

✓
КИЕВСКИЙ ОРДЕНА ЛЕНИНА И ОРДЕНА ОКТЯБРЬСКОЙ РЕВОЛЮЦИИ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ имени Т. Г. ШЕВЧЕНКО

На правах рукописи

УДК 577.156.612.8.015

ЖЕРНОСЕКОВ ДМИТРИЙ ДАНИЛОВИЧ

**МЕМБРАНОСВЯЗАННАЯ АМИНОПЕПТИДАЗА
НЕРВНОЙ ТКАНИ, ГИДРОЛИЗУЮЩАЯ ЭНКЕФАЛИНЫ**

03.00.04 — биохимия

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Киев
1985

Работа выполнена на кафедре биофизики и биохимии Днепропетровского Ордена Трудового Красного Знамени государственного университета имени 300-летия воссоединения Украины с Россией.

Научный руководитель
доктор биологических наук, профессор А.Д.Рева.

Официальные оппоненты:
доктор биологических наук, профессор Я.В.Белик,
кандидат биологических наук, доцент А.Н.Васильев.

Ведущее учреждение - институт эндокринологии и обмена веществ Минздрава УССР.

Защита состоится "28" апреля 1986 г.
в "14" часов на заседании специализированного совета
К.068.18.17 в Киевском государственном университете имени
Т.Г.Шевченко (252601, Киев, Владимирская, 64, биологический
факультет), ауд. 235

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Киевского государственного университета.

Автореферат разослан "10" марта 1986 г.

Ученый секретарь
специализированного совета,
доктор биологических наук

Б.А.Пудзевич

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Аминопептидазы нервной ткани - это ферменты, осуществляющие наиболее быструю инактивацию мет- и лей-энкефалинов путем отщепления N-концевого тирозина / Knight et al. 1978/. Для этих опиоидов помимо известной их функции природных анальгетиков, предполагается участие в синаптической передаче в качестве нейромедиаторов или нейромодуляторов К.С.Раевский, 1982/. Результаты субклеточного фракционирования и иммуногистохимического анализа позволяют предположить вовлечение энкефалинов в процессы, регулирующие (модулирующие) передачу болевого восприятия /Костерлиц Хьюс, 1981 и Блум и сотр., 1981/. Для аминопептидаз нервной ткани предполагается участие в прерывании сигнала, передающегося с нейропептидом / Schwartz, 1983/.

В настоящее время из нервной ткани выделен и охарактеризован ряд ферментов аминопептидазного типа, которые осуществляют гидролиз короткоцепочечных опиоидов. В основном, это цитозольные ариламидазы, т.е. ферменты, гидролизующие нафтиламидные и пара-нитроанилидные производные аминокислот /Hersh et al., 1981; Trafficante et al., 1980; Wagner et al., 1981/. Мембраносвязанные аминопептидазы (К.Ф.3.4.II-) в связи с трудностью их выделения из нервной ткани, менее изучены. По мнению ряда авторов, именно мембранные ферменты могут осуществлять физиологическую инактивацию пептидного нейромедиатора или нейромодулятора / Schwartz, 1983/. В то же время в нервной ткани найден фермент, обладающий более высоким сродством к энкефалиновому субстрату (дипептидилкарбоксипептидаза). Этот фермент также может вовлекаться в физиологическую инактивацию нейромедиатора /Maifroy et al. 1979/.

Таким образом, физиологическая роль энкефалин-гидролизующей мембраносвязанной аминопептидазы нервной ткани остается невыясненной. Дальнейшие исследования физико-химических свойств этого фермента помогут выяснить структурные особенности энкефалин-гидролизующей аминопептидазы мозга. Изучение субстратной специфичности фермента будет способствовать практическому применению мембраносвязанной аминопептидазы.

Цель исследования. Очистка и изучение свойств энкефалин-гидролизующей аминопептидазы из мозга кошек и человека.

Задачи: 1. Определение регионального распределения мембраносвязанной аминопептидазы в нервной ткани. 2. Получение препарата энкефалин-гидролизующей мембраносвязанной аминопептидазы из мозга кошек



и человека. 3. Определение основных кинетических параметров изучаемого фермента. 4. Определение субстратной специфичности энкефалин-гидролизующей мембраносвязанной аминопептидазы по отношению к пептидным (мет-энкефалину) и белковым (глиальному фибриллярному кислом белку) субстратам. 5. Изучение физико-химических свойств энкефалин-гидролизующей мембраносвязанной аминопептидазы нервной ткани. 6. Выявление молекулярной гетерогенности исследуемого фермента.

Постановка задач обусловлена актуальностью изучаемой проблемы и комплексными исследованиями, проводимыми на кафедре биофизики и биохимии Днепропетровского госуниверситета по исследованию активных белков нервной ткани (тема "Исследование ферментов метаболизма белков центральной нервной системы при экстремальных состояниях", № гос.рег. 81067400).

Научная новизна. Впервые была выделена энкефалин-гидролизующая мембраносвязанная аминопептидаза из мозга кошки и человека. Было проведено исследование мембраносвязанной ариламидазной активности различных структур и отделов спинного мозга. Были получены кинетические характеристики по ингибированию очищенного препарата фермента пурамином, мет-энкефалином и продуктом гидролиза мет-энкефалина - тирозином. При изучении физико-химических свойств фермента с применением группоспецифических сорбентов была определена прочность гидрофобного взаимодействия очищенного препарата энкефалин-гидролизующей мембраносвязанной аминопептидазы с фенил-сефарозой, что позволяет говорить о наличии выраженных гидрофобных доменов в структуре изучаемого фермента. Впервые с помощью лектин-аффинной хроматографии для препаратов мембраносвязанной аминопептидазы мозга была выявлена гликопротеидная природа изучаемого фермента. Исследование субстратной специфичности показало, что мембраносвязанная аминопептидаза нервной ткани способна осуществлять гидролиз пара-нитроанилидного субстрата, но не оказывает влияния на белковый субстрат. Показана гетерогенность изучаемого фермента. Обнаружены молекулярные формы фермента, различающиеся по гидрофобным свойствам.

Теоретическое и практическое значение. Выявление молекулярной гетерогенности, гликопротеидной природы и особенностей субстратной специфичности мембраносвязанной аминопептидазы нервной ткани является вкладом в теоретическую нейробиологию и нейробиологию в плане расширения наших знаний о ферментах мозга, участвующих в регуляции уровня опиоидных пептидов. Очищенный препарат мембраносвязанной аминопептидазы, обладающей специфичностью в отношении гидролиза

пептидных субстратов (фермент отщепляет только N-концевую аминокислоту без последующей деградации образующего пептида), может быть использован при определении N-концевой аминокислоты в молекулах пептидов.

Апробация работы. Материалы диссертации доложены на IV Украинском биохимическом съезде (Днепропетровск, 1981), IX Всесоюзной конференции по биохимии нервной системы (Ереван, 1983), итоговой научной конференции Днепропетровского госуниверситета (Днепропетровск, 1984), на совместном заседании биохимического общества и проблемного Совета Днепропетровского госуниверситета по физико-химической биологии (Днепропетровск, 1985).

На защиту выносятся следующие положения.

1. Особенности регионального распределения мембраносвязанной аминопептидазы в функционально и морфологически различных отделах и структурах центральной нервной системы.

2. Способы очистки энкефалин-гидролизующей мембраносвязанной аминопептидазы из мозга кошек и человека.

3. Особенности структуры и физико-химические свойства энкефалин-гидролизующей аминопептидазы нервной ткани.

4. Специфичность действия энкефалин-гидролизующей мембраносвязанной аминопептидазы по отношению к пептидным (мет-энкефалину) и белковым (глиальному фибриллярному кислом белку) субстратам.

4. Молекулярная гетерогенность энкефалин-гидролизующей мембраносвязанной аминопептидазы нервной ткани.

Структура и объем работы. Диссертация состоит из 6 разделов: I-введение, II-обзор литературы по теме диссертации, III-материалы и методы исследования, IV-экспериментальная часть, V-заключение, VI-выводы. Работа изложена на 125 страницах машинописного текста, иллюстрирована 6 таблицами и 33 рисунками. Список литературы содержит 161 наименование на русском и иностранных языках.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектом исследования был мозг половозрелых кошек и человеческий мозг, что позволило изучить видовую специфичность фермента. Мозг человека был получен от жертв дорожных несчастных случаев, аутопсию материала производили через 8 часов после смерти.

В зависимости от целей эксперимента в работе использовались три основные методики приготовления тканевых экстрактов.

I. Для исследования регионального распределения мембраносвязанной аминопептидазы мозга гомогенаты в 0,25 M растворе сахарозы центрифугировали при 100 000 g в течение часа. В осадках определяли актив-

ность мембраносвязанной аминопептидазы. 2. При изучении физико-химических свойств фермента с использованием хроматографии на группоспецифических сорбентах для получения препарата растворимых (цитозольных) аминопептидаз гомогенат коры головного мозга (кошек или человека) в 25 мМ трис-HCl буфере центрифугировали при 30 000г в течение 40 минут. Полученный супернатант использовали в качестве исходного препарата "растворимых" аминопептидаз. 3. В качестве исходного препарата для выделения и очистки мембраносвязанной аминопептидазы использовался 1% тритоновый сольubilizat мембранной фракции мозга (рис.1). Фракция S₂ использовалась для очистки мембраносвязанной аминопептидазы последовательно хроматографией на ДЭАЭ-сефарозе CL-6B, биоцеле HTP, AN-сефарозе 4B, гель-фильтрацией через сефадекс G-200, а также служила исходным препаратом мембранных аминопептидаз при исследовании физико-химических свойств фермента с использованием хроматографии на группоспецифических сорбентах (конканявалин-А-сефарозе и фенил-сефарозе 4B). Гомогенность препаратов фермента на различных стадиях очистки определяли методом диск-электрофореза в полиакриламидном геле (Davis, 1964). Активность мембраносвязанной аминопептидазы определяли спектрофотометрически (методика Kuhl et al, 1979) и методом тонкослойной хроматографии (Шаршунова и соот., 1980). Ферментную активность выражали в микромолях пара-нитроанилина, освобожденного за 1 минуту инкубации при 37°C. Удельная активность фермента рассчитывалась на 1 мг белка. Белок в пробах определяли спектрофотометрически (Г.А.Кочетов, 1980), а также по Lowry et al, 1951 и Bradford et al, 1976. Препарат глиального фибриллярного кислого белка (GFAF), используемый для исследования субстратной специфичности фермента, получали по методике, описанной в работе Г.М.Шевченко и соавт. 1984 г. Для регистрации продуктов ферментативной деградации GFAF использовали метод иммуноэлектрофореза (Аксельсон и соавт. 1977) и электрофореза в градиенте плотности пагг в присутствии додецилсульфата натрия и β-меркаптоэтанола по Laemmli (1970). Статистическую обработку результатов проводили по методике В.А. Кокунина (1975).

Результаты исследований и их обсуждение.

Региональное распределение мембраносвязанной аминопептидазы в нервной ткани.

Для изучения локализации фермента в нервной ткани проводилось исследование регионального распределения аминопептидазной активности, связанной с мембранными структурами. Это позволило при выделении

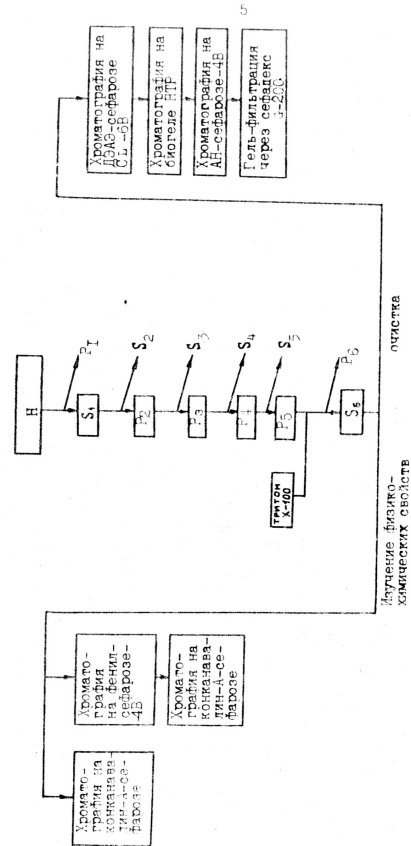


Рис.1. Схема получения препаратов и очистки мембраносвязанной аминопептидазы нервной ткани.
H - гомогенат, S - супернатант, P - осадок.

и очистке использовать отделы мозга с наибольшей активностью фермента. С другой стороны, можно было сделать предварительное заключение о возможной функциональной роли исследуемого фермента в нервной ткани. Полученные нами экспериментальные данные по региональному распределению мембраносвязанной аминопептидазы в головном мозге (рис.2) согласуются с более ранними исследованиями / Malfroy et al, 1973/ в которых была показана более высокая аминопептидазная активность в структурах, содержащих скопление нейронов (серое вещество головного мозга, мозжечок) по сравнению со структурами, содержащими проводящие пути нервных клеток (белое вещество головного мозга). Исследование ферментативной активности в отделах спинного мозга позволило нам выявить высокую мембраносвязанную активность в задних корешках, что косвенно указывает на специфическую функциональную роль мембраносвязанной аминопептидазы в проводящих путях сенсорных нейронов. Поскольку в головном мозге наибольшей активностью мембраносвязанной аминопептидазы обладает кора больших полушарий, то именно эту структуру мы и использовали в качестве объекта для выделения и очистки изучаемого фермента.

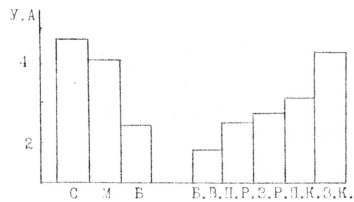


Рис.2. Активность мембраносвязанной аминопептидазы в функционально и морфологически различных отделах и структурах ЦНС кошек.

У.А. -удельная активность фермента мкмоль мин⁻¹ (мг белка)⁻¹

- С -серое вещество головного мозга
- М -мозжечок
- Б -белое вещество головного мозга
- Б.В. -белое вещество спинного мозга
- П.Р. -передние рога
- З.Р. -задние рога
- П.К. -передние корешки
- З.К. -задние корешки

Очистка препарата энкефалин-гидролизующей мембраносвязанной аминопептидазы из мозга кошки и человека.

Препарат фермента из мозга кошек очищался последовательной хроматографией на ДЭАЭ-сефарозе СЛ-6В, биогеле ИТР, АИ-сефарозе-4В и гель-фильтрацией через сефадекс G-200. Результаты очистки мембраносвязанной аминопептидазы мозга кошки представлены в таблице I. Используемые стадии очистки оказались наиболее эффективными; в случае применения хроматографии на группоспецифических сорбентах очистка ферментного препарата была незначительной. Начиная с первой стадии колоночной очистки, в элюирующий буфер добавлялись вещества, стабилизирующие аминопептидазную активность (0,2 М дитиотрейтол, 2 М ЭГТА). Возможно, это и обеспечило высокий выход фермента при очистке препарата на ДЭАЭ-сефарозе СЛ-6В. Помимо используемых ранее стадий очистки мембраносвязанной аминопептидазы на ДЭАЭ-сефарозе СЛ-6В и биогеле ИТР /Hui et al, 1963/, мы применили в качестве дополнительного этапа очистки хроматографию на АИ-сефарозе-4В. На этой стадии очистки получали практически очищенный препарат мембраносвязанной аминопептидазы мозга с характерной для нее специфичностью гидролиза мет-энкефалина (расщепление тир-гли связи в молекуле опиоида без последующей деградации образующегося тетрапептида). Хроматография на АИ-сефарозе-4В оказалась незаменимым этапом при выделении фермента из человеческого мозга, когда ферментативная активность после двух предыдущих стадий очистки была невелика, а гель-фильтрация через сефадекс G-200 могла привести к такому снижению общей активности, при котором регистрация аминопептидазной активности оказалась бы затруднительной. Поэтому гель-фильтрацию препарата мембраносвязанной аминопептидазы использовали только при очистке фермента из мозга кошек. По данным гель-фильтрации, молекулярная масса выделенного нами фермента из мозга кошек составляет 252 кД, что является близким к значению молекулярной массы, полученному Hui et al, 1963 для фермента из мозга крыс (250 кД). Следует отметить, что для мембраносвязанного фермента значение молекулярной массы может быть завышенным из-за влияния тритона X-100, применяемого для стабилизации фермента. В результате проведения всех стадий очистки для фермента из мозга кошек была достигнута очистка в 533 раза, для фермента из мозга человека в 101 раз по отношению к препарату исходного тритонного солилизата. Более низкая степень очистки ферментного препарата из человеческого мозга обусловлена невысокой активностью исходного препарата, полученного из аутолитического материала.

Таблица I
Система энкефалин-гидролизующей мембраносвязанной аминопептидазы из мозга кошки

№ п/п	Стапы описки	Урвм, мг	Содержание белка по Брэдфилду, мг/мл	Активность фермента во фракции М1, мкМ за 1 мин.	IC ₅₀ (мг белка) ⁻¹	Степень оидскти	Будод в %
1.	Трилоный соролучар	38	176	3,9	2288	I	100
2.	Норосонная хроматография ДКАС-сефароза-4В	40	6,3	0,139	2620	32	115
3.	Хроматография на мет-энкефалин	30	0,36	0,012	942	207	41
4.	Хроматография на мет-энкефалин-4В	15	0,12	0,006	443	284	19
5.	Гель-фильтрация через сефаракс G-200	3,5	0,014	0,004	97	583	4

1-14 - пара-нитроанилин

Определение основных кинетических характеристик энкефалин-гидролизующей мембраносвязанной аминопептидазы мозга кошек.

По основным кинетическим характеристикам выделенный нами фермент из мозга кошек близок к мембраносвязанной аминопептидазе фракции М1, полученной Bergsh в 1981 году из мозга крыс. Значение K_m гидролиза ала- β - нафтиламида фракцией М1 близко к величине K_m гидролиза аланил-пара-нитроанилида (рис.3), мембраносвязанной аминопептидазой кошек (0,25 мМ и 0,33 мМ соответственно). Оба фермента проявляют оптимум действия в нейтральной зоне значений pH (pH 7,0). Аминопептидазе фракции М1 по кинетическим характеристикам соответствует фермент, выделенный Hui et al, 1983 из мозга крыс (сходные значения K_m гидролиза арг- β нафтиламида, единый pH-оптимум действия). А так как три фермента обладают сходной специфичностью действия по энкефалиновому субстрату, то можно предположить, что во всех указанных случаях изучается один и тот же фермент. Нами также было показано ингибирование очищенного препарата мембраносвязанной аминопептидазы из мозга кошек пурамицином, мет-энкефалином и конечным продуктом гидролиза мет-энкефалина - тирозином (рис.3). Следует отметить, что величины IC_{50} , рассчитанные при ингибировании пурамицином фермента из мозга кошек и выделенного ранее фермента из мозга крыс / Hui et al, 1983/, имели тот же порядок действия ($6,5 \cdot 10^{-5}$ М и $1,6 \cdot 10^{-6}$ М соответственно).

Физико-химические свойства мембраносвязанной аминопептидазы нервной ткани.

Рассматривая физико-химические свойства мембраносвязанной аминопептидазы с использованием хроматографии с гидрофобным взаимодействием (фенил-сефароза-4В) можно заключить, что изучаемый фермент обладает выраженными гидрофобными свойствами (рис.4). Как видно из рис.4, ферменты цитозоля вообще не связываются с фенил-сефарозой, а часть аминопептидазной активности тритонового раствора снимается добавлением в элюирующий буфер 20 % этиленгликоля. В то же время исследуемый фермент прочно связывается с гидрофобным носителем: полная десорбция очищенного препарата мембраносвязанной аминопептидазы осуществляется только высокой концентрацией детергента. Вполне вероятно, что выраженная способность к гидрофобным взаимодействиям лежит в основе интеграции мембрано-

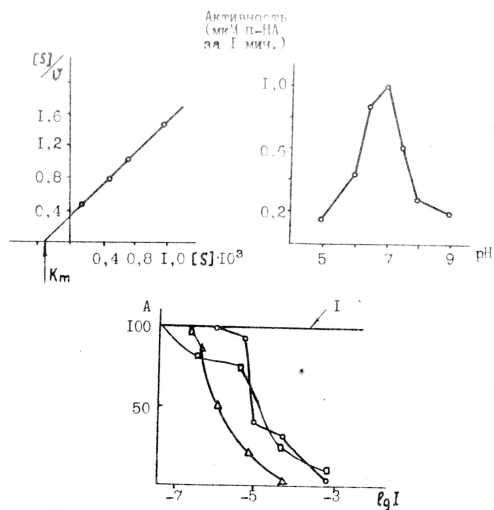


Рис. 3. Кинетические характеристики энкефалин-гидролизующей мембраносвязанной аминопептидазы мозга кошки.

- Зависимость скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата в координатах $[S]/v$ от $[S]$, где $[S]$ - концентрация субстрата в мМольх, v - скорость реакции в мМоль/мин, K_m - константа Михаэлиса.
- Определение pH оптимума действия фермента.
- Влияние различных концентраций ингибитора на активность фермента.
 A - активность фермента, в %
 I - логарифм концентрации ингибитора
 I - активность фермента без ингибитора
 \square - ингибирование мет-энкефалином; \circ - ингибирование пурамином, Δ - ингибирование тирозином.

II

связанной аминопептидазы в составе мембранных структур клеток мозга.

При проведении лектин-аффинной хроматографии (рис. 4 г-е) было обнаружено, что аминопептидазы цитозоля не сорбируются на конканавалин-А-сефарозе и, следовательно не являются гликопротеинами (рис. 4г). При хроматографии грубого препарата мембран (1% тритоновый солюбилизат) наблюдается частичная сорбция аминопептидазной активности (рис. 4д). Если ферментный препарат тритонового солюбилизата подвергнуть предварительной очистке на колонке с фенилсефарозой, то в этом случае препарат мембраносвязанных аминопепти-

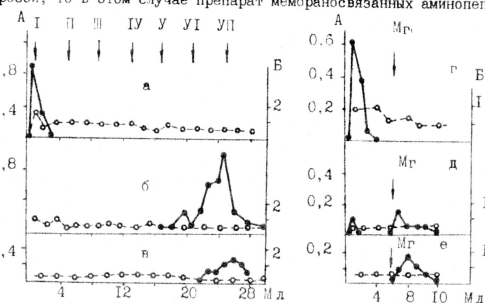


Рис. 4. Хроматография препаратов аминопептидазы на группоспецифических сорбентах.

- Хроматография препарата цитозольных аминопептидаз на фенилсефарозе-4В.
- Хроматография препарата мембранных аминопептидаз на фенилсефарозе-4В.
- Хроматография очищенного препарата мембранной аминопептидазы на фенилсефарозе-4В.
 По оси абсцисс - объем фракций, в мл; по оси ординат справа - концентрация белка в пробах мг/мл, слева - активность фермента в мМольх пара-нитроанилина, освобожденного за 1 мин. инкубации. Стрелками показана элюция: I, II и III - 0,6; 0,4 и 0,1 М сульфатом аммония; IV - 0,1 М фосфатный буфер, pH 7,4; V - 20% этиленгликолем; VI - 50% этиленгликолем; VII - 2% тритоном X-100.
- Хроматография препарата цитозольных аминопептидаз на конканавалин - А - сефарозе.
- Хроматография препарата мембранных аминопептидаз на конканавалин - А - сефарозе.
- Хроматография на конканавалин - А - сефарозе мембранных аминопептидаз, предварительно очищенных на фенилсефарозе-4В.
 M_r - элюция буфером, содержащим 10% α -D-метилглюкозид.

даз полностью сорбируется на колонке (рис. 4а). Возможно, при хроматографии на фенил-сефарозе часть гликопротеинов исходного препарата мембран элюируется в несвязавшейся фракции, что обеспечивает полное связывание фенил-сефарозной фракции, содержащей аминопептидазную активность, на конканавалин-А-сефарозе. Сорбция препарата мембраносвязанных аминопептидаз на колонке с конканавалин-А-сефарозой позволяет предложить гликопротеидную структуру этих ферментов. Значительная инактивация ферментных препаратов в процессе лектин-аффинной хроматографии, а также высокое содержание ЭГТА в препарате очищенного фермента не дают возможности использовать этот тип хроматографии для проверки гликопротеидной природы очищенного препарата мембраносвязанной аминопептидазы.

Специфичность действия энкефалин-гидролизующей мембраносвязанной аминопептидазы по отношению к пептидным и белковым субстратам.

В настоящей работе мы подтвердили специфичность гидролиза мет-энкефалина очищенным препаратом энкефалин-гидролизующей мембраносвязанной аминопептидазы нервной ткани. Реципрокный механизм изменения концентраций мет-энкефалина и тирозина в процессе ферментативного гидролиза (рис. 5) возможен при условии, если гидролиз пептидной связи в молекуле энкефалина происходит только между аминокислотными остатками тирозина и глицина. При изучении субстратной специфичности мембраносвязанной аминопептидазы нервной ткани была предпринята попытка проверить действие изучаемого фермента на белковый субстрат. Используемый нами в качестве белкового субстрата кислый глиальный фибриллярный белок (GFAP) является основной структурой промежуточных компонентов астроглиальных клеток. GFAP относят к неспецифическим белкам мозга. Проведенные нами исследования показали отсутствие каких-либо признаков ферментативной деградации GFAP при инкубации его с очищенным препаратом мембраносвязанной аминопептидазы мозга человека. По-видимому, энкефалин-гидролизующая мембраносвязанная аминопептидаза нервной ткани имеет ограниченную специфичность, при которой длина полипептидной цепи субстрата является одним из лимитирующих факторов.

Выявление молекулярной гетерогенности исследуемого фермента.

О том, что среди энкефалин-гидролизующих аминопептидаз мозга

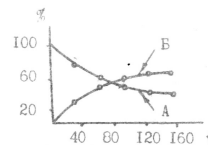


Рис. 5. Реципрокный механизм изменения концентраций мет-энкефалина (А) и тирозина (Б) в процессе ферментативного гидролиза.

t — время гидролиза, в мин.

имеются ферменты со сходной специфичностью действия, отмечалось еще в работе Negah, 1961. Тогда предполагаемые формы фермента МI и МII в достаточной степени очищены не были. В настоящее время получен высокоочищенный препарат мембраносвязанной аминопептидазы из мозга крыс /Hui et al., 1963/, соответствующий фракции МI и препарат мембранной аминопептидазы из мозга обезьян /Shimashige et al., 1963/, соответствующий фракции МII. Выделенные ферменты обладали сходной специфичностью действия по отношению к мет-энкефалину, имели одинаковый рН оптимума действия. Однако, различие кинетических параметров и молекулярных свойств указывает на то, что авторами работ были исследованы различные формы фермента. В своей работе мы проверили гетерогенность энкефалин-гидролизующей аминопептидазы при помощи хроматографии на микроколонке с ДЭАЭ-сефарозой СI-СВ и тонкослойной хроматографии. Как видно из рис. 6, фракции, полученные в результате хроматографии (несвязавшаяся, фракция I и фракция II) различаются по характерным признакам. Фракция "H", элюируемая в свободном объеме колонки, содержала целый набор энкефалин-гидролизующих ферментов. Фракция I, элюируемая с ДЭАЭ-сефарозной колонки повышением ионной силы рабочего буфера, содержала аминопептидазную и дипептидиламинопептидазную активность. Неожиданным явилось обнаружение фракции II, элюируемой с колонки добавлением в рабочий буфер высокой концентрации детергента. Фракция II также содержала аминопептидазную и дипептидиламинопептидазную активности. На основании полученных данных можно заключить, что имеются различные формы изучаемого фер-

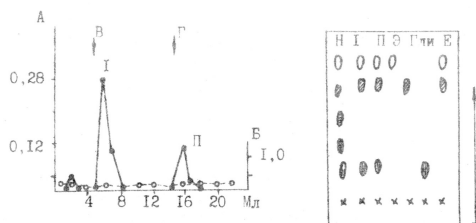


Рис.6. Выявление молекулярной гетерогенности энкефалин-гидролизующей аминопептидазы нервной ткани.

- а. Хроматография препарата фермента на ДЭАЭ-сефарозе CL-6В, где А - активность фермента в мкМолях пара-нитроанилина, освобожденного за 1 мин. инкубации
 Б - белок во фракциях, мг/мл
 В - начало элюции буфером, содержащим 0,3 М NaCl.
 Г - начало элюции буфером, содержащим 0,3 М NaCl + 2 % тритон X-100.
- По оси абсцисс - объем фракций, в мл.
 Сплошной линией обозначена активность фермента, пунктиром - белок.
- б. Тонкослойная хроматография полученных фракций после инкубации с мет-энкефалином.
 И - несвязавшаяся,
 I - фракция I,
 II - фракция II,
 Э - мет-энкефалин,
 Т - тирозин,
 Гли - глицин,
 Е - очищенный препарат мембраносвязанной аминопептидазы.
 Стрелкой обозначено движение фронта растворителя.

мента, различающиеся по своим гидрофобным свойствам. Фракция I является по существу несчищенным препаратом изучаемого нами фермента; мембранная энкефалин-гидролизующая аминопептидаза фракции II еще нуждается в дальнейшем изучении.

ВЫВОДЫ

1. Среди отделов центральной нервной системы кошки наибольшей активностью мембраносвязанной аминопептидазы обладают серое вещество головного мозга и задние корешки спинного мозга.
2. Препарат энкефалин-гидролизующей мембраносвязанной аминопептидазы из мозга кошки очищен в 533 раза, из мозга человека - в 101 раз по отношению к исходному тритоновому солюбилизату.
3. Очищенные препараты энкефалин-гидролизующей мембраносвязанной аминопептидазы из мозга кошки и человека обладают сходной специфичностью действия по отношению к мет-энкефалину.
4. Препарат энкефалин-гидролизующей мембраносвязанной аминопептидазы мозга кошки в значительной степени ингибируется дуromидином ($K_I = 2,6 \cdot 10^{-6}$), мет-энкефалином ($K_I = 8 \cdot 10^{-6}$) и конечным продуктом гидролиза энкефалина-тирозином ($K_I = 0,4 \cdot 10^{-6}$).
5. Очищенный препарат энкефалин-гидролизующей мембраносвязанной аминопептидазы мозга кошки имеет выраженные гидрофобные домены на своей поверхности.
6. Мембраносвязанная аминопептидаза нервной ткани связывается с конканавалин-А-сефарозой и является гликопротеидом.
7. При действии мембраносвязанной аминопептидазы мозга кошки на мет-энкефалиновый субстрат наблюдается реципрокный механизм изменения концентраций тирозина и мет-энкефалина.
8. Энкефалин-гидролизующая мембраносвязанная аминопептидаза нервной ткани имеет несколько молекулярных форм, различающихся по гидрофобным свойствам.

СПИСОК НАУЧНЫХ РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ
ДИССЕРТАЦИИ

1. Мембранов'язана форма аланінамінопептидази нервової тканини нормальних та опромінених тварин. - В кн.: IV Український біохімічний з'їзд. Тезиси научних повідомлень. Київ, 1982, т. I, с. 216 (в соавт. с Т.М.Генгиным, А.Д.Ревой).
2. Выделение из мозга и очистка мембраносвязанной аминопептидазы, гидролизующей энкефалины. - Докл. АН УССР, 1985, №1, с. 65-68 (в соавт. с М.Т.Генгиным, А.Д.Ревой, С.И.Шрамом).
3. Аминопептидазы головного мозга и их роль в обмене пептидов. - В кн.: IX Всесоюзная конференция по биохимии нервной системы. Тезисы научных сообщений. Ереван, 1983, с. 81-82 (в соавт. с М.Т.Генгиным, А.Д.Ревой, В.И.Мелешко).
4. Характеристика некоторых белков нервной ткани с применением группоспецифических сорбентов. - Укр. биохим. журн. 1985, т. 57 №6, с. 9-13 (в соавт. с А.Д.Ревой, В.А.Березиным).
5. О гетерогенности энкефалин - гидролизующей мембраносвязанной аминопептидазы мозга человека. - ж. Нейрохимия, 1986, т. 5, № 1, с. 29-36.



Автореферат...
 Подписано к печати 25.12.85г. Формат 60x84/16. БТ 70360
 Бумага писчая. Печать плоская. Усл. печ. л. 1,0. Тираж 100.
 Заказ № 14386. Бесплатно. Городская типография № 3, Днепропетровского областного управления по делам издательства, полиграфии и книжной торговли, 490000 г. Днепропетровск ул. Серова, 7.