

УДК 577.156:612.8.015

ВЫДЕЛЕНИЕ И СВОЙСТВА ГЛИЦИЛГЛИЦИНДИПЕПТИДАЗЫ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

РЕВА А. Д., ШАИНСКАЯ А. М., ГЕНГИН М. Т., ЛЕПЕХИН Е. А.

Методом ионообменной хроматографии на ДЭАЭ-сефадексе А-50 из головного мозга крупного рогатого скота выделена в частично очищенном состоянии глицилглициндипептидаза. Фермент лабилен, инактивируется при разведении растворов препарата фермента. Полученная форма фермента обнаруживает три оптимума pH (5,7; 7,6; 9,0). Дипептидаза активируется кобальтом, в меньшей степени марганцем; ингибируется в разной степени п-хлормеркурибензоатом, ЭДТА, β-меркаптоэтанолом, магнием и цинком.

Зависимость скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата не подчиняется уравнению Михаэлиса-Ментен. Коэффициенты Хилла, рассчитанные для препарата фермента сульфатно-аммонийной фракции и для очищенного фермента, равны 2,06 и 2,2 соответственно. На основании данных кинетических исследований и других свойств фермента предполагается, что глицилглициндипептидаза головного мозга крупного рогатого скота является регуляторным ферментом.

Из ферментов группы пептидгидролаз дипептидазы наименее изучены [1]. Вместе с тем дипептидазы широко распространены и обнаруживаются практически во всех органах и тканях животных [1, 2], в том числе и в мозгу [3—7].

Считают, что дипептидазы, катализируя реакции гидролиза пептидных связей в пептидах, завершают внутриклеточный протеолиз [5]. В отдельных работах указывается на специфические функции дипептидаз в мозгу, связанные с участием их в регуляции уровня аминокислот-медиаторов [5]. Однако имеющиеся экспериментальные данные по изучению дипептидаз крайне ограничены и не позволяют сделать определенных выводов о биологической роли этой группы ферментов.

В настоящей работе представлены данные по выделению, очистке из мозга специфической глицилглициндипептидазы и изучению ее некоторых физико-химических свойств и кинетических характеристик.

Материалы и методы

Глицилглициндипептидазу выделяли из мозга крупного рогатого скота. Большие полушария очищали от оболочек и кровеносных сосудов, а затем тщательно промывали от крови. Навеску ткани серого вещества коры головного мозга гомогенизировали в блендере типа МРВ-302 в течение 4 мин при 1500 об/мин, используя в качестве среды гомо-

генизации 0,1 М К-На-фосфатный буфер в соотношении 1:1,2 (вес ткани к объему буфера). Гомогенат центрифугировали 20 мин на ЦВР-1 при 15 000 g. В экстракт после центрифугирования прибавляли кристаллический сульфат аммония до 30% насыщения. Образовавшийся осадок удаляли центрифугированием при тех же условиях, а к надосадочной жидкости прибавляли сульфат аммония до 70% насыщения. Осадок собирали с помощью центрифугирования, растворяли в минимальном объеме исходного буфера и диализовали 48 ч при +2—4° против этого же буфера. Незначительный осадок, образовавшийся в процессе диализа, удаляли центрифугированием на ЦВР-1 в течение 5 мин при 10 000 g.

В гомогенате, экстракте и высоле (фракция растворимых белков 0,3—0,7 насыщения сернокислым аммонием) определяли белок спектрофотометрически и по Lowry [8] и активность глицилглициндипептидазы.

Полученную после диализа и центрифугирования фракцию растворимых белков фракционировали далее на колонке с ДЭАЭ-сефадексом А-50, объемом 25 мл (1,5×16 см), уравновешенную 0,1 М К-На-фосфатным буфером, pH 7,8. Белки элюировали линейным градиентом того же буфера от 0,1 до 0,3 М со скоростью 20 мл/ч. Собирали фракции по 2,5 мл.

Гель-хроматографическое разделение проводили на колонке с сефадексом G-150, объемом 50 мл (1,5×35), уравновешенной 0,025 М трис-HCl буфером, pH 7,2 со скоростью элюции 12 мл/ч, объем фракций 1,5 мл.

Активность глицилглициндипептидазы определяли микрометодом. Инкубационная смесь содержала 60 мкл препарата фермента, 60 мкл субстрата (глицилглицина, 5×10^{-3} М) на медиал-ацетатном буфере М/7, pH 7,6, содержащем CoCl_2 (0,001 М). Пробы инкубировали в ультратермостате при 37° в течение 30 мин, ведя расчет по начальной скорости ферментативной реакции. Реакцию останавливали добавлением 60 мкл 5%-ного раствора ТХУ. Пробы центрифугировали 20 мин при 3000 об/мин. В надосадочной жидкости определяли прирост глицина [9]. Для цветной реакции отбирали 60 мкл надосадочной жидкости и с помощью бюретки добавляли 1 мл нингидринового реактива.

Активность фермента выражали в мкмоль глицина, освободившегося при гидролизе глицилглицина за 30 мин инкубации при 37° и pH 7,6 в расчете на 1 мг белка.

Данные опытов обрабатывали статистически [10]. Расчет кинетических параметров проводили на ЭВМ «ЕС-1022».

Результаты и обсуждение

На рис. 1 приведена типичная хроматограмма разделения белка и глицилглициндипептидазной активности сульфатно-аммонийной фракции 0,3—0,7 насыщения сернокислым аммонием на ионообменнике ДЭАЭ-сефадексе А-50.

Из представленных данных видно, что фермент элюировался одним пиком, который выходил при 0,15—0,2 М концентрации буфера. Определение активности глицилглициндипептидазы показало, что фракции, соответствующие пику активности фермента, гидролизуют глицилглицин с максимальной активностью, равной 17,0.

Фракции, соответствующие пику активности дипептидазы, объединяли, разбавляли в 2 раза дистиллированной водой до концентрации 0,1 М К-Na-фосфатного буфера, pH 7,8, поскольку сорбцию фермента проводили при тех же условиях. Фракции собирали по 1,5 мл. Удельная активность фермента во фракциях, соответствующих пику, равнялась 24,0 (рис. 2, табл. 1).

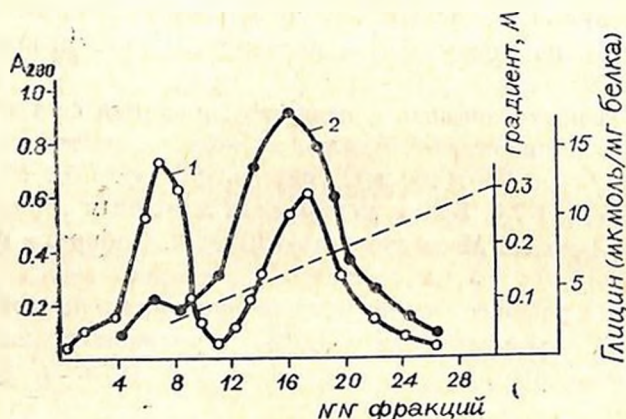


Рис. 1. Ионообменная хроматография глицилглициндипептидазы головного мозга крупного рогатого скота: 1—белок, 2—активность фермента

Важно отметить, что при разбавлении фракций с максимальной активностью глицилглициндипептидазы в 2 раза для проведения повторной ионообменной хроматографии (ИОХ), активность фермента в разбавленном элюенте терялась. После повторного фракционирования разбавленных проб фермента на колонке с ДЭАЭ-сефадексом А-50 элюировался пик с высокой активностью глицилглициндипептидазы.

Аналогичная картина инактивации глицилглициндипептидазы наблюдалась в экспериментах с хроматографией на сефадексе G-150. В данном случае фракционированию подвергали снятые с ионообменника и сконцентрированные против полиэтиленгликоля пробы с максимальной активностью фермента. Активность глицилглициндипептидазы после разделения на сефадексе G-150 не обнаруживалась. Концентрирование проб после объединения всех фракций приводило к появлению активности фермента, однако она была ниже в 9—10 раз, чем в нанесенном на колонку материале.

В последующих опытах гель-фильтрацию проводили в трех вариантах: а) в присутствии кобальта в элюирующем буфере; б) в присутствии кобальта и глицилглицина в элюирующем буфере; в) в присутствии β-меркаптоэтанола (β-МЭ) (рис. 3).

При фракционировании глицилглициндипептидазы в присутствии кобальта в элюирующем буфере обнаруживается два пика активности. Первый пик с удельной активностью, равной 5,0, выходил в свободном объеме колонки, а второй—с наибольшей активностью, равной 0,6, обнаруживался в области низкомолекулярных белков.

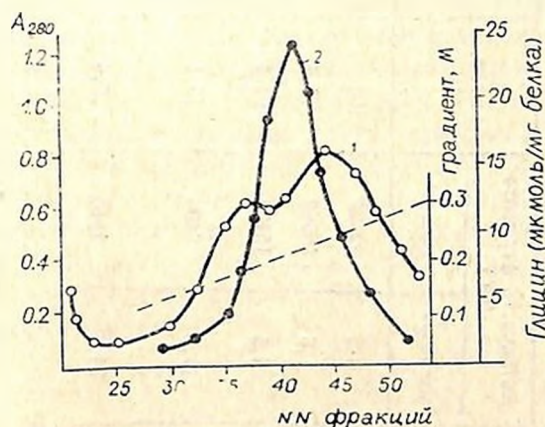


Рис. 2. Повторная ионообменная хроматография глицилглициндипептидазы мозга: 1—белок, 2—активность фермента

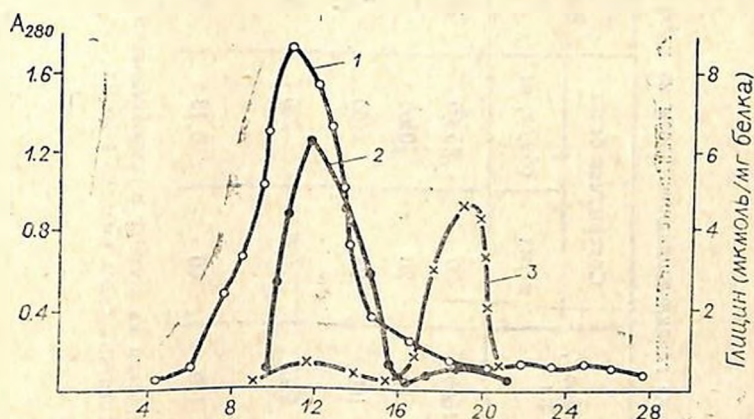


Рис. 3. Гель-фильтрация на колонке с сефадексом G-150 препарата глицилглициндипептидазы, полученного после повторной хроматографии на ДЭАЭ-сефадексе А-50: 1—белок, 2—активность фермента с Co^{2+} , 3—активность фермента с Co^{2+} и глицилглицином в элюирующем буфере

Фракционирование в сочетании кобальта и субстрата ($5 \times 10^{-3} \text{ M}$) в элюирующем буфере приводило к появлению также двух пиков (аналогичных по молекулярному весу форм глицилглициндипептидазы), однако с некоторым перераспределением активности между ними. В опытах с фракционированием в присутствии β -МЭ активности глицилглициндипептидазы обнаружено не было.

Таким образом, проведенные исследования свидетельствуют о том,

Таблица 1

Очистка глицилглициндипептидазы из мозга крупного рогатого скота

№ пп	Этапы очистки	Объем, мл	Содержание белка		Выход, %	Активность фермента (ед.)		Выход, %	Степень очистки
			мг/мл	общее, мг		удельная	общая		
1	Гомогенат	1500	30	45000	100	0,5	22500	100	1
2	Экстракт	530	20	10600	23,5	1,6	16960	75,4	3,2
3	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	100	28	2800	6,2	5,5	15400	68,4	11
4	ИОХ, ДЭАЭ-сефадекс А-50	250*	0,8	200	0,44	17,0	3400	15,1	34
5	Повторная ИОХ, ДЭАЭ-сефадекс А-50	100	60	0,13	0,13	24	1440	6,4	48

* 100 мл сульфатной фракции наносили на колонку с ионообменником в 10 этапов, на каждом из которых ферментный белок выходил в 25 мл

что глицилглициндипептидаза мозга является лабильным ферментом. Инактивация фермента при разбавлении, по-видимому, обусловлена диссоциацией его активной формы, что характерно для ферментов, имеющих четвертичную структуру. В пользу этого свидетельствуют полученные нами ранее данные [7]. В частности показано, что глицилглициндипептидаза головного мозга кошек обладает сложными кооперативными свойствами и представлена несколькими молекулярными формами, различающимися по электрофоретической подвижности в полиакриламидном геле, а также по физико-химическим и некоторым кинетическим свойствам. Имеются также сведения, указывающие на субъединичную структуру дипептидазы из других органов и тканей [11—13].

Влияние различных концентраций субстрата на активность глицилглициндипептидазы. Исследования проводили на препаратах частично очищенного фермента, полученных на стадии повторной ионообменной хроматографии. С целью сопоставления свойств частично очищенного фермента параллельно исследовали и глицилглициндипептидазу сульфатно-аммонийной фракции.

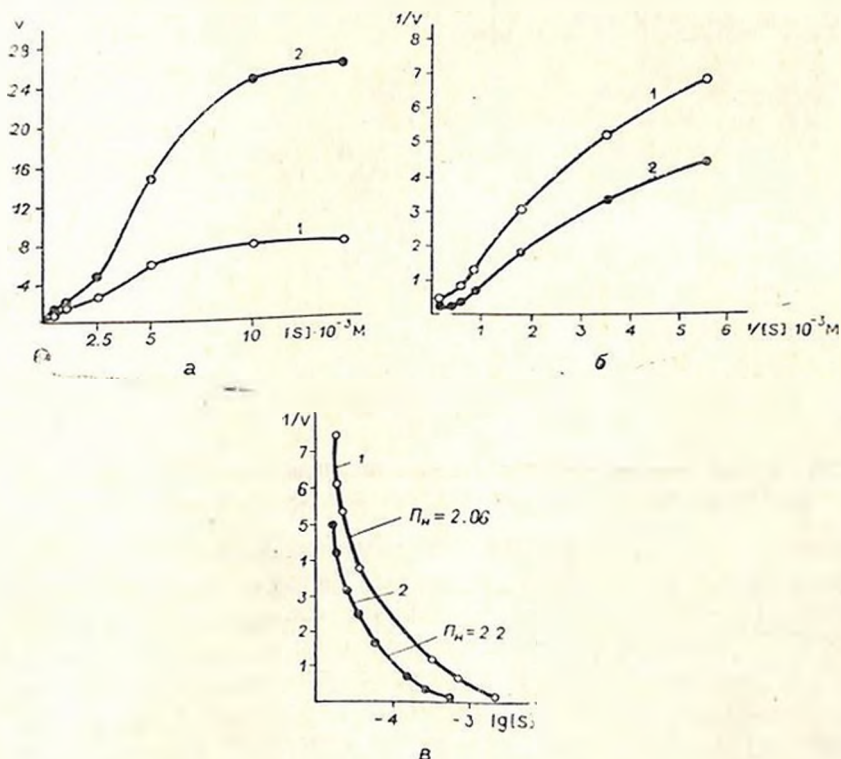


Рис. 4. Зависимость активности глицилглициндипептидазы от концентрации субстрата: 1—сульфатная фракция, 2—очищенный фермент

Зависимость скорости реакции от концентрации субстрата в обоих случаях описывается S-образной кривой (рис. 4, а, б). Отклонение от гиперболического закона Михаэлиса-Ментен подтверждается графиком, построенным в координатах Лайнуивера-Берка (рис. 4, б).

Коэффициенты Хилла, рассчитанные разностным методом [14], равны 2,06 и 2,2 соответственно для глицилглициндипептидазы сульфатно-аммонийной фракции и частично очищенного фермента (рис. 4, в).

Значения коэффициентов Хилла указывают на положительную кооперативность по субстрату и наличие в молекуле фермента как минимум двух активных центров.

Таким образом, глицилглициндипептидаза головного мозга крупного рогатого скота характеризуется сложным кинетическим поведением, свойственным для регуляторных ферментов. Экспериментальные данные, указывающие на сложные кооперативные взаимодействия в молекуле фермента и сложность структуры глицилглициндипептидазы, косвенно подтверждаются характером поведения фермента при выделении и очистке.

Зависимость активности от pH. Результаты опытов по исследованию зависимости активности глицилглициндипептидазы от pH инкубационной среды представлены на рис. 5. Как видно из рисунка, гидролиз глицилглицина ферментами сульфатно-аммонийной фракции мозга осуществляется в интервале pH 6,0—10,0. При этом можно выделить

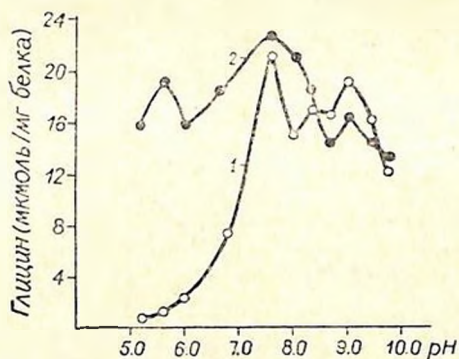


Рис. 5. Зависимость активности глицилглициндипептидазы от pH инкубационной среды: 1—сульфатная фракция, 2—очищенный фермент

три оптимума pH: 7,6; 8,3; 9,0 с преимущественным гидролизом субстрата при pH 7,6. Частично очищенный фермент также обнаруживает три оптимума pH, однако значения их не соответствуют таковым для фермента сульфатной фракции. В последнем случае исчезает пик при pH 8,3, но появляется при pH 5,7, однако, так же, как и в первом случае, максимальная активность фермента наблюдается при pH 7,6, что, по-видимому, соответствует действию основной формы дипептидазы [3].

Влияние ионов металлов и других реагентов на активность глицилглициндипептидазы. Активность многих дипептидаз зависит от ионов двухвалентных металлов [15, 16], которые, как полагают некоторые авторы, в комплексе с SH-группами ферментов принимают участие в образовании «меркаптидного мостика», имеющего непосредственное от-

ношение к присоединению субстрата к ферменту в процессе реакции [17, 18].

В табл. 2 представлены данные по исследованию влияния ионов металлов и других реагентов на активность глицилглициндипептидазы сульфатно-аммонийной фракции мозга и частично очищенного фермента. Глицилглициндипептидаза существенно активируется кобальтом и марганцем. Следует отметить, однако, что очищенный фермент почти в два раза больше активируется кобальтом, чем фермент сульфатно-аммонийной фракции. Активация же марганцем находится на одинаковом уровне. Магний ингибирует активность фермента на 50%, цинк практически полностью подавляет активность.

Из полученных данных следует, что кобальт является более эффективным активатором глицилглициндипептидазы, чем марганец. Результаты наших экспериментов по влиянию ЭДТА позволяют заключить, что кобальт не входит в активный центр фермента, однако является необходимым для проявления его каталитической активности. Функция кобальта, очевидно, заключается в образовании мостика, связывающего фермент с субстратом, либо в образовании или стабилизации соединения с определенной промежуточной конформацией белковой молекулы, необходимой для катализа.

Таблица 2

Влияние различных реагентов и ионов металлов на активность глицилглициндипептидазы головного мозга крупного рогатого скота

Реагент	Активность, %	
	Сульфатная фракция 0,3—0,7 насыщения	Частично очищенный фермент
Контроль	100	100
Co ²⁺	664	1449
Mn ²⁺	447	350
Mg ²⁺	50	49
Zn ²⁺	0	0
ЭДТА	80	80
п-ХМБ	95	0
β-МЭ	40	62

Примечание. Концентрация реагентов в смеси: 1×10^{-3} М

Данные по влиянию п-хлормеркурибензоата (п-ХМБ) свидетельствуют о том, что активность очищенной формы глицилглициндипептидазы зависит от SH-групп, поскольку их связывание приводит к исчезновению активности фермента. Отсутствие эффекта п-ХМБ на дипептидазу сульфатно-аммонийной фракции, по-видимому, связано с тем, что в ней присутствуют и другие ферменты, способные гидролизовать глицилглицин. Не исключено, что очищенная форма глицилглициндипептидазы имеет конформацию, в которой SH-группы более доступны действию п-ХМБ по сравнению с ферментом сульфатно-аммонийной фракции. В таком случае становится понятной более высокая активация кобальтом частично очищенного фермента, связанная с образова-

нием меркаптидного мостика, необходимого для присоединения субстрата.

Таким образом, полученные данные указывают на существенное значение SH-групп в проявлении каталитического действия глицилглициндипептидазы.

Ингибирующее действие β -МЭ свидетельствует о важной роли $-S-S-$ связей в проявлении ферментативной активности глицилглициндипептидазы головного мозга крупного рогатого скота.

PURIFICATION AND PROPERTIES OF GLYCYLGLYCINE DIPEPTIDASE FROM BOVINE BRAIN

REVA A. D., SHAINSKAYA A. M., GENHIN M. T., LEPEHIN E. A.

Chair of Biophysics and Biochemistry, State University, Dnepropetrovsk

Glycylglycine dipeptidase has been partially purified from bovine brain by a procedure involving ion-exchange chromatography on DEAE-sephadex A-50. The enzyme is labile and loses activity upon dilution.

This partially purified preparation of glycylglycine dipeptidase exhibits 3 pH optima (5,7; 7,6 and 9,0). The enzyme is inhibited by p-chloromercuribenzoate, β -mercaptoethanol, Mg^{2+} , Zn^{2+} and activated by Mn^{2+} . Enzyme activity is greatly enhanced by Co^{2+} .

The rate of the enzyme reaction versus substrate concentration curve doesn't fit the Michaelis-Menten equation. The value of Hill coefficient for ammonium sulfate fraction and for partially purified preparation is 2,06 and 2,2, respectively (estimated by several methods). The kinetic behaviour and some other properties of the enzyme point to the allosteric nature of bovine brain glycylglycine dipeptidase.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Цыперович А. С., Авдеев В. Г.—В сб.: Успехи биол. химии, М., Наука, 19. 61—82, 1978.
2. Smith E. L.—In: Methods in Enzymol., 2, N. Y. Acad. Press, 92—106, 1955.
3. Brecher A. S., Koski J. R. Arch. Intern. Physiol. of Biochem., 75, 5, 821—834, 1967.
4. Uzman L. L., Noort S., Rumley M. J. Neurochem., 9, 241—252, 1962.
5. Marks N.—Int. Rev. of Neurobiol., N. Y.—London, Acad. Press, p. 57—97, 1968.
6. Генгин М. Т., Березин В. О., Белан Л. И., Рева А. Д., Шаинская А. М.—В кн.: Третий Украинский биохимический съезд. Тезисы стендовых сообщений, Донецк, с. 57, 1977.
7. Генгин М. Т., Шаинская А. М.—В кн.: Метаболизм белков центральной нервной системы. Тезисы Всесоюзного симпозиума, Днепропетровск, с. 55, 1978.
8. Lowry O. H., Rosebrough M. J., Farr A. G., Randall R. J. J. Biol. Chem., 193, 265—275, 1951.
9. Lee V. P., Takahashi T. N. Anal. Biochem., 14, 71—77, 1968.
10. Кокунин В. А. Укр. биохим. ж., 47, 776—790, 1975.
11. Das M., Radhakrishnan A. N. Biochem. J., 128, 463—465, 1972.
12. Noren O., Sjöström H., Josefsson L. Acta Chem. Scand., 25, 1913—1915, 1971.

13. *Sugiura M., Ito G., Sawaki S.* Blochim. Biophys. Acta., 481, 578—585, 1977.
14. *Силонова Г. В., Ливанова Н. В., Курганов Б. И.* Молекулярная биология, 3, 768—784, 1969.
15. *Armstrong D. J., Mukhopadhyay J. K., Campbell B.* Biochemistry, 13, 1745—1750, 1974.
16. *Campbell B. J., Lin G.-Ih., Davis R. V., Ballew E.* Blochim. Biophys. Acta., 118, 371—386, 1966.
17. *Capobiano G., Vescia A.* Giorn. Biochim., 16, 33—43, 1967.
18. *Franiello S., Vescia A.* Arch. Biochem. and Biophys., 105, 465—469, 1964.

Кафедра биофизики и биохимии
Днепропетровского государственного
университета

Поступила 13.X 1981