



УДК 612.822 1.017.1

ОЧИСТКА И НЕКОТОРЫЕ СВОЙСТВА
АМИНОПЕПТИДАЗЫ МИЕЛИНА

ХРУСТАЛЕВА Н. А., БАСКАЕВА Т. С., ХОХЛОВ А. П.

I Московский ордена Ленина и ордена Трудового Красного Знамени
медицинский институт им. И. М. Сеченова

Работа посвящена выделению аминоксептидазы миеллина и изучению ее некоторых физико-химических характеристик.

Установлено, что аминоксептидаза находится в миеллине в связанном состоянии и проявляет активность только после предварительной обработки. Активность фермента колеблется от 10 до 24 ед./мг белка.

Показано, что аминоксептидаза миеллина имеет величину $M_r 62,3 \pm 3,7$ кД, оптимум рН 9,6—9,8, ИЭТ при рI 8,92.

Спектр ферментов миеллина до настоящего времени не выяснен и является предметом обсуждения [1]. Что касается протеолитических энзимов, то сведения о них крайне ограничены и зачастую противоречивы. Исследованиями D'Monte и соавт. [2] показано присутствие в миеллине кислых и нейтральных протеаз с низкой величиной У. А. 0,1 до 0,62 ммоль/ч на 1 г белка и аминоксептидазы с У. А. 24 ммоль/ч на 1 г белка, что соответствует прежнему представлению о миеллине как инертной биологической структуре. Однако полученные в дальнейшем данные [3] о высокой скорости обновления белков миеллина (период полужизни основного белка миеллина мозга крысы составил 20—30 дней) позволили предположить присутствие в миеллине протеолитических ферментов с высокой величиной У. А.

Целью настоящей работы явилась очистка и изучение некоторых свойств обнаруженной нами высокоактивной аминоксептидазы миеллина мозга.

В работе были использованы кролики породы шиншилла. После декапитации головной мозг немедленно извлекали и обрабатывали. Миелин выделяли по методу Norton, Poduslo [4] в некоторой модификации, 1,5 г ткани мозга гомогенизировали в 10 мл 0,32 М раствора сахарозы (I стадия). Гомогенат насливали в равном объеме на 0,85 М раствор сахарозы в 0,1 М трис-буфере рН 7,4 и центрифуги-

ровали в центрифуге VAC-602 на бакет-роторе 30 мин при 75000g (II стадия). Промежуточный слой, содержащий миелин, осторожно отсасывали, смешивали с 15 мл дистиллированной воды и центрифугировали 15 мин при 75000 g (III стадия). Осадок суспендировали в 8 мл дистиллированной воды и вновь насливали на 0,85 М раствор сахарозы. Пробу центрифугировали 30 мин при 75000g на бакет-роторе (IV стадия). Промежуточный слой суспендировали в 8 мл физиологического раствора и центрифугировали при 20000 g (V стадия). Осадок, суспендированный в физиологическом растворе в соотношении 1:7, использовали для выделения фермента.

Активность фермента определяли по методу Hashen, Farr [5]. Белок определяли по Lowry и соавт. [6]. Величину У. А. выражали в мкмоль гидразина, образующегося в мин/мг белка. Для выявления субстратной специфичности использовали другие субстраты L-лейцинамид [7], L-лейцин-л-нитроанилид. В последнем случае определение активности фермента проводили по методу Nagel и соавт. [8]

Гомогенность выделенного фермента и величину M_r определяли методом электрофореза в ПААГ. В качестве маркеров применяли набор стандартных белков («Pharmacia», Швеция).

Оптимальный для фермента диапазон pH выявляли с помощью 0,1 М глицинового буферного раствора (pH от 8,0 до 10,0).

Изоэлектрическую точку определяли методом изохроматофокусирования, предложенного Slyterman и соавт. [9]. В качестве ионообменной твердой фазы использовали гель PBE 118 («Pharmacia», Швеция), уравновешенный 0,025 М триэтиламинным буфером, pH 11,0. Элюцию пробы проводили фармалитом в разведении 1:45, pH 8,0—10,5. Фракцию собирали, используя коллектор Ultrarak («LKB», Швеция). Проверку образцов проводили спектроскопически, применяя проточный спектрофотометр Uvicord III («LKB», Швеция). Одновременно в пробах проводили определение активности фермента. Образцы, имеющие активность фермента, отбирали и измеряли pH при помощи прецизионного pH-метра («Orion», США) с микроэлектродами («LKB», Швеция), соответствующими их изоэлектрической точке.

Ранее в биологических жидкостях больных демиелинизирующими заболеваниями нами обнаружен протеолитический фермент миелина в комплексе с ингибитором, имеющим высокое сродство к декстранам [10]. Последнее обстоятельство значительно облегчает процесс выделения фермента. Для этого исследуемую биологическую жидкость пропускают через колонку с сефадексом G-75 и многократно промывают сорбированный фермент физиологическим раствором. Сефадекс на колонке слегка подсушивают кратковременным центрифугированием и оставляют при температуре 0—5° на 4—5 дней. За это время (видимо вследствие аутоокисления) разрушается химическая связь между ферментом и связывающим агентом и становится возможным элюирование растворами слабой ионной силы. Однако при использовании в качестве источника фермента суспензии миелина метод оказался недостаточным

эффективным (активность фермента колебалась в пределах 2—6 ед/мг белка) и вследствие этого был модифицирован.

Выделение фермента из миелина проводили следующим образом: на колонку размером $10 \times 1,5$ см с приспособлением для центрифугирования, наполненную набухшим сефадексом G-75, наносили суспензию миелина (6—8 мг белка) и центрифугировали при 700 g 1 мин. Балластные белки смывали сначала 20—25 мл физиологического раствора, затем 10 мл 3%-ного раствора формальдегида, содержимое колонки центрифугировали при 700 g 1 мин, после чего фермент элюировали 5 мл 7%-ного раствора формальдегида в 0.01 М трис-HCl буфере pH 7,4 с повторным центрифугированием в тех же условиях.

Вся процедура выделения занимала не более 1,5 ч и была проведена при комнатной температуре. Лиофилизированный препарат фермента накапливали (в течение месяца фермент терял не более 5% активности) и использовали для исследования.

Величина У. А. выделенного фермента находилась в пределах 10—24 ед/мг белка, тогда как исходная активность аминопептидазы миелина колебалась от 0,01 до 0,03 ед/мг белка.

Сравнительное исследование величины У. А. фермента на различных стадиях очистки миелина показало, что ферментативная активность не является примесью других фракций мозга. В то же время попытка выделить фермент из неочищенных гомогенатов мозга вышеописанным способом была неудачной.

Электрофоретическое исследование препарата в присутствии ДДС-Na показало, что фермент очищен до состояния, близкого к гомогенному (рисунок). Изучение его электрофоретической подвижности в сравнении со стандартными белками позволило установить M_r основной белковой полосы, равную $62,3 \pm 3,7$ кД, и минорной полосы, равную, $14,4 \pm 1,2$ кД.

Для проверки специфической активности обнаруженных фракций столбик геля извлекали из трубочек, разрезали в поперечном направлении по 2 мм и каждый кусочек элюировали 0.05 М веронал-мединаловым буфером pH 8,6, содержащим 2,5%-ный KCl, в присутствии которого ДДС-Na осаждается. Надосадочную жидкость анализировали на наличие активности. Установлено, что 95% аминопептидазной активности (субстрат лейцингидразид) обладал участок геля, соответствующий фракции с M_r $62,3 \pm 3,7$ кД и лишь 5% активности фермента было обнаружено в зоне, соответствующей M_r $14,4 \pm 1,2$ кД.

В опытах с использованием различных субстратов установлено, что очищенный фермент имеет определенную субстратную специфичность и с одинаковой скоростью гидролизует лейцингидразид, лейцинамид и совершенно не расщепляет классический ариламидазный субстрат лейцин- β -нитроанилид, который исследователи часто используют для определения протеазной активности миелина [11].

Оптимальная область pH выделенного фермента соответствует значениям 9,6—9,8, тогда как другие протеолитические ферменты миелина проявляли наибольшую активность при нейтральных значениях pH. [12].

Анализ препарата фермента методом изохроматофокусирования показал присутствие 2 белков с различными изоточками (рисунок). Точки рН изофокусирования обнаруженных пиков соответствуют рІ 8,92 и рН 7,76, при этом активность фермента с изоточкой рІ 8,92 в три раза превосходила активность другой фракции фермента.

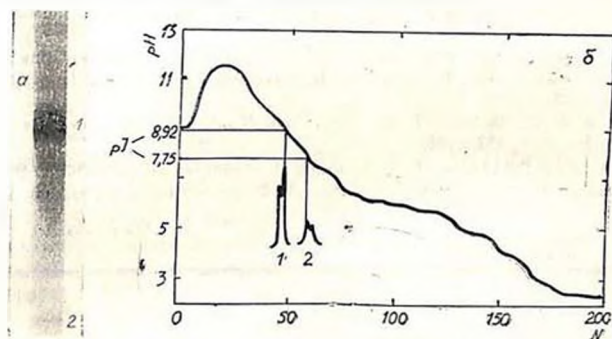


Рис. Электрофорез в ПААГ (а) и изофокусирование (б) препарата фермента, выделенного из миелина: 1—фракция с M_r 62,3 кД; 2—фракция с M_r 14,4 кД

Таким образом, в миелине ЦНС животных впервые обнаружен протеолитический фермент с высокой активностью, который обладает определенной субстратной специфичностью и имеет рН в щелочной среде с изоточкой рН 8,92.

PURIFICATION AND PROPERTIES OF AMINOPEPTIDASE FROM MYELIN

KHRYSTALYEVA N. A., BASKAEVA T. S., KHOKHLOV A. P.

I. M. Sechenov 1st Medical School, Moscow

Purification scheme and some physico-chemical properties of aminopeptidase from myelin are reported. It has been established that enzyme exists in myeline in a membrane bound form and is released only after pretreatment. The specific activity of enzyme is 10–24 U/mg of protein, M_r is $62,3 \pm 3,7$ kDa, pH optimum—9,6, pl value—8,92.

ЛИТЕРАТУРА

1. Lees M. B., Sapirstein V. S. Myelin-associated enzymes Dept. Biochem. Eunice Kennedy Shriver Center Mental Retardation, Waltman. Handbook Neurochem. New-York, v. 4, p. 435–460, 1983.
2. D'Monte B., Mela P., Parks N. Eur. J. Biochem. v. 23, № 2, p. 355–365, 1971.
3. Agrawal H. C., Fujimoto K., Eurlon R. M. Trans Amer. Soc. Neurochem., v. 6, p. 127, 1975.

4. Norton W. T., Poduslo S. E. J. Neurochem., v. 21, p. 749—759, 1973.
5. Hashen R. J., Farr D. Z. Klin. Chem. and Klin. Biochem., v. 6, p. 11—12, 1968.
6. Lowry O. H., Rosengrough N. J., Farr A. L., Randal R. J. J. Biol. Chem. v. 193, p. 265—275, 1951.
7. Spackman D. H., Smith E. L., Brown D. M. J. Biol. Chem., v. 212, p. 255—269, 1955.
8. Nagel W. F., Willing F., Schmidt F. H. Klin. Wochenschrift, v. 42, p. 447, 1964.
9. Slyterman L. A. E., Wijdenes J.—In: Proc. Int. Symp. Electrofocusing and Iso-tachophoresis, (eds. B. J. Radola, D. Graesslin.), p. 463—466, de Gruyter, Berlin, 1977.
10. Хохлов А. П., Баскаева Т. С., Хрусталева Н. А. Бюл. эксперим. биол. и мед., т. 10, с. 430—432, 1986.
11. Rinne U. K., Riekkinen P. J. Acta neurol. scand., v. 44, p. 156—167, 1968.
12. Riekkinen P. J., Clausen J., Arstila A. U. Brain Res. v. 19, p. 213—227, 1970.

Поступила 30. VII 1987

В ИЗДАТЕЛЬСТВЕ «НАУКА»

готовится к печати в 1988 г. (II квартал) монография Тарановой Н. П. «Липиды центральной системы при повреждающих воздействиях» 12 а. л.

Настоящая работа является первой попыткой систематического изучения закономерностей повреждающего действия различных патогенных факторов на мембранные структуры ЦНС путем всестороннего исследования состава и обмена различных липидов головного и спинного мозга. Специально разработанный методический подход позволил получить новые факты, раскрывающие некоторые, ранее неизвестные стороны патогенеза поражений ЦНС при острой и хронической интоксикации фосфорорганическими соединениями, при аллергической демиелинизации и при остром лучевом поражении. Впервые показано, что при действии различных повреждающих факторов в ЦНС развиваются как специфические, так и неспецифические изменения в составе и обмене липидов. Получен экспериментальный материал, вскрывающий ряд особенностей состава и обмена липидов спинного мозга, заслуживающих дальнейшего исследования. На основе всестороннего анализа экспериментальных данных и сведений литературы впервые выдвигается и обосновывается положение о том, что в основе различных повреждений структуры и функций нервной системы лежат нарушения в составе и обмене липидных компонентов и/или глиальных мембран. В книге представлены данные, характеризующие направленность и глубину нарушений обмена различных липидов при указанных повреждениях, а также общие закономерности метаболического ответа нервной ткани на ряд повреждающих воздействий, независимо от природы патогенного фактора.

Книга представляет интерес для специалистов, работающих в области нейробиологии, невропатологии, токсикологии.