

РАСПАД РАСТВОРИМЫХ БЕЛКОВ МОЗГА КРЫС
 ПОД ДЕЙСТВИЕМ КАТЕПСИНА D

А. П. ОГАНИСЯН, Т. Н. АКОЛЯН, Г. А. ГЕВОРКЯН, А. А. ГАЛОЯН

Методом двойной изотопной метки исследована относительная скорость распада нативных растворимых белков мозга крыс *in vivo* и *in vitro* под действием катеписина D, выделенного из мозга крыс. Изучена также зависимость величины скорости распада этих белков от их молекулярного веса.

Экспериментальные данные последних лет свидетельствуют о том, что распад белков является одним из важных факторов в регуляции их уровня в организме. Значение этих данных особенно велико в отношении белков центральной нервной системы, принимающих участие в кодировании памяти, регуляции разных физиологических активностей и т. д.

Метод двойных изотопных меток, предложенный Арисом и др. [3], позволяет отличать растворимые белки, имеющие различные скорости распада *in vivo* и *in vitro* под действием некоторых эндопептидаз [4, 5]. Нужно отметить, что закономерности, выявленные в отношении белков печени, осажденных с помощью трихлоруксусной кислоты, не распространяются на нативные белки.

В данной работе мы приводим результаты измерения относительной скорости распада нативных растворимых белков мозга *in vivo* и *in vitro* под действием катеписина D, выделенного из мозга крыс.

Материал и методика. В работе использовали сефадекс G-100, сефарозу 4В (Pharmacia, Швеция), L-[4,5-³H]-лейцин с удельной активностью 1,0 Кюри/мМоль и L-[U-¹⁴C]-лейцин с удельной активностью 348 мКюри/мМоль (Amersham, Англия), протозол (New England Nuclear, США), 2,5-дифенилоксазол (PPO) и (1,4-бис 2(4-метил-5-фенилоксазол)ил) бензол) (диметил PPOP) (Sigma, США). Катеписин D выделили из мозга по методу Аколяни др. [1].

Белки определялись методом Лоури, в котором в качестве стандарта использовали сывороточный альбумин быка [6]. Величины абсорбции элюированных проб из колонок регистрировались фотометром Увикорд II (ZKB, Швеция). При калибровке колонок использовали метод, описанный Эндрюсом [2]. Колонки (2,5×60 см и 3×100 см соответственно) с сефарозой 4В и сефадексом G-100 уравнивали в 0,025 М фосфатном буфере (рН 7,6). Калибровку колонок с сефарозой 4В производили ферритином, каталазой, альдолазой и овальбумином, а колонку с сефадексом G-100 — альбумином, овальбумином, химотрипсиногеном А и миоглобином.

Скорость распада белков измеряли методом двойной изотопной метки [3], определяя ее по включению меченого лейцина в белковую молекулу. Подопытным крысам массой 150 г внутрибрюшинно вводили 100 мКюри L-[U-¹⁴C]-лейцина, а через 10 дней—500 мКюри L-[4,5-³H]-лейцина. Контрольным крысам одновременно вводили

ли 250 мкКюри L-[4,5- ^3H]-лейцина и 50 мкКюри L-[U- ^{14}C]-лейцина. Животных декалцитировали через 4 час. после введения L-[4,5- ^3H]-лейцина, извлекали мозг и гомогенизировали в гомогенизаторе типа Поттера. Гомогенизацию проводили в двух объемах 0,025 М фосфатного буфера (рН 7,6), содержащего 0,3 М сахарозу.

После центрифугирования гомогенатов при 20 000 x g (40 мин) и 100 000 x g (60 мин) полученный белковый супернатант подвергали фракционированию на сефарозе 4В. По 0,5 мл элюированных фракций переносили в счетные кюветы, проводили солубилизацию протозолом, добавляли жидкий сцинтиллятор на основе толуола, содержащий 4 г/л РРО и 0,1 г/л диметил ПОРОР, и определяли уровень ^3H и ^{14}C в жидкостном сцинтилляционном спектрометре SL-30 (Intertechnique, Франция) по программе, предусматривающей одновременный счет обоих изотопов. Эффективность по ^{14}C составляла 60%, по ^3H —40%. Полученные данные выражали в распадах/минуту и вычисляли отношение $^3\text{H}/^{14}\text{C}$.

Вторую серию опытов проводили на крысах, получивших внутривенно 750 мкКюри L-[4,5- ^3H]-лейцина и декалцитированных через 4 часа. После проведения описанной выше обработки ткани мозга растворимые белковые фракции наносили на колонку с G-50 сефадексом для освобождения от свободного лейцина. Полученные фракции соединяли и подвергали протеолитическому расщеплению катепсином Д при 37°. Инкубационная проба объемом 0,4 мл содержала цитратный буфер 0,05 М конечной концентрации с различными рН (2, 2,5, 2,9, 3,5, 4,3, 5,3, 5,8), 0,16 мг меченого субстрата (^3H —11 500 имп./мл на мл) и 20 μ катепсина Д. После 2-часовой инкубации содержание проб осаждали 0,1 мл 30%-ной ТХУ и брали пробы для определения радиоактивности [^3H]-лейцина. В качестве контроля служили пробы без осаждения ТХУ.

Для белкового элюата, пропущенного через колонку с сефадексом G-50, получили кинетику скорости распада нативных белков мозга крыс, меченых [^3H]-лейцином, при значениях рН 3,2 и 5,3 под действием катепсина Д. Общая инкубационная проба составляла 3 мл: 1,6 мг меченого субстрата, цитратный буфер 0,05 М конечной концентрации (рН 3,2 и 5,3), 0,2 мг катепсина Д. Через определенное время образцы осаждали 0,1 мл 30%-ной ТХУ. Контролем служили пробы без осаждения ТХУ.

Для выявления закономерности между скоростью распада и размерами молекул белков последние, меченые [^3H]-лейцином, фракционировали на колонке с сефадексом G-100. Полученные элюаты соединяли в 6 фракций, отличающихся по молекулярным весам. Все фракции подвергали расщеплению катепсином Д. Общая инкубационная проба составляла 3 мл: 0,8 мг субстрата, цитратный буфер 0,05 М конечной концентрации (рН 2,9), 0,1 мг катепсина Д. Концентрации белков во всех фракциях были равны 0,4 мг/мл, ^3H —1530; 1357; 875; 1225; 735; 450 имп./мл на мл в соответствующих фракциях. Пробы осаждали 0,1 мл 30%-ной ТХУ. Величину радиоактивности в пробах определяли в канале, предусматривающем счет ^3H с эффективностью 58% и выражали ее в распадах/минуту.

Результаты и обсуждение. Метод двойных изотопных меток [3] применяют для определения относительной скорости распада белковых молекул. При этом две изотопные формы одной и той же аминокислоты используются для фиксирования двух точек, описывающих распад белков. Белки, имеющие большую величину отношения первая метка/вторая метка, характеризуются как распадающиеся с большой скоростью *in vivo*. В наших экспериментах животные получили вторую метку спустя 10 дней после инъекции первой метки, в то время как в опытах большинства исследователей экспозиция первой метки составляла 4 дня. Однако установлено, что оптимальное время экспозиции первой метки равно 8—14 дней [5].

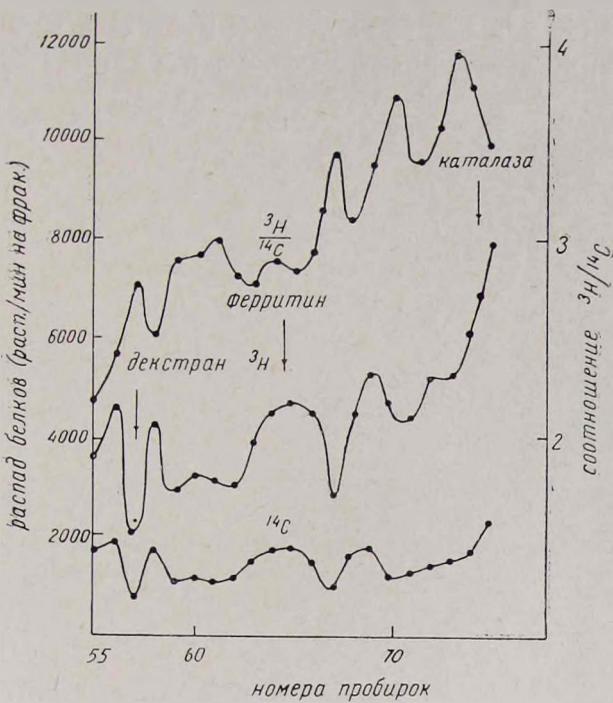


Рис. 1. Фракционирование растворимых белковых фракций мозга крыс на колонке с сефарозой 4В. Свободный объем колонки—70 мл. Метка $[^3\text{H}]$ —лейцин, введенная спустя 10 дней после введения $[^{14}\text{C}]$ —лейцина.

Как видно из рис. 1, все фракции растворимых белков мозга крыс, полученные на колонке с сефарозой 4В, характеризуются включением обеих меток. Соотношение меток белков мозга контрольных крыс, полу-

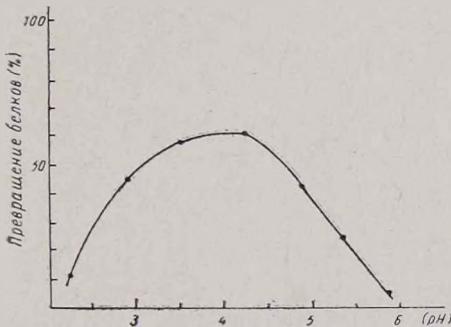


Рис. 2. рН-зависимость гидролиза белков мозга крыс, содержащих $[^3\text{H}]$ —лейцин, под действием катепсина Д.

чивших обе метки одновременно, находится в интервале 1.5—2, в то время как белки мозга опытных крыс (рис. 1) имеют большее соотноше-

ние, 2—4. Известно, что колонка с сефарозой 4В разделяет белки, имеющие молекулярный вес от 2×10^5 до 2×10^7 . В этой области молекулярных весов белки с относительно маленьким молекулярным весом имеют большую скорость распада.

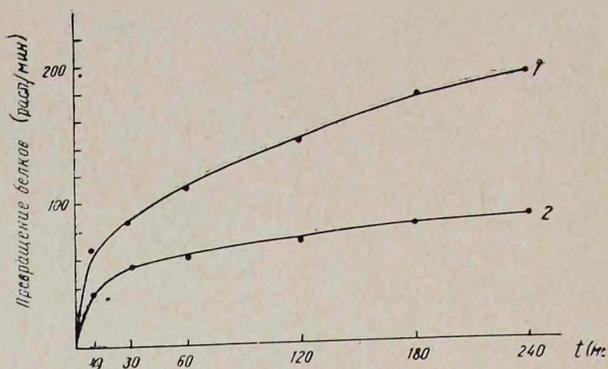


Рис. 3. Кинетика скорости распада нативных белков мозга крыс, меченных $[^3\text{H}]$ —лейцином, при pH 3,2 и 5,3 под действием катепсина Д. 1—кривая скорости распада при pH 3,2, 2—при pH 5,3

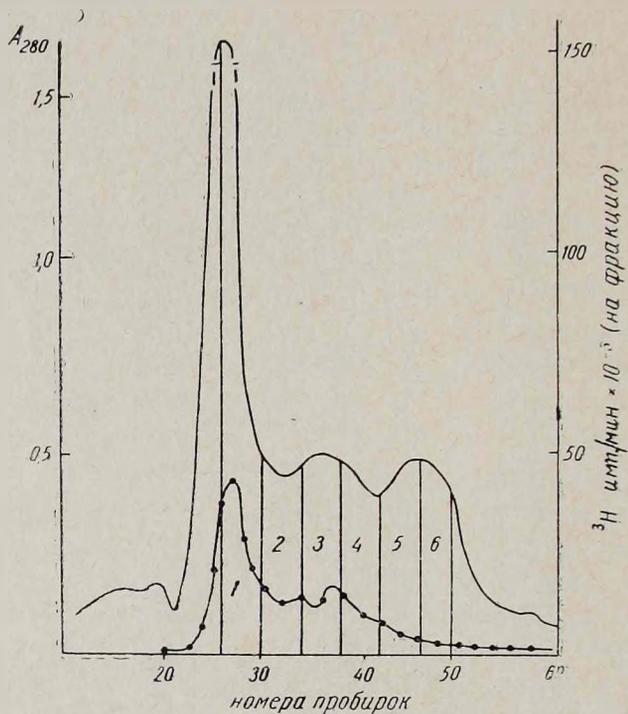


Рис. 4. Фракционирование растворимых белков мозга крыс на колонке с сефадексом G-100. Фракции — по 3 мл.

В настоящее время считают, что одним из главных протеолитических ферментов, принимающих участие в распаде внутриклеточных белков, является катепсин Д. С целью изучения действия этого фермента на растворимые белки мозга мы выделяли его из мозга крыс по методу, описанному ранее [1]. Полученные препараты фермента добавляли к растворимым белкам мозга и следили за выходом радиоактивности в супернатанте после осаждения ТХУ. Как видно, катепсин Д расщепляет белки мозга в интервале рН 2,5—5,5, т. е. с широким рН оптимумом (рис. 2).

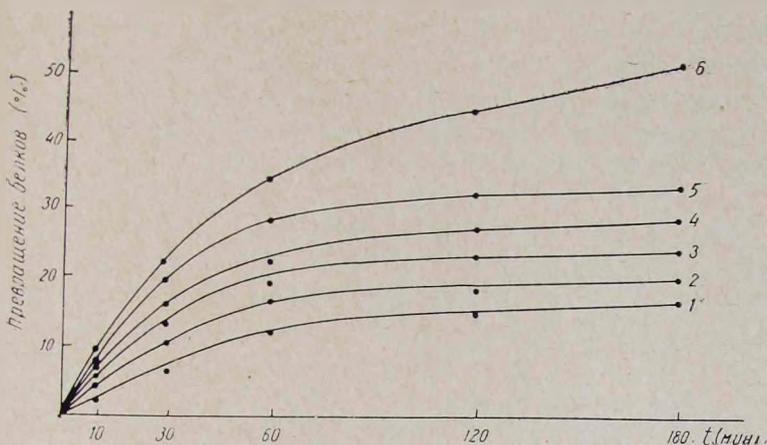


Рис. 5. Зависимость скорости распада белков мозга крыс от молекулярного веса белков под действием катепсина Д. Кривые 1—6 соответствуют фракциям белков с убывающими молекулярными весами.

Выход радиоактивности в течение 4 час. составляет около 50% при рН 3,2 и 20% при рН 5,3 (рис. 3). Существует много работ, где показана закономерность между скоростью расщепления белков и их молекулярным весом. Чтобы установить наличие такой закономерности, мы подвергали фракционированию растворимые белки мозга крыс, получивших только [³H]-лейцин. Собирали фракции с различными молекулярными весами, как показано на рис. 4, которые подвергали сгущению с помощью сефадекса G-100, а затем — протеолизу катепсином Д. Как видно из рис. 5, белки, имеющие маленький молекулярный вес, распадаются с большей скоростью, чем белки с большим молекулярным весом, что и является основным результатом данной работы.

Институт биохимии АН АрмССР

Поступило 13. IV. 1979 г.

ԱՌՆԵՏԻ ՈՒՂԵՂԻ ԼՈՒԾԵԼԻ ՍՊԻՏԱԿՈՒՅՆՆԵՐԻ ՔԱՅՔԱՅՈՒՄԸ ԿԱՏԵՊՍԻՆ Ը-Ի ԱԶԴԵՑՈՒԹՅԱՆ ՆԵՐՔՈ

Ա. Բ. ՀՈՂՀԱՆՆԵՍՅԱՆ, Թ. Ն. ՀԱԿՈՅԱՆ, Գ. Ա. ԴԵՎՈՐԳՅԱՆ, Ա. Ա. ԳԱՈՅԱՆ

Հետազոտվել է առնետի ուղեղի նատիվ լուծելի սպիտակուցների քայքայման հարաբերական արագությունը կատեպսին Ը-ի ազդեցության ներքո in vivo և in vitro (կատեպսին Ը-ն անջատված է առնետի ուղեղից):

Հետազոտվել է նաև այդ սպիտակուցների քայքայման արագության կախվածությունը նրանց մոլեկուլյար կշռից:

DISSOCIATION OF THE RAT BRAIN SOLUBLE PROTEINS UNDER THE ACTION OF CATEPSIN D IN VIVO AND IN VITRO

A. I. HOVRIANISSYAN, T. N. AKOPYAN, G. A. GEVORKYAN, A. A. GALOYAN

The relative rate of native soluble rat proteins dissociation in vivo and in vitro under the action of Catepsin D isolated from rat brain has been investigated by the method of 2 isotop labelling.

The dependence of dissociation rate value of those proteins upon their molecular weight has also been investigated.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Akopyan T. N., Arutunyan A. A., Lajtha A. and Galoyan A. A. *Neurochem. Research*, 3, 89, 1978.
2. Andrews P. *Biochem. J.*, 96, 595, 1965.
3. Arias J. M., Doyle D., Schimke R. T. *J. Biol. Chem.*, 244, 3303, 1969.
4. Dean T. *Eur. J. Biochem.*, 58, 9, 1975.
5. Fred Dice J., Dehlinger P. J., Schimke R. T. *J. Biol. Chem.*, 248, 4220, 1973.
6. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L. and Randall R. J. *J. Biol. Chem.*, 193, 265, 1951.