическая активность (A), выраженная в единицах на 0,1 мл элюата

Выход фермента по белку и активности представлен в таблице. Полученные препараты иногда содержали ничтожную примесь пигмента, поэтому перед кристаллизацией процедуру аффинной хроматографии проводили повторно. Для этого раствор катепсина D, полученный с пепстатин-сефарозы, диализовали 3—4 ч на магнитной мешалке, pH раствора доводили до 4, добавляя по каплям 0,5 М CH_3COOH , и раствор снова наносили на колонку с пепстатин-сефарозой, предварительно отмытую 4 М

Очистка катепсина D из печени быка на пепстатин-сефарозе

| Стадия очистки | Белок, мг | Уд. активность | Выход по активности, % |
|--------------------------------------|-----------|----------------|------------------------|
| Сульфатная фракция, 40–70% насыщения | 12 310 | 0,2 | 100 |
| Препарат с пепстатин-сефарозы | 8,1 | 190 | 60 |

мочевинной и 0,1 М цитратным буфером, pH 3,9. После повторной элюции раствор катепсина D обессоливали диализом и концентрировали с помощью полиэтиленгликоля до концентрации белка 1,5—2%. Такие растворы использовали для кристаллизации фермента.

При электрофорезе в геле полиакриламида в препаратах обычно обнаруживали три близко расположенных изозимных компонента. Такие же результаты были получены Турком и сотр. [4] при аффинной хроматографии катепсина D из селезенки быка на гемоглобиновом сорбенте. Можно полагать, что препарат катепсина D из тканей быка в отличие от катепсина курицы содержит изозимные формы, преобразованные *in vivo*.

Наличие изозимных форм в препарате фермента не явилось препятствием для его кристаллизации. По предварительным данным, полученным в нашей лаборатории, катепсин D из печени кур, микрокристаллизацию которого мы недавно провели, содержит весьма высокий процент углеводов. Содержание глюкозамина, например, составляет ~10%. Катепсин D из печени быка оказался значительно беднее углеводами (1% глюкозамина). Возможно, по этой причине его кристаллизация осуществляется значительно легче, а кристаллы получаются крупнее.

Кристаллизацию фермента проводили в пробирках с внутренним диаметром 3,5 мм и высотой 35 мм [5]. В пробирки наливали по 0,15—0,2 мл 1,5—2% раствора белка в 0,05 М ацетатном буфере (pH 5), т. е. создавали условия, близкие к изоэлектрической точке фермента. На поверхность раствора капилляром осторожно наслаивали равный объем этилового спирта, содержащего 10% диоксана. Пробирки закрывали пленкой Ра-

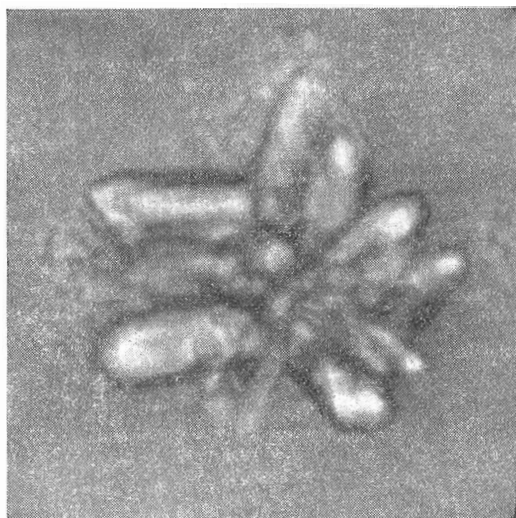


Рис. 2. Кристаллы катепсина D при увеличении в 1000 раз

gafilm и оставляли в холодной комнате на 3 сут. В результате медленной диффузии формировался мелкокристаллический осадок катепсина. Кристаллы имели несколько различных характерных форм (рис. 2): призмы, друзы, усеченные пирамидки и пятигранники. Наибольший размер монокристаллов составлял 50—70 мк. Для получения кристаллов большего размера пробирки с мелкокристаллическим осадком оставляли открытыми в течение 3 сут на холоду, причем спирт частично испарялся и кристаллы подтаивали. После этого на поверхность раствора снова наслаивали 0,1—0,15 мл этилового спирта и пробирки оставляли закрытыми на 3—4 сут. Затем их снова открывали и процедуру повторяли еще 3 раза. В результате в осадке обнаруживались отдельные монокристаллы размером до 300 мк.

Экспериментальная часть

Синтез биоспецифического сорбента пепстатин-сефарозы в отличие от наших предыдущих работ [1, 2] проводили с помощью водорастворимого карбодиимида 1-этил-3(3-диметиламинопропил)карбодиимида (ЭДК). 5 г отмытой АН-сефарозы (Pharmacia, Швеция) после промывания 50% диметилформамидом отжимали и к гелю добавляли раствор пепстатина (15 мг пепстатина в 20 мл 60% диметилформамида в 0,1 М ацетатном буфере, рН 5) и 12 мг ЭДК в 2 мл 50% диметилформамида в 0,1 М ацетатном буфере, рН 5. Конечная концентрация ЭДК в растворе составляла ~ 0,05 М. Смесь медленно перемешивали на магнитной мешалке. Первые 4 ч рН реакционной смеси поддерживали в пределах 4,5—5, добавляя по каплям 1 М CH_3COOH . Реакцию проводили 20 ч при комнатной температуре. Потом гель отделяли и тщательно промывали смесью диметилформамида и диоксана для удаления несвязанного пепстатина и затем большим объемом воды. Количество пепстатина в промывных водах определяли по торможению активности пепсина. В условиях опыта к сефарозе присоединялось 12 мг пепстатина, т. е. 3,42 мкмоль лиганда на 1 г сефарозы.

Активность катепсина определяли по расщеплению гемоглобина. За единицу активности принимали количество фермента, увеличивающее экстинкцию трихлоруксусного фильтрата при 280 нм на 1,0 в течение 1 ч. Состав пробы: 2 мл 1 % раствора гемоглобина (Reanal, Венгрия) в 0,1 М цитратном буфере (рН 3) и 0,1 мл раствора фермента; для осаждения белка добавляли 2 мл 5% трихлоруксусной кислоты.

Пепстатин — препарат фирмы Вануа Со (Япония) — был любезно предоставлен проф. Умегава. Полиэтиленгликоль (мол. вес 20 000) — препарат фирмы Мерск (ФРГ).

Авторы выражают благодарность Г. А. Песиной за высококвалифицированную помощь в работе.

ЛИТЕРАТУРА

1. Казакова О. В., Орехович В. Н. (1975) Биохимия, 40, 826—829.
2. Kazakova O. V., Orekhovich V. N. (1976) Biochem. and Biophys. Res. Commun., 72, 747—752.
3. Kazakova O. V., Orekhovich V. N. (1975) Int. J. Pept. Prot. Res., 7, 23—29.
4. Smith R., Turk V. (1974) Eur. J. Biochem., 48, 245—254.
5. Salem T. R. (1972) Arch. Biochem. and Biophys., 151, 533—539.

Поступила в редакцию
14.XII.1976

CRYSTALLIZATION OF CATHEPSIN D FROM BOVINE LIVER

KAZAKOVA O. V., SHUTSKEVER N. E., OREKHOVICH V. N.

*Institute of Biological and Medical Chemistry, Academy of Medical
Sciences of the USSR; Institute of Molecular Biology,
Academy of Sciences of the USSR, Moscow*

Cathepsin D from bovine liver was isolated in homogeneous state by chromatography on the biospecific adsorbent, pepstatin-Sepharose. Crystallization of the enzyme was effected by slow precipitation of 1.5% protein solution with the ethanol-dioxane mixture at pH 5.0 corresponding to the isoelectric point of cathepsin D. The crystals obtained were of various form and their size ranged from 50 to 300 microns.
