

Չ Բ Ա Կ Ա Ն Ո Ւ Ք Յ Ո Ւ Ն

1. Дмитриев А. С., Тейц М. Ю., Дудика Т. В., Кандыбо Т. С., Ахиреди О. П. *Mag.*, VI Всес. конф. по физиол. ВИС, Ереван, 1986
2. Краснополюский С. З., Райцес В. С. *Нейрофизиология*, 1987, 19, 6.
3. Кройдич Ю. В. *Журн. высш. нервн. деят.*, 1974, 24, 4.
4. Райцес В. С., Шляховецко А. А. *Физиол. ж. СССР*, 1972, 58, 3.
5. Райцес В. С. 3 кн.: *Современные тенденции в нейрофизиологии*. Л., 1977.
6. Фанарджян В. В., Саркисян В. А. *Сенсорные системы*, 1987, 1, 1.
7. Chubb C., Fusha A., Scudder Ch. J. *Neurophysiol.*, 1, 1, 1984.
8. Kempinsky W. H. J. *Neurophysiol.*, 14, 3, 1951.
9. Precht W. *Vestibular system. Function and morphology*. New-York, 1981.

Ստացված է 28. 11 1992

Биолог. журн. Армении № 1.(46).1993

УДК 577.15234—612.744

КАТЕПСИН D ИЗ СЕРДЦА КРЫС: ОЧИСТКА, НЕКОТОРЫЕ СВОЙСТВА И ДЕЙСТВИЕ НА АКТОМИОЗИН И ТРОПОМИОЗИН

Р. Г. КАРАПЕТЯН\*, А. И. ОГАНЕСЯН, Т. Н. АКОПЯН

\*НИИ кардиологии МЗ Армении, ИМБ АН Армении, Ереван

Из миокарда крыс выделен катепсин D. Фермент представлен тремя изоформами со значениями pI 5,0, 5,4, 7,3; молекулярная масса его около 57 кДа. Фермент расщепляет нативный актомиозин ( $K_M = 1,2 \times 10^{-6} M$ ), но не деградирует нативный тропомиозин.

Առանձին մոկարդից անջատվել է կատեպսին Դ, Ֆերմենտը ներկայացված է չիմնական (pI 5,0; 5,4; 7,3,) և երկրորդական (pI 3,5; 4,0) իզոմերներով: Ֆերմենտի մոկիտիլյար մասսան մոտավորապես 57 կգ է: Ֆերմենտը քայքայում է բնական ակտոմիոզինը ( $K_M = 1,2 \cdot 10^{-6} M$ ) և չի քայքայում բնական տրոպոմիոզինը:

Cathepsin D was isolated from rat myocardium. The enzyme is performed in major (pI 5,0; 5,4; 7,3) and minor (3,5; 4,0) isoforms. Molecular mass of enzyme is about 57 kDa. The enzyme degrades native actomyosin ( $K_M = 1,2 \cdot 10^{-6} M$ ), but not native tropomyosin.

Сердце—катепсин D—актомиозин—тропомиозин.

Катепсин D участвует в деградации отдельных миофибриллярных белков миокарда [5, 10], но поскольку в акте сокращения—расслабления мышц участвуют белки в составе комплекса, то доступность индивидуальных белков к катепсину D может отличаться от такового в составе комплекса.

Следует отметить, что работы по изучению протеолитических ферментов мышечной ткани малочисленны. Это в основном связано

Сокращения: НАМ—нативный актомиозин, НТМ—нативный тропомиозин

с низкой протеолитической активностью мышечной ткани, особенно миокардиальной.

Целью настоящей работы было выделение катепсина D из миокарда крысы и изучение некоторых его свойств, включая действие на НАМ и НТМ<sup>1</sup>.

*Материал и методика.* В опытах использованы 50 белых беспородных крыс-самцов массой 150—200 г. Животных, находящихся под эфирным наркозом, декантировали, сердце отмыкали от остатков крови физиологическим раствором, очищали от остатков жира и соединительной ткани и хранили при  $-15^{\circ}$ .

НТМ получали из сырого-эфирного порошка скелетных мышц крысы по методу [4]. НАМ из скелетных мышц крысы был любезно представлен М. А. Кайфаджан (Ин-т кардиологии МЗ РА).

Активность катепсина D оценивали флуоресцентным методом, используя в качестве субстрата гемоглобин, модифицированный пиридоксаль-5-фосфатом [2]. Пробы объемом 0,6 мл содержали 0,05 М цитратный буфер, pH 3,2, 100 мкг белкового субстрата и соответствующее количество фермента. После инкубации в течение 1 ч реакцию останавливали добавлением 0,13 мл 30%-ной ТХУ. После центрифугирования pH супернатанта доводили до 5,5 1M цитратом натрия и измеряли флуоресценцию раствора при 410 нм (возбуждения 330 нм). За единицу активности принимали количество фермента, катализирующее образование фосфолиридоксильных пептидов, флуоресценции которых соответствовали величине 0,5 по шкале [1]. Удельную активность выражали в единицах активности на мкг белка.

Расщепление НАМ и НТМ определяли флуоресцентным методом с помощью о-фталальдегида [1]. Пробы объемом 0,25—0,35 мл содержали обычно 200—400 мкг белкового комплекса в 0,05 М цитратном буфере, pH 3,2, и 50—60 мкг очищенного катепсина D. После инкубации в течение 1—4 ч при  $37^{\circ}$  реакцию останавливали добавлением перхлорной кислоты до конечной концентрации 1%. После центрифугирования 0,1—0,2 мл супернатанта смешивали в кювете спектрофлуориметра с 0,01%-ным раствором о-фталальдегида в количестве 0,2—0,4 мл в 0,8 М боратном буфере (pH 9,7), содержащем  $2 \times 10^{-4}$  М бетамеркаптоэтанол. Через 1 мин добавляли 1,5 мл  $H_2O$  и измеряли флуоресценцию при 445 нм (возбуждение при 350 нм) на спектрофлуориметре «Ferrand» (США).

Для определения Km и Vmax НАМ, содержащийся в пробе в концентрациях 200—1000 мкг, инкубировали с 60 мкг катепсина D в течение 1 часа при  $37^{\circ}$ .

Определение оптимума pH активности проводили в 0,025 М цитрат-фосфатном буфере при pH 6—7,0. Инкубационная среда содержала 300 мкг НАМ и 60 мкг катепсина D. Пробы инкубировали в течение 1 часа при  $37^{\circ}$ . Активность измеряли с помощью о-фталальдегида, как описано выше.

Электрофорез проводили в ПААГ по модифицированному методу Лемли [6].

Концентрацию белка определяли по методу Лоури [8] и Брэдфорда [3], а также по измерению поглощения при 280 нм.

*Результаты и обсуждение. Очистка катепсина D.* Всю процедуру очистки фермента проводили при  $4^{\circ}$ . Сердечную ткань измельчали, растирали в 0,025 М ацетатном буфере при pH 4,5, содержащем 0,2%-ный Тритон X-100 в гомогенизаторе Поттера в соотношении 1:2 (вес/объем). Полученную тканевую суспензию перемешивали в течение 20 мин, затем центрифугировали при  $10000 \times g$  30 мин. Надосадочную жидкость отделяли повторным центрифугированием при  $90000 \times g$  60 мин.

Полученный после центрифугирования надосадок наносили на колонку с SP-сефадексом С-50 ( $2,5 \times 10$  см), предварительно уравновешенную 0,025 М ацетатным буфером, pH 4,5. Адсорбированные бел-

ки элюировали линейным градиентом 0—1 М NaCl. Фракции, соответствующие пикам активности, объединяли.

В препарат фермента добавляли  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  до 20%-ного насыщения и через 2 ч центрифугировали при  $20000 \times g$  15 мин. Белок из надосадочной жидкости осаждали добавлением сульфата аммония до 70%-ного насыщения. После центрифугирования при тех же условиях образовавшийся осадок растворяли в 0,025 М трис-HCl буфере (рН 7,6) и анализировали в течение 15 ч против 200-кратного объема того же буфера с однократной его сменой.

Препарат после диализа наносили на колонку ДЭАЕ сефадекса А-50 ( $3,5 \times 10$  см), уравновешенную 0,025 М трис-HCl буфером, рН 7,6. Фермент элюировали градиентом 0—1 М NaCl. Профиль элюции показал наличие нескольких пиков активности, характерных для катепсина D, что указывает на наличие изоформ этого фермента. Активные фракции объединяли и осаждали сульфатом аммония при 70%-ном насыщении. После центрифугирования при  $20000 \times g$  15 мин осадок растворяли в 0,025 М фосфатном буфере, рН 7,6.

Раствор белка, полученный после осаждения сульфатом аммония, наносили на колонку с сефадексом G-75 ( $2,5 \times 60$  см), уравновешенную 0,025 М фосфатным буфером (рН 7,6) и фракционировали тем же буфером. Фракции, имеющие наибольшую активность, объединяли и использовали в дальнейших опытах.

*Результаты очистки катепсина D из миокарда крыс.*

Стадия очистки	Общий белок, уг	Общая активность, ед. акт.	Удельная активность, ед. акт./мг
Экстракт $90000 \times g$	1895.0	3.60.0	1.72
Фракционирование $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (20—70%)			
SP—сефадекс G50	377.0	2951.0	7.8
ДЭАЭ—сефадекс А50	98.3	2570.0	26.1
Сефадекс G75	12.0	1537.0	128.0

Результаты очистки катепсина D просуммированы в таблице. Предложенная процедура очистки позволяет получить препарат фермента с удельной активностью 128 ед. акт./мг белка, что составляет 158-кратную очистку по белку по сравнению с экстрактом миокарда, полученным после центрифугирования при  $90000 \times g$  в течение 60 мин. Выход общей активности составляет 47,1%.

*Некоторые свойства катепсина D.* Согласно полученным нами данным, очищенный препарат катепсина D сохраняет полную активность в течение 1,5—2 месяцев при хранении в 0,025 М фосфатном буфере (рН 7,6) при  $-15^\circ\text{C}$ ; через 10 месяцев хранения при тех же условиях теряется 50% активности.

Восстанавливающий SH-группы агент дитиотрейтол в концентрации  $10^{-3}$  М не влияет на активность фермента. Специфический

ингибитор катепсина D пеллетин в концентрации  $10^{-3}$  М практически полностью ингибирует выделенный фермент.

Изофокусировка препарата фермента после гель-фильтрации на сефадексе G-75 в смеси 1% амфолинов (рН 3,0—10,0) позволили установить, что катепсин D в миокардиальной ткани крысы присутствует в виде трех основных изоформ со значениями  $pI$  5,0; 5,4 и 7,3, а также двух минорных форм с  $pI$  3,5 и 4,0, что согласуется с литературными данными об изоферментном составе катепсина D.

По оценкам разных авторов, молекулярная масса катепсина D варьирует в пределах 42—58 кДа [9, 11]. Определение молекулярной массы фермента из миокарда крысы с помощью хроматографии на колонке сефадекса G-75 ( $3,5 \times 10$  см) с использованием стандартных белков позволило установить, что она составляет 45 кДа. Диск-электрофорез изофермента катепсина D со значением  $pI$  5,4 в 10% ПААГ с 0,1% ДСН показал наличие основной полосы с молекулярной массой 57 кДа и минорной—14 кДа, которая, по-видимому, обусловлена частичным загрязнением препарата.

*Дегградация актомиозина и тропомиозина катепсином D.* Результаты изучения действия катепсина D на миофибрилярные комплексы НАМ и НТМ показали, что НТМ практически не расщепляется под действием фермента, в то же время идет относительно интенсивное расщепление актомиозина. Причем увеличение отношения белок/фермент увеличивает скорость деградации белка.

Результаты изучения рН-зависимости деградации актомиозина под действием катепсина D показали, что деградация белка наиболее эффективно протекает в области рН 3,0—4,0 и совпадает с рН оптимумом деградации гемоглобина [7].

Изучение зависимости начальной скорости реакции деградации катепсином D актомиозина от его концентрации показало, что полученная кривая представляет собой типичную картину кинетики насыщения и значение  $K_m$  составляет  $1,2 \times 10^{-5}$  М. Отметим, что, согласно группе авторов [5],  $K_m$  деградации индивидуальных миофибрилярных белков катепсином D из сердца собаки следующие: миозина— $2,7 \times 10^{-5}$  М, альфаактинина— $10,0 \times 10^{-6}$  М, актина— $13,0 \times 10^{-6}$  М и тропомиозина— $45,0 \times 10^{-5}$  М, что находится в пределах значения  $K_m$ , полученного нами. Анализ данных позволяет предположить, что катепсин D способен деградировать НАМ с равной или с большей эффективностью, чем индивидуальные белки.

Таким образом, разработан сравнительно простой метод получения очищенного препарата катепсина D из миокарда крысы, даны некоторые его характеристики и показана возможность его участия в деградации сократительных белков.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Адопян Т. Н., Арутунян А. А., Оганисян А. Л., Латта А., Галоян А. А. J. Neurochem., 32, 629—631, 1977.
2. Адопян Т. Н., Арутунян А. А., Латта А., Галоян А. А. Neurochem. Res., 3, 89—99, 1978.

3. Bradford M. E. *Analit. Biochem.*, 72, 248—254, 1976.
4. Greaser M. L., Gergely G. *J. Biol. Chem.*, 246, 4226—4233, 1971.
5. Jones T. L., Ogunro E. A., Samarel A. M., Ferguson A. G., Iasch M. *Amer. J. Physiol.*, 245, H294—H299, 1983.
6. Laemli U. K. *Nature*, 227, 680—685, 1970.
7. Lapresle C., Webb T. *Biochem. J.*, 81, 455—492, 1962.
8. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. I. *J. Biol. Chem.*, 193, 265—275, 1951.
9. Press E. M., Proteu R. R., Cerba J. *Biochem. J.*, 74, 501, 1960.
10. Schwarts W. N., Blind J. W. C. *Biochem. J.*, 167, 811—820, 1977.
11. Widerander B., Kirahka H., Schaper S., Jualler M., Kay J. Eds. Kostka V., W. de Gruyter. 117—121, Berlin, 1985.

## ТРАНСГРЕССИВНАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ У ТАБАКА

В. А. МАРКАРЯН

Армянский сельскохозяйственный институт, Ереван

Установлено, что в расщепляющихся гибридных популяциях у табака проявление положительных трансгрессий по количеству листьев зависит от эффекта общей комбинационной способности родительских сортов, а их частота и степень — от типа наследования признака в  $F_1$ . Перспективные линии в большей степени отмечались в потомстве гибрида, у которого в  $F_1$  обнаружен отрицательный гетерозис и детерминация высокого показателя признака осуществляется рецессивными полигенами.

Հաստատված է, որ ճեղքվող հիբրիդացիոզ հիբրիդային սերունդներում տերթ քանակի դեպ դրական տրանսգրեսիաների դրսևորմը կախված է ոչ զուգակցությամբների ձևաչափան ներքին ընդհանուր կոմբինացիոն ունակության էֆֆեկտից, իսկ նրանց համախառնությունը և աստիճանը՝ առաջին սերնդում համակներին մասնորոնում տիպի: Հետևյալային 'զմերը մեծ քանակությամբ հայտնարերվել են հատկապես ոչ զուգակցության սերնդում, որտեղ  $F_1$ -ում նկատվել է բացասական հետերոզիս, իսկ ուսումնասիրվող հատկանիշի բարձր ցուցանիշը պայմանավորվել է սերնդի ղեկերի գերոնունությամբ:

It is ascertained, that in tobacco disintegrating hybrids generations the display of positive transgressions of a number of leaves depends on the effects of general combining ability of parents' sorts, but their frequency and degree on the type heritable in  $F_1$ . Perspective lines are mainly discovered in which in  $F_1$  negative heterosis is observed and the high indicator of the investigated quality is connected with the activity of recessive genes.

Растения табака — трансгрессивная изменчивость — комбинационная способность — рецессивные полигены.

Впервые у внутривидовых гибридов табака трансгрессивную изменчивость по количеству и размерам листа наблюдали еще в 1921 г. [12]. В дальнейшем положительные трансгрессии были установлены также по количеству [2, 6, 8, 10, 14] и размерам листьев [9], продуктивности [3—5, 7] и другим признакам. В этих работах отмечает-

Сохранения ОКС — общая комбинационная способность, СКС — специфическая комбинационная способность, РЭ — реципрокный эффект.