

УДК 612.015.13:152.34.611

Ендогенний інгібітор цистеїнового катепсину В із тканин головного мозку

О.Л. Лянна

Дніпропетровська медична академія МОЗ України, Дніпропетровськ, Україна

Запропоновано схему виділення та очищення ендогенного інгібітора лізосомного цистеїнового катепсину В, яка дозволила за 5 етапів (гомогенізація, висолування сульфатом амонію (30–80% насичення), гель-фільтрація на сефадексі G-150, іонообмінна хроматографія на ДЕАЕ сефадексі А-50, гель-хроматографія на сефадексі G-100) очистити антипротеїназу неокортексу людини у 640 разів. Методами графічного аналізу ферментативної кінетики проаналізовано характер взаємодії виділеного ендогенного інгібітора мозку із цистеїновим катепсином В, а також оцінено можливий механізм взаємодії отриманого інгібітора з даним ферментом. Виділений та очищений тканинний ендогенний білковий інгібітор є термостабільним, за механізмом зворотного конкурентного інгібування проявляє високий ступінь пригнічення активності цистеїнового катепсину В відносно специфічного хромогенного субстрату р-нітроаніліду N,α-бензоіл-D,L-аргініну. Запропонована схема виділення та очищення ендогенного інгібітора цистеїнового катепсину В із неокортексу людини має велике прикладне значення, оскільки завдяки досить нескладним маніпуляціям дозволяє отримати високоочищений препарат інгібітора цистеїнового катепсину В та провести аналіз кінетичних характеристик виділеного інгібітора, оцінити можливий механізм взаємодії з лізосомним цистеїновим катепсином В.

Ключові слова: методи білкової хімії; інгібітори протеолізу; катепсин В; неокортекс людини

An endogenous inhibitor of cysteine cathepsin B from brain tissues

O.L. Lyanna

Dnipropetrovsk Medical Academy of Ministry of Health of Ukraine, Dnipropetrovsk, Ukraine

Lysosomes are the key degradative compartments of the cell in which the processes of protein degradation take place. Lysosomal cathepsins, which are enclosed in the lysosomes, help to maintain the homeostasis of the cell's metabolism by participating in the degradation of heterophagic and autophagic material. When breaking down the integrity of lysosomal membranes the cathepsins are released into the cytosol and initiate the development of numerous pathological states. Breakdown in the control of protease activity leads to undesired and unregulated proteolysis. This is a cause of many diseases, such as Alzheimer's disease, cancer, viral infections, cataracts etc. For this reason inhibitors of proteases have the potential to provide successful treatment for a wide range of diseases. Cathepsin B is one of the most abundant and ubiquitously expressed cysteine peptidases of the papain family. It is implicated in a number of pathological states including: inflammatory diseases of the airways, bone and joint disorders, acute pancreatitis, tumour metastasis, Alzheimer's disease and ischemic neuronal death. The study of specific inhibitors for cathepsin B is considered important for chemotherapy and treatments of other diseases. This article represents part of a complex study of the lysosomal proteolytic-antiproteolytic system and its breakdown in the process of illness. In this article we present a scheme for extraction, purification and characterization of endogenous inhibitors of lysosomal cysteine cathepsin B. The cathepsin inhibitor was purified to homogeneity from the human neocortex. The purification was carried out in several successive stages: ammonium sulfate precipitation, followed by gel-filtration on Sephadex G-150, and ion exchange chromatography using DEAE-Sephadex A-75, followed by gel filtration on Sephadex G-100. Throughout the purification procedure, cathepsin inhibitory activity was controlled against the substrate p-nitroanilide N,α-benzoyl-D,L-arginine. Using graphic methods for analysis of enzymatic kinetics we proposed a mechanism of interaction of the endogenous inhibitor with cysteine cathepsin B. This scheme could prove useful for the understanding of biochemical mechanisms occurring in normal and, especially, in pathological human brain processes.

Keywords: protein chemistry methods; inhibitors of proteolysis; cathepsin B; human brain neocortex

Вступ

Для нормального функціонування організму надзвичайно важлива протеолітична активність. Серед усіх органел клітин тканин організму лізосоми володіють одним із найпотужніших гідролітичних потенціалів, через який і реалізується деградація білків (Kirkegaard et al., 2008; Voysa, 2012). Особливе місце серед лізосомних протеаз відводиться катепсинам, які представлені цистеїновими катепсинами та катепсином Д (Cherna et al., 2013). Активовані катепсини набувають величезної руйнівної сили. Їх загальна концентрація в лізосомах може перевищувати 1 мМ, тому для запобігання потенційно небезпечної надмірної деградації білків її необхідно ретельно контролювати. Порушення механізмів біологічного контролю протеолітичної активності супроводжує розвиток багатьох захворювань, серед яких рак, ревматоїдний артрит і остеоартрит, хвороба Альцгеймера, множинний склероз, м'язова дистрофія тощо (Turk, 2003; Mohamed et al., 2006; Conus et al., 2010; Reiser et al., 2010; Cherna et al., 2013). Одночасно із дослідженнями протеолітичних ферментів ведеться інтенсивне вивчення регуляторів їх дії – інгібіторів протеїназ (Katunuma, 2010; Turk et al., 2012).

Серед багатьох антипротеїназ крові та тканин ендогенні інгібітори цистеїнових катепсинів найменше вивчені, незважаючи на їх поширеність і високу ефективність відносно лізосомних ендопептидаз (Grzonka et al., 2001; Cherna et al., 2013). У літературі наведено результати досліджень інгібіторів, які містяться у печінці (Hirado et al., 1981), нирках (Leutscher et al., 1982), плазмі крові (Lenney et al., 1982), сечі (Taniguchi et al., 1981). Недостатньо вивченим є спектр антипротеїназ мозку, який має значний протеолітичний потенціал з істотним вмістом цистеїнових катепсинів. Цистеїновий катепсин В являє собою потужну та широко розповсюджену протеїназу, яка і досі викликає надзвичайний інтерес до вивчення через участь у патогенезі багатьох патологічних станів, зокрема пухлинної інвазії та метастазування (Gondi et al., 2013). Дослідження даного протеолітичного ферменту, а також шляхів регуляції його активності актуальне з метою з'ясування механізмів злоякісного росту та пошуку нових лікарських препаратів для нормалізації протеолізу в онкологічних хворих. Мета цієї роботи – виділити, очистити та охарактеризувати властивості ендогенного інгібітора лізосомної цистеїнової протеїнази мозку людини – катепсину В, описати деякі його фізико-хімічні властивості. Дана інформація може мати суттєве значення при дослідженні кількісних і якісних змін у метаболічних процесах мозку при патогенезі, особливо при онкологічних захворюваннях.

Матеріал і методи досліджень

Об'єкт дослідження – неокортекс головного мозку людини. Мозок людини отримували в Дніпропетровській обласній клінічній лікарні ім. І.І. Мечникова від жертв нещасних випадків. Аутопсію матеріалу проводили через 12 годин після смерті людей, які не мали ушкоджень ЦНС. Усі операції з головним мозком проводили

при 0...+4 °С. Гомогенати готували у співвідношенні 1 : 9 на 0,025 М трис-*HCl* буфері (*pH* 7,4), що вміщував 1 мМ ЕДТО та 0,15 М *NaCl*. Отримані гомогенати фракціонували сульфатом амонію в діапазоні 30–80% насичення. Надосадову фракцію піддавали діалізу проти дистильованої води, що вміщувала 0,15 М *NaCl*, або застосовували гель-фільтрацію на сефадексі G-25. Для подальшого виділення та очищення інгібітора головного мозку проводили гель-фільтрацію на колонці із сефадексом G-150 та іонообмінну хроматографію на ДЕАЕ сефадексі А-50. Всі колонки врівноважували 0,1 М фосфатним буфером, *pH* 6,0. Елюцію білків, що не зв'язалися з ДЕАЕ сефадексом А-50, проводили буфером, яким урівноважували колонку. Зв'язані з ДЕАЕ сефадексом А-50 білки елюювали 0,1 М фосфатним буфером, що вміщував 0,3 М *NaCl*. Визначення молекулярної маси проводили за допомогою електрофорезу в ПААГ із ДСН.

Для оцінки інгібіторної активності препаратів, отриманих із тканини мозку, їх піддавали попередній інкубації із 10% гомогенатом при температурі +37 °С протягом 15 хв. Далі до інкубаційної суміші додавали хромогенний субстрат *p*-нітроанлід *N*, α -бензоіл-ДЛ-аргінін (БАПА) «Fluka» (Швейцарія), за допомогою якого реєстрували залишкову активність катепсину В спектрофотометричним методом і виражали в одиницях активності (ОА) – мкмоль *p*-нітроанліну (*p*-НА) за 1 хв при +37 °С на 1 мг білка. Загальний білок вимірювали методом Бредфорд (Bradford, 1979).

Тип інгібування та кінетичні параметри взаємодії очищеного інгібітора із ферментом визначали, використовуючи методи графічного аналізу Лайнуївера, Берка та Діксона (Webb, 1966). Вибірки порівнювали з використанням *t*-критерію Стьюдента.

Результати та їх обговорення

При гель-фільтрації діалізату після 80% насичення сульфатом амонію на колонці із сефадексом G-150 виявляли одну фракцію, що вміщувала переважну кількість інгібітора, піддавали її подальшому очищенню. Ступінь очищення приблизно у 5 разів забезпечується гель-фільтрацією і зростає приблизно у 130 разів на етапі іонообмінної хроматографії на ДЕАЕ сефадексі А-50 відносно гель-фільтрації. Профіль елюції білка має вигляд трьох піків, найбільший з яких представлений білками (рис. 1), що зв'язалися з носієм колонки та елюювалися натрій-фосфатним буфером із 0,3 М *NaCl*, *pH* 6,0. Аналіз інгібіторної активності свідчить про те, що мінімальне значення активності катепсину В припадає на 12–13-ту фракції з третього піка білка (див. рис. 1). Для подальших досліджень використовували фракції з номерами 12–14, які наносили на колонку із сефадексом G-100 та елюювали 0,1 М натрій-фосфатним буфером із *pH* 6,0.

За результатами гель-фільтрації на сефадексі G-100 встановлено, що максимальне пригнічення активності катепсину спостерігається при використанні вмісту фракцій 5–6 (рис. 2).

За даними ЕФ у ПААГ із ДСН встановлено, що величина молекулярної маси отриманого ендогенного інгібітора цистеїнових катепсинів головного мозку людини в нормі дорівнює 7,5 кДа.

Виділений і очищений у 640 разів відносно гомогенату ендogenousний інгібітор катепсину В із неокортексу людини піддавали визначенню типу інгібування. Для цього використовували кінетичні залежності за Міхаелісом-Ментен, а для уточнення взаємодії виділеного інгібітора та катепсину В мозку людини застосовували залежність за Лайнуївером, Берком і Діксоном (Lyanna, 2007). Виділений нами інгібітор проявляє характер зворотного конкурентного інгібування. Відомо, що інгібітор, виділений із нирки людини, також виявляє конкурентний характер інгібування (Kirpichenok, 1987), при цьому встановлено значне споріднення даного білка

до катепсину В і папаїну. За даними літератури (Cherna, 2013), інактивація цистеїнових протеїназ відбувається конкурентним, зворотним інгібуванням. На відміну від інгібіторів серинових протеїназ, інгібітори цистеїнових протеїназ також формують комплекси із цистеїновими протеїназами, активні центри яких реагують із тіолблокувальними реагентами.

Із даних таблиці 1 випливає, що запропонована схема виділення дозволила за п'ять етапів очистити препарат тканинного ендogenousного білкового інгібітора цистеїнового катепсину В нервової тканини, який пригнічує активність даного ферменту на 88%.

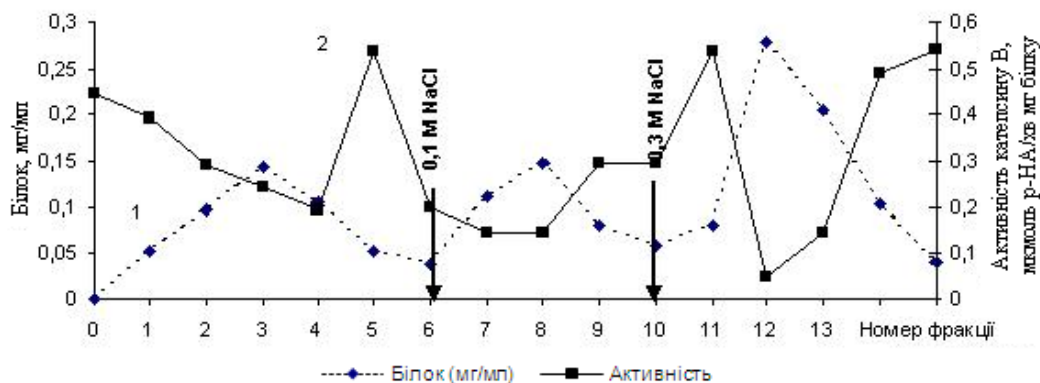


Рис. 1. Аналіз інгібіторної активності на етапі іонообмінної хроматографії на ДЕАЕ сефадексі А-50

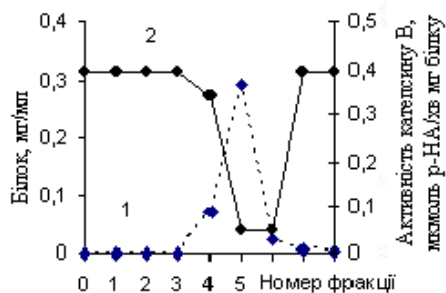


Рис. 2. Профілі елюції на колонці із сефадексом G-100: 1 – білок інгібіторного препарату, 2 – активність катепсину В

гання (1–2 тижні) при +4 °С. Даний препарат інгібітора пригнічує на 88% активність виділеного та очищеного катепсину В. Існують докази того, що інгібітори цистеїнових протеїназ – надзвичайно стійкі білки, які проявляють резистентність відносно інактивувальної дії високих температур і лужних значень *pH* (Lenpey, 1979).

Отриманий ендogenousний білковий інгібітор цистеїнових катепсинів проявляє високу стійкість до температурного впливу при інгібуванні катепсину В (Lyanna, 2007). За результатами визначених молекулярних мас і фізико-хімічних властивостей отриманий інгібітор можна віднести до родини цистатинів.

Із цитозолу головного мозку щура в 1983 році виділено та очищено ендogenousний білковий інгібітор цистеїнових пептидгідролаз цереброцистатин (Kopitar et al., 1983). Це білок з *M_r* 12,5 кДа, який складається з одного поліпептидного ланцюга та пригнічує папаїн і катепсин В. Доведено, що цереброцистатин імунологічно ідентичний до цистатину С людини (Kopitar et al., 1983). У цитозолі головного мозку людини описані інгібітори цистеїнових пептидаз із низькою молекулярною масою 2,5–3,0 кДа, які пригнічують активність папаїну та катепсину В головного мозку та печінки людини, реагують з антитілами до цистатину С (Suhar et al., 1988).

Досліджується ще одна гіпотеза природи низькомолекулярних ендogenousних інгібіторів цистеїнових протеїназ: припускається, що невеликі за розміром інгібітори являють собою пропептиди, відщеплені під час процесингу лізосомних ферментів (Lalmanach et al., 1998). Відомі продукти пропептидів, які пригнічують активність зрілих цистеїнових пептидгідролаз, таких як катепсини В, L, К та S (Chagas et al., 1996).

У таблиці 2 наведено кінетичні показники отриманого ендogenousного інгібітора, визначені графічними методами аналізу. Ферменти із блокованим активним цен-

Таблиця 1
Етапи очищення тканинного ендogenousного білкового інгібітора цистеїнових катепсинів із неокортексу головного мозку людини

Етапи очищення інгібітора	Активність ферментів за присутності інгібітора, ОА/мг білка	Ступінь пригнічення, %
10% гомогенат (без інгібітора)	0,400	1
Діаліз препарату інгібітора	0,390	13
Гель-фільтрація на сефадексі G-150 (фракція 1)	0,280	28
Іонообмінна хроматографія на ДЕАЕ-сефадексі А-50 (фракція 12)	0,048	88
Хроматографія на сефадексі G-100 (фракція 5)	0,048	88

Дослідження спектра інгібіторної активності виділеного препарату показало, що він здатний пригнічувати активність цистеїнового катепсину В за тривалого збері-

тром все ще здатні зв'язуватись з інгібіторами, хоча і з меншою афінністю (Abrahamson, 1993; Otto et al., 1997). Це вказує на те, що взаємодія цистеїнових протеїназ із цистатинами заснована не на простій реакції з каталітичним цистеїновим залишком цього ферменту, а на гідрофобних взаємодіях між активними областями цистатинів та відповідними залишками, які формують сайт зв'язування ферменту.

Таблиця 2

**Фізико-хімічні та кінетичні властивості
тканинного ендogenous білкового інгібітора
катепсину В із головного мозку в нормі**

M _r	7,5 кДа	V _{max}	51,6
K _i	2,4·10 ⁻⁹ М	V _{maxi}	51,6
K _M	3,9·10 ⁻⁴ М	ступінь пригнічення	88 %
K _{Mi}	2,2·10 ⁻⁴ М	тип інгібування	конкурентний

Дослідження ендogenous інгібіторів лізосомних протеїназ мозку, а також змін рівнів активності цистеїнових катепсинів мозку, викликаних дією цих інгібіторів, має суттєве значення для формування об'єктивної оцінки реакції тканини головного мозку на патологічні процеси в експериментальних та клінічних умовах, що необхідно для підвищення ефективності терапії та моніторингу перебігу захворювань.

Висновки

За допомогою запропонованої схеми із тканин здорового головного мозку вдалося виділити та очистити термостабільний тканинний ендogenous білковий інгібітор, який за механізмом зворотного конкурентного інгібування проявляє високий ступінь пригнічення активності цистеїнового катепсину В. Дана процедура виділення та очищення ендogenous інгібітора цистеїнового катепсину В із неокортексу людини має велике прикладне значення, оскільки завдяки достатньо простим маніпуляціям дозволяє отримати високоочищений препарат інгібітора цистеїнового катепсину В та провести аналіз кінетичних характеристик виділеного інгібітора, оцінити можливий механізм взаємодії з лізосомним цистеїновим катепсином В.

Подяка

Автор висловлює подяку д-ру біол. наук, проф. В.І. Чорній.

Бібліографічні посилання

Abrahamson, M., 1993. Cystatins: Protein inhibitors of papain-like cysteine proteinases. *Cienc. Cult.* 45(5), 299–304.
Boya, P., 2012. Lysosomal function and dysfunction: Mechanism and disease. *Antioxid. Redox. Sign.* 17(5), 766–774.
Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
Chagas, J., Martino, M., Gautier, F., Lalmanach, G., 1996. Inhibition of cathepsin B by its propeptide: Use of overlapping peptides to identify a critical segment. *FEBS Lett.* 392, 233–236.

Cherna, V.I., Lyanna, O.L., 2013. Lysosomal cysteinovi protease: Molekulyarna struktura ta funkcii. *Ecograf, Kharkiv* (in Ukrainian).
Conus, S., Simon, H., 2010. Cathepsins and their involvement in immune responses. *Swiss. Med. Wkly.* 140, 1–8.
Gondi, C.S., Rao, J.S., 2013. Cathepsin B as a cancer target. *Expert. Opin. Ther. Tar.* 17(3), 281–291.
Grzonka, Z., Jankowska, E., 2001. Structural studies of cysteine proteases and their inhibitors. *Acta Biochim. Pol.* 48(1), 1–20.
Hanada, K., Tamai, M., Yamagish, M., 1978. Isolation and characterization of E-64, a new thiol protease inhibitor. *Agric. Biol. Chem.* 42, 523–528.
Hirado, M., Iwata, D., 1981. Purification and properties of thiol proteinase inhibitor from rat liver cytosol. *Biochim. Biophys. Acta* 669(1), 21–27.
Katunuma, N., 2010. Posttranslational processing and modification of cathepsins and cystatins. *J. Sign. Transduct.*, 1–8.
Kirkegaard, T., Jäättelä, M., 2008. Lysosomal involvement in cell death and cancer. *Biochim. Biophys. Acta* 1793, 746–754.
Kirpichenok, L.N., Scherbak, I.G., 1987. Endogenous inhibitor cysteinovih proteinas iz pochki cheloveka. *Ukr. Biokhim. Zh.* 59(1), 10–15 (in Russian).
Kopitar, M., Stern, F., Marks, N., 1983. Cerebrocystatin suppresses degradation of myelin basic protein by purified brain cysteine proteinase. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 112(3), 1000–1006.
Lalmanach, G., Lecaille, F., Chagas, J., Authie, E., Scharfstein, J., Juliano, M., 1998. Inhibition of tripanosomal cysteine proteinases by their propeptides. *J. Biol. Chem.* 273(39), 25112–25116.
Lenney, J., Liao, J., Sugg, S., 1982. Low molecular weight inhibitor of cathepsins B, H and L in human serum, sinovial fluid and CSF. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 108(4), 1581–1587.
Lenney, J.F., Tolan, J.R., 1979. Thermostable endogenous inhibitors of cathepsins B and H. *Eur. J. Biochem.* 101(1), 153–161.
Leutscher, J.A., Bialek, J.W., Grislis, G., 1982. Human kidney cathepsin B and H activate and low molecular weight of human inactive rennin. *Clin. Exp. Hypertens.* 4(11/12), 2149–2158.
Lyanna, O.L., 2007. Role cysteine katepsiniv u degradatsii bilkiv pri patologichnih stanah: Diss. ... kand. biol. nauk. 122 p. (in Ukrainian).
Mohamed, M.M., Sloane, B.F., 2006. Cysteine cathepsins: Multifunctional enzymes in cancer. *Nature* 6, 764–775.
Nurhayati, T., Rusyadi, S., Suwandi, R., Nugraha, R., 2013. Purification and characterization of a cathepsin inhibitor from catfish (*Pangasius sp.*) of Indonesian water. *Int. Food Res. J.* 20(2), 941–946.
Otto, H.-H., Schirmeister, T., 1997. Cysteine proteases and their inhibitors. *Chem. Rev.* 97(1), 133–172.
Reiser, J., Adair, B., Reinheckel, T., 2010. Specialized roles for cysteine cathepsins in health and disease. *J. Clin. Inv.* 120(10), 3421–3431.
Suhar, A., Curin, V., Turk, V., 1988. Low Mr cysteine proteinase inhibitors from human brain. *Neurochem. Int.* 13(1), F290.
Taniguchi, K., Sasaki, M., 1981. Partial purification and properties of urinary thiol proteinase inhibitors. *J. Biochem.* 89(1), 179–184.
Turk, D., Guncar, G., 2003. Lysosomal cysteine proteases (cathepsins): Promising drug targets. *Acta Cryst.* 59, 203–213.
Turk, V., Stoka, V., Vasiljeva, O., Renko, M., Tao, S., Turk, B., Turk, D., 2012. Cysteine cathepsins: From structure, function and regulation to new frontiers. *Biochim. Biophys. Acta* 1824, 68–88.
Uebbs, L., 1966. Inhibitori fermentov i metabolisma. Mir, Moscow (in Russian).

Надійшла до редколегії 21.11.2013