



УДК 577.156+612.8.015.

## О ГЕТЕРОГЕННОСТИ ЭНКЕФАЛИНГИДРОЛИЗУЮЩЕЙ МЕМБРАНОСВЯЗАННОЙ АМИНОПЕПТИДАЗЫ МОЗГА ЧЕЛОВЕКА

ЖЕРНОСЕКОВ Д. Д.

Кафедра биохимии и биофизики Днепропетровского госуниверситета

Изучалась гетерогенность энкефалингидролизующей мембраносвязанной аминоксептидазы мозга человека с использованием хроматографии на ДЭАЭ-сефарозе CL-6B и группоспецифических сорбентах фенил-сефарозе и конканавалин-А-сефарозе. При хроматографии триптонового экстракта мембранной фракции мозга на ДЭАЭ-сефарозе CL-6B выявлены три фракции. Фракция, элюирующаяся без задержки, осуществляет полный гидролиз Met-энкефалина. Две другие фракции обладают сходной специфичностью действия по отношению к Met-энкефалину. Одна из них элюируется с колонки повышением ионной силы буфера, другая — добавлением в него 2%-ного триптона X-100. Результаты хроматографии исходного препарата фермента на конканавалин-А-сефарозе позволяют предположить гликопротеидную структуру по крайней мере одной из форм фермента.

Как и другие тканевые экзопептидазы аминоксептидазы мозга осуществляют деградацию белков и пептидов и, в частности, биологически активных пептидов-энкефалинов, которые могут выступать в роли нейромедаторов или нейромодуляторов [1]. Опубликованы исследования по изучению цитозольных аминоксептидаз [2—4]. Аминоксептидазы, выделенные из мозга различных животных, имеют общие свойства, характерные для группы ариламидаз: ингибирование пуромицином, ЭДТА, активация SH-реагентами.

В связи с трудностью выделения и очистки мембраносвязанные аминоксептидазы оказались менее изученными. Первые попытки очистки мембранных аминоксептидаз включали солилизацию фермента из мембран детергентом и ионообменную хроматографию на ДЭАЭ-ионообменнике [5, 6].

В настоящее время описаны методы получения высокоочищенных препаратов мембранных аминоксептидаз мозга различных животных [7—9]. Несмотря на то, что встречаются данные о существовании двух форм фермента, разделяемых методом диск-электрофореза [10], до сих пор основное внимание было уделено лишь одной из них. В

целом. вопрос о множественных молекулярных формах энкефалингидролизующей аминопептидазы и их свойствах недостаточно изучен. В отношении другого фермента, расщепляющего энкефалин,—дипептидилкарбоксипептидазы («энкефалиназы»), показано наличие нескольких молекулярных форм [11].

Задачей настоящей работы являлось изучение специфичности различных фракций мембраносвязанной энкефалингидролизующей аминопептидазы мозга человека.

### Материалы и методы

В работе использованы ДЭАЭ-сепароза CL-6B, фенол-сепароза, конканавалин-A-сепароза, аминогексилсепароза («Pharmacia», Швеция); биогель НТР («Bio-Rad», США), дитиотрентол, ЭГТА («Sigma», США), аланил-п-нитроанилид («Serva», ФРГ). Met-энкефалин был любезно предоставлен М. И. Титовым (Всесоюзный кардиологический научный центр АМН СССР).

Аминопептидазу выделяли из серого вещества головного мозга человека. При определении оптимальных условий солюбилизации мембраносвязанного фермента препарат мембран готовили по следующей схеме: 10%-ный гомогенат мозга в 0,05 М трис-НСl буфере pH 7,5, центрифугировали при 30000 g в течение 40 мин. Осадок ресуспендировали в исходном буфере в соотношении 1:2 (вес:объем). Из полученной мембранной суспензии готовили пробы с различным содержанием детергента (0; 0,5; 1 и 2%-ный тритон X-100 в конечной концентрации). После 40-минутной инкубации пробы центрифугировали при 30000 g в течение часа. В полученных надосадочных растворах и осадках определяли аминопептидазную активность.

Для колоночной хроматографии во всех случаях в качестве исходного препарата применяли тритоновый солюбилизат, полученный по схеме, описанной в работе Нui и соавт. [7]. Число промывок было увеличено до 3-х с добавлением в среду 0,5 М NaCl. При этих условиях исключалась возможная сорбция растворимой аминопептидазы препаратами мембран.

Активность аминопептидазы определяли спектрофотометрически и методом тонкослойной хроматографии. Спектрофотометрическое определение активности фермента проводили при длине волны 405 нм. В качестве субстрата использовался аланил-п-нитроанилид, конечная концентрация которого в инкубационной пробе составляла  $5 \cdot 10^{-4}$  М. Инкубационная смесь содержала 0,12 М фосфатный буфер, pH 7,0 и 0,12 мМ дитиотрентола. После 45-минутной инкубации при 37° пробы подвергались 2-минутному кипячению с последующим центрифугированием с целью достижения прозрачности исследуемых проб. Величину У. А. фермента выражали в мкмоль отщепленного от аланил-п-нитроанилидного субстрата п-нитроанилина (п-НА) за 1 мин инкубации в расчете на 1 мг белка.

Энкефалингидролизующую активность мембраносвязанной аминопептидазы определяли при помощи тонкослойной хроматографии на силикагелевых пластинках («Silufol», СССР). Инкубационная смесь имела следующий состав: 50 мкл препарата фермента, 20 мкл 0,05 М трис-НСl буфера, pH 7,5, 50 мкл раствора Met-энкефалина (2 мг в 1 мл). Контрольные пробы содержали 20 мкл раствора Met-энкефалина и 20 мкл буфера. Кроме того, для идентификации аминокислот, отщепляемых от Met-энкефалина, готовили растворы аминокислот-свидетелей в 0,05 М трис-НСl буфере, pH 7,5—глицина (2 мг/мл) и тирозина (2 мг/мл). Опытные и контрольную пробы помещали в термостат при 37°. После часовой инкубации от опытных и контрольной проб, а также от растворов-свидетелей отбирали аликваты по 20 мкл и наносили на силикагелевую пластинку в виде пятна, диаметр которого не превышал 1 мм. После нанесения проб пластинку погружали в систему этилацетат—изопропанол—5%-ная уксусная кислота (2:2:1). По окончании хроматографии

пластинку высушивали и окрашивали 2%-ным раствором нингидрина на этаноле. Затем пластинку снова высушивали и по появлению пятен аминокислот, отщепляемых от энкефалингидролизующей активности ферментативных реакций.

Хроматографию на микроколонке с ДЭАЭ-сефарозой CL-6B (объем геля 1 мл) проводили следующим образом: колонку уравнивали буфером А (25 мМ трис-НСl, рН 7,5; 2 мМ, ЭГТА; 0,2 мМ дитиотреитол), затем наносили 200 мкл исходного препарата фермента. Промывку колонки осуществляли вышеуказанным буфером А (4 объема колонки). Элюцию фермента проводили в два этапа: исходным буфером, содержащим 0,3 М NaCl и буфером такого же состава, содержащим 2%-ный тритон X-100. Объем собираемых фракций составил 1 мл, скорость элюции—18 мл/ч.

Колонку с фенил-сефарозой (объем геля 1 мл) уравнивали буфером А (25 мМ трис-НСl буфером, рН 7,5. После нанесения исходного препарата фермента (200 мкл) колонку промывали вышеуказанным буфером. Элюцию проводили буфером, содержащим 2%-ный тритон X-100. Объем собираемых фракций составлял 1 мл, скорость элюции—25 мл/ч.

Колонку с коканаваллин-А-сефарозой (объем геля—1 мл) уравнивали 0,025 М трис-НСl буфером, рН 7,4, содержащим  $MgCl_2$ ,  $MnCl_2$  и  $CaCl_2$  (по 1 мМ) и 0,1%-ный тритон X-100. Элюцию гликопротеинов проводили 10%-ным раствором метил- $\alpha$ -D-глюкопиранозиды, приготовленном на том же буфере. Объем элюата составлял 1 мл, скорость элюции—25 мл/ч.

Получение очищенного препарата мембраносвязанной аминопептидазы проводили последовательно хроматографией исходного препарата фермента на ДЭАЭ-сефарозе CL-6B, биогеле НТР и АН-сефарозе 4В.

Колонку с ДЭАЭ-сефарозой CL-6B (1,7×21 см) уравнивали буфером А. После нанесения ферментного препарата колонку промывали указанным буфером. Элюцию осуществляли линейным градиентом NaCl (0—0,4 М) общим объемом 400 мл (объем фракций—8 мл, скорость элюции—18 мл/ч). Пробы, содержащие аминопептидазную активность, объединяли и наносили на колонку с биогелем НТР (1,1×8,4 см), предварительно уравновешенную буфером А. Фермент элюировали, используя линейный градиент фосфата (0—0,2 М), общим объемом 300 мл (объем фракций—5 мл, скорость элюции—12 мл/ч).

Объединенную фракцию после хроматографии на биогеле НТР наносили на колонку с АН-сефарозой 4В (0,9×5,5 см). Фермент элюировали градиентом NaCl (0—1 М). Объем элюата составлял 3 мл, скорость элюции—18 мл/ч.

Белок во фракциях определяли по Bradford [12], Lowry и соавт. [13].

### Результаты и обсуждение

Исследование зависимости выхода активности фермента от концентрации детергента показало, что при соотношении детергент/белок 1,66 солибилизуется практически весь фермент (рис. 1). Поэтому при выделении и очистке фермента на стадии солиubilизации мы применяли тритон X-100 в конечной концентрации 1%, что соответствует вышеуказанному соотношению. Применение большей концентрации детергента является нежелательным, так как при колоночной хроматографии он может затруднять сорбцию фермента [14, 15].

Для решения вопроса о гетерогенности форм мембраносвязанной аминопептидазы, гидролизующей энкефалины, использовали хроматографию на ДЭАЭ-сефарозе CL-6B и группспецифических сорбентах.

На рис. 2 представлены результаты ионообменной хроматографии на микроколонке с ДЭАЭ-сефарозой CL-6B. С помощью хромато-

то субстрата, аланил-п-нитроанилида, были обнаружены 3 фракции, содержащие аминопептидазную активность.

Часть ферментного препарата, как это отмечалось и другими авторами [7], не связывалась с ионообменником (эта фракция обозначена в дальнейшем как фракция «Н»). Фракция I была получена элюцией фермента с колонки 0,3 М NaCl, приготовленным на буфере А. Остаточная аминопептидазная активность (фракция II) элюировалась с колонки только при наличии в элюирующем буфере тритона X-100 (в конечной концентрации 2%).

От всех полученных фракций отбирались аликвоты для определения энкефалингидролизующей активности.

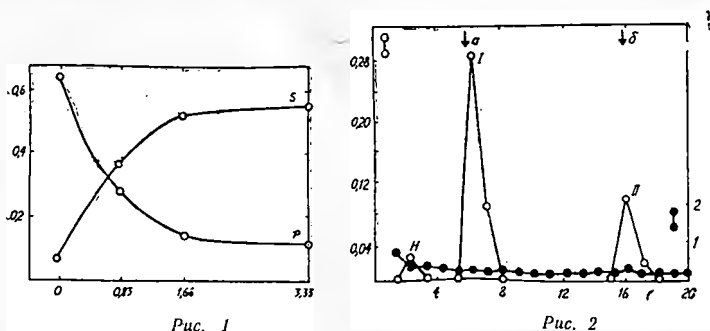


Рис. 1. Солюбилизация мембраносвязанной аминопептидазы тритоном X-100. По оси абсцисс—соотношение детергент/белок (мг/мг), по оси ординат—активность аминопептидазы, выраженная в мкмоль п-НА, образующегося за 45 мин инкубации при 37°, S—активность фермента в супернатанте, P—активность фермента в осадке после центрифугирования проб с различным содержанием детергента

Рис. 2. Хроматография мембраносвязанной аминопептидазы на микроколонке с ДЭАЭ-сефарозой CL-6B. По оси абсцисс—объем собираемых фракций в мл, по оси ординат слева—активность аминопептидазы в мкмоль п-НА, образующегося за 45 мин инкубации при 37°, справа—содержание белка во фракциях (мг/мл). а—элюция буфером А, содержащим 0,3 М NaCl, б—элюция буфером А, содержащим 0,3 М NaCl и 2%-ный тритон X-100

Результаты тонкослойной хроматографии продуктов деградации энкефалина, приведенные на рис. 3, показывают, что фракция «Н» содержит целый набор энкефалингидролизующих ферментов. Видимо, кроме аминопептидазной, в данной фракции присутствуют также дипептидиламинопептидазная, карбоксипептидазная и дипептидилкарбоксипептидазная активности. Об этом свидетельствует наличие на дорожке пятен всех аминокислот, входящих в состав Met-энкефалина. Фракции I и II содержат аминопептидазную и дипептидиламинопептидазную активности, о чем свидетельствует присутствие на соответствующих дорожках пятен тирозина и глицина (рис. 3, I и II).

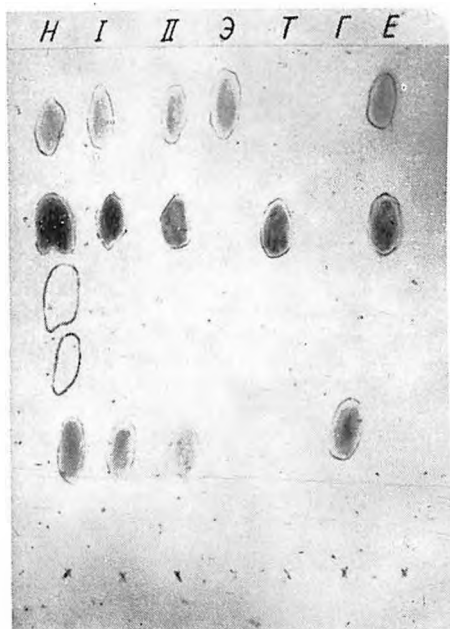


Рис. 3. Тонкослойная хроматография продуктов деградации Мет-энкефалина мембраносвязанной аминопептидазой после фракционирования фермента на колонке с ДЭАЭ-сефарозой CL-6B. Н—несвязавшаяся фракция, I—фракция I, II—фракция II, Э—Мет-энкефалин (2 мг/мл), Т—тирозин (2 мг/мл), Г—глицин (2 мг/мл), Е—препарат фермента очищенный последовательно на колонках с ДЭАЭ-сефарозой CL-6B, биогедемом НТР, АП-сефарозой 4В

На рис. 4 представлены хроматограммы всех этапов очистки фермента. Получение мембраносвязанной аминопептидазы из мозга человека на ДЭАЭ-сефарозе проводили в соответствии с получением фракции I на микроколонке (рис. 4, а). На конечной стадии был получен препарат фермента, обладающий способностью гидролизировать связь Туг-Gly в молекуле энкефалина без последующей деградации, приводящей к образованию тетрапептида (рис. 3, фракция Е).

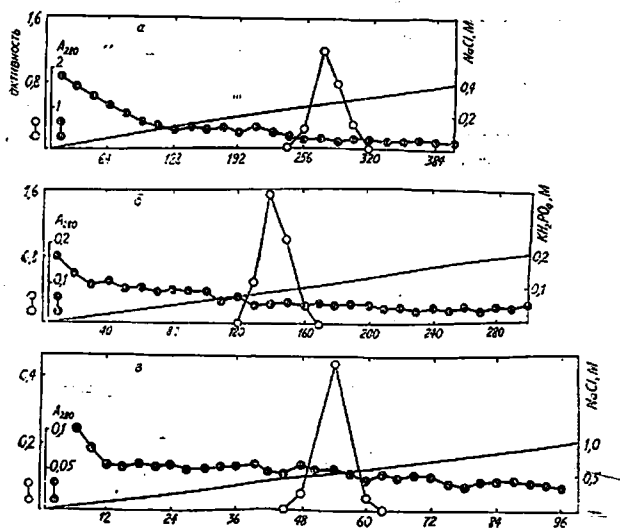


Рис. 4. Очистка мембраносвязанной аминопептидазы мозга хроматографией на колонках с ДЭАЭ-сефарозой CL-6B (а), биогеом НТР (б) и АН-сефарозой 4В (в). По оси абсцисс—объем собираемых фракций в мл, по осям ординат: слева—ферментативная активность и величина поглощения при 280 нм; справа—градиент концентраций NaCl (а, в) и  $KH_2PO_4$  (б)

Так как тирозин является единственной аминокислотой, отщепляемой от Met-энкефалина, можно утверждать, что в процессе выделения фермента аминопептидазная и дипептидиламинопептидазная активности разделились.

Анализ результатов ионообменной хроматографии на микроколонке (табл. 1) позволяет объяснить потерю общей активности фермента при очистке на ДЭАЭ-сефарозе CL-6B, поскольку, помимо несвязавшейся, существует значительная остаточная аминопептидазная активность, которая элюируется с колонки только при добавлении в элюирующий буфер детергента. Однако повышение величины  $U_A$  мембраносвязанной аминопептидазы наблюдалось только для фракции I, в то время как фракция II практически не очищалась.

Возможно, что фермент, входящий в состав мицелл детергента,

частично ингибирован по сравнению с тем, который элюируется при повышении ионной силы без детергента. В пользу такого предположения свидетельствуют результаты, полученные при хроматографии исходного препарата мембраносвязанной аминопептидазы на микроколонке с фенил-сефарозой 4В (табл. 2, рис. 5, а). Величина  $U_A$

Таблица 1

Хроматография мембраносвязанной аминопептидазы головного мозга на микроколонке с ДЭАЭ-сефарозой CL-6В

| Наименование фракций   | Содержание белка во фракции |      | Активность фермента во фракции |                          |
|------------------------|-----------------------------|------|--------------------------------|--------------------------|
|                        | мг/мл                       | мг   | мкмоль п-НА/мин                | мкмоль п-НА/мин/мг белка |
| Тритоновый солюбилизат | 5,0                         | 1,0  | 0,84                           | 0,84                     |
| Несвязавшаяся фракция  | 0,45                        | 0,45 | 0,04                           | 0,1                      |
| Фракция I              | 0,25                        | 0,25 | 0,56                           | 2,2                      |
| Фракция II             | 0,30                        | 0,30 | 0,20                           | 0,7                      |

Примечание. Условия хроматографии см. в разделе «Материалы и методы» и на рис. 2.

Таблица 2

Хроматография мембраносвязанной аминопептидазы головного мозга человека на колонке с фенил-сефарозой

| Наименование фракций   | Содержание белка во фракции |      | Активность фермента во фракции |                          |
|------------------------|-----------------------------|------|--------------------------------|--------------------------|
|                        | мг/мл                       | мг   | мкмоль п-НА/мин                | мкмоль п-НА/мин/мг белка |
| Тритоновый солюбилизат | 5,0                         | 1,0  | 3,12                           | 3,12                     |
| Фенил-сефарозная       | 0,52                        | 0,52 | 1,56                           | 3,00                     |

Примечание. Условия проведения хроматографии см. в разделе «Материалы и методы» и на рис. 5, а.

Таблица 3

Очистка мембраносвязанной аминопептидазы головного мозга человека

| Наименование фракций                            | Содержание белка во фракции |       | Активность фермента во фракции |                           |
|-------------------------------------------------|-----------------------------|-------|--------------------------------|---------------------------|
|                                                 | мг/мл                       | мг    | мкмоль /п-НА/мин               | мкмоль /п-НА/мин/мг белка |
| Тритоновый солюбилизат                          | 5,2                         | 119,6 | 425,5                          | 3,5                       |
| Объединенная фракция после ДЭАЭ-хроматографии   | 0,24                        | 6,0   | 195,0                          | 32,5                      |
| Объединенная после хроматографии на биогеле НТР | 0,015                       | 0,45  | 30,1                           | 66,9                      |
| Объединенная после хроматографии на АН-сефарозе | 0,009                       | 0,081 | 28,7                           | 354,0                     |

аминопептидазы в полученной при этом фракции не повышается по сравнению с У. А. фермента в тритоновом солюбилизате.

Таким образом, для мембраносвязанной аминопептидазы, гидролизующей энкефалин, можно предположить наличие, по меньшей мере, двух форм фермента, различающихся по физико-химическим свойствам. Одна из них элюируется из колонки с ДЭАЭ-сефарозой повышением ионной силы, вторая—добавлением в элюирующий раствор детергента. Объяснение этому феномену следует, по-видимому, искать в особенностях структуры гидрофобных доменов в молекулах двух форм фермента. Кроме того, хроматографией на конканавалин-А-сефарозе нами также было показано существование, по крайней мере, двух форм аминопептидазы в исходном препарате (табл. 3, рис. 5, б). По-видимому, в исходном препарате содержатся аминопептидазы, имеющие маннозные остатки в углеводных фрагментах гликопро-

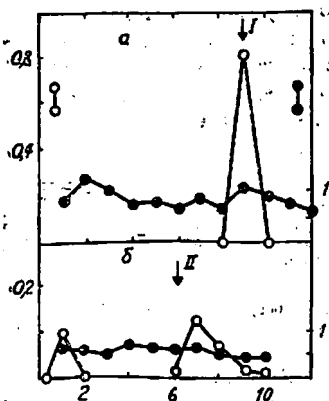


Рис. 5. Хроматография мембраносвязанной аминопептидазы на микроколонках с фенил-сефарозой (а) и конканавалин-А-сефарозой (б). По оси абсцисс—объем собираемых фракций в мл, по оси ординат: слева—ферментативная активность, справа—содержание белка во фракциях (мг/мл). Стрелками обозначены: I—элюция буфером, содержащим 2%-ный тритон X-100, II—элюция буфером, содержащим 10%-ный метил- $\alpha$ -D-глюкопиранозид.

теина и аминопептидазы, не связывающиеся с конканавалином-А. Определить принадлежность этих форм фермента к какой-либо из полученных ферментных фракций при хроматографии на ДЭАЭ-сефарозе CL-6B не удалось из-за низкой аминопептидазной активности фракций, получаемых при пропускании фермента через колонку с конканавалин-А-сефарозой. Это обстоятельство затрудняло также использование фракций, получаемых ионообменной хроматографией в дальнейших исследованиях. Снижение аминопептидазной активности в данном случае происходит из-за ингибирующего действия ионов двухвалентных металлов, содержащихся в буфере, применяемом для работы с конканавалин-А-сефарозой. По этой же причине не может быть окончательно решен вопрос о гликопротеиновой природе полученного нами очищенного препарата фермента.

Таким образом, вполне вероятно, что молекулярная гетерогенность характерна не только для дипептидилкарбоксипептидазы—«эн-



кефалиназы» [11], но и для мембраносвязанной —аминопептидазы мозга. Можно предположить, что наличие гетерогенности молекулярных форм аминопептидазы, также как и «энкефалиназы», связано с существованием различных рецепторов энкефалинов.

## ON HETEROGENEITY OF HUMAN BRAIN ENKEPHALIN-HYDROLYZING MEMBRANE BOUND AMINOPEPTIDASE

ZHERNOSEKOV D. D.

Chair of Biophysics and Biochemistry, Dnepropetrovsk State University

Heterogeneity of human brain Met-enkephalin-hydrolyzing membrane bound aminopeptidase has been studied by means of chromatography on DEAE-Sepharose CL-6B; phenyl-Sepharose CL-6B and Con A-Sepharose. DEAE-Sepharose CL-6B column chromatography of crude brain Triton X-100 extract reveals 3 aminopeptidase fractions: one fraction that passed through the support and two others, that were eluted by increasing salt concentration and by 2% Triton X-100, respectively. Binding of initial extract with Con A-Sepharose points to the glycoprotein nature of at least one form of aminopeptidase.

### Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Schwartz J. C., de la Baume S., Malfroy B., Patey G., Perdrisot R., Swerts J. P., Fournie-Zaluski M. C., Gacel G., Roques B. P. *Physiol. Pept. New trends Radioimmunol.*, v. 58, p. 31—42, 1981.
2. Hersh L. B., Mc. Kety J. F. J. *Neurochem.*, v. 36(1), p. 171—178, 1981.
3. Schnebli H. P., Phillips M. A., Barclay R. K. *Biochim. et biophys. acta*, v. 569, p. 89—98, 1979.
4. Hayashi M., Oshima K. J. *Biochem.*, v. 81, p. 631—639, 1977.
5. D'Monte B., Marks N., Datta R. K., Lajtha A.—In: *Protein metabolism of the nervous system* (ed. A. Lajtha), p. 185—217, Plenum Press, New York, p. 185—217, 1970.
6. Hersh L. B. *Biochemistry*, v. 20, № 8, p. 2345—2350, 1981.
7. Hui K. S., Wang Y.-J., Lajtha A. *Biochemistry*, v. 22, № 5, p. 1062—1067, 1983.
8. Shimamura M., Hazato T., Kalayama T. *Biochim. et biophys. acta*, v. 756, № 3, p. 223—229, 1983.
9. Жерносеков Д. Д., Генгин М. Т., Рева А. Д., Шрам С. И. Докл. АН УССР, № 1, с. 62—64, 1985.
10. Рева А. Д., Мелешко В. И., Генгин М. Т., Жерносеков Д. Д. Материалы 9-й Всесоюз. конф. по биохимии нервной системы, с. 81—82, Ереван, 1983.
11. Ruch. Robert S., Hersh L. B. *Life Sci.*, v. 31, № 5, p. 445—451, 1982.
12. Bradford M. M. *Anal. Biochem.*, v. 72, № 2, p. 248—254, 1976.
13. Lowry O. H., Rosebrough H. J., Farr L. A., Randal R. J. *J. Biol. Chem.*, v. 193, p. 265—275, 1951.
14. Berezin V., Rasmussen S., Bock E. *Protides Biol. Fluids. Proc. 30th. Colloq. Brussels*, v. 30, p. 79—82, 1982.
15. Березин В. А., Шаповал Т. И., Жолудь Л. М. *Биохимия*, т. 48, № 8, с. 1329—1336, 1983.

Поступила 4. IX 1985