

IZOLACE ENDOPEPTIDÁZY KARTÁČOVÉHO LEMU ENTEROCYTU U KRYSY

P. KOCNA, P. FRIČ, J. SLABÝ, E. KASAFÍREK

II. Vědecké oddělení gastroenterologické fakulty všeobecného lékařství University Karlovy, Praha, vedoucí doc. MUDr. P. Frič, CSc.

Interní oddělení fakultní polikliniky ÚNZ ÚNV, Praha, vedoucí doc. MUDr. P. Frič, CSc.

Výzkumný ústav pro farmacii a biochemii, Praha, ředitel Ing. dr. O. Němeček, DrSc.

Souhrn

Kartáčový lem krysích enterocytů jsme izolovali diferenciální centrifugací s použitím chloridu vápenatého podle Schmitze [22]. Tento materiál byl solubilizován papainem, trypsinem a Tritonem X-100 (1%), který uvolnil do supernatantu největší množství membránových enzymů. Tritonizovaný supernatant (105 000 xg) jsme trávili papainem, bromelinem, ficinem a trypsinem (jednotlivě a v kombinacích). Po simultánním působení papainu a bromelinu jsme dosáhli chromatografií na Sephadexu G-200 částečné oddělení aminopeptidázy [substrát: AlaNAp] od endopeptidázové aktivity [substrát: SucAla3NAp]. Obě aktivity byly zřetelně odděleny izoelektrickou fokuzací (pI aminopeptidázy — 4,73; pI endopeptidázy — 5,23). Endopeptidáza krysího enterocytu zatím nebyla přesněji popsána ani lokalizována.

Выводы

Кочна П., Фрич П., Слабый И., Касафирек Э.: Выделение эндопептидазы щеточной каемки энтероцитов у крысы

Щеточная каемка энтероцитов у крысы была изолирована при помощи дифференциального центрифугирования с применением хлористого кальция по Шмитце [22]. Этот материал солиubilizировали папайном, трипсином и тритоном X-100 (1%), который выделял в супернатант наибольшее количество мембранных ферментов. Тригонизированный супернатант (105.000 xg) натравливали папайном, бромелином, фицином и трипсином (по отдельности и в комбинациях). После симультанного действия папайна и бромелина авторы путем хроматографии на сефадексе G-200 добились частичного отделения аминопептидазы (субстрат: АлаНАп) от эндопептидазной активности (субстрат: СукАла3НАп). Обе активности были отчетливо отделены при помощи изоэлектрической фокусировки (pI аминопептидазы —4,73; pI эндопептидазы —5,23). Эндопептидаза энтероцита крысы до настоящего времени не была точно ни выявлена, ни локализована. Ф.

Čas. Lék. čes., 117, 1978, No. 40, s. 1258—1261.

Summary

Kocna P., Frič P., Slabý J., Kasafírek E.: Endopeptidase Isolation in Rat Enterocyte Brush Border

Rat enterocyte brush border was isolate by differential centrifugation using calcium chloride according to Schmitz [22]. The material was then solubilized with papaine, trypsin and Triton X-100 (1%) which released a maximum of membrane enzymes in the supernatant. Tritonized supernatant (105.000 xg) was treated with papaine, bromelin, ficin and trypsin (individually and in combinations). Following the simultaneous action of papaine and bromeline, Sephadex G-200 chromatography helped to achieve the partial separation of aminopeptidase [substrate: AlaNAp] from endopeptidase activity [substrate: SucAla3NAp]. Both activities were visibly separated from one another by means of isoelectric

focusation [pI aminopeptidase — 4,73; pI endopaptidase — 5,23]. Rat enterocyte endopeptidase has so far failed to be either described in detail or localized. Há

Čas. Lék. čes., 117, 1978, No. 40, p. 1258—1261.

Résumé

Kocna P., Frič P., Slabý J., Kasafírek E.: Isolation de l'endopeptidase du bord à brosse de l'entérocyte du rat

Le bord à brosse des entérocytes du rat étaient isolé par la centrifugation différentielle à l'emploi du chlorure du calcium selon Schmitz. Ce matériel était solubilisé par la papaine, par la trypsin et par Triton X-100 (1%) qui libérait, dans le surnatant, la quantité maximale d'enzymes de la membrane. Le surnatant tritonisé (105.000 xg) était digéré par la papaine, par la broméline, par la ficine et par la trypsin (séparément et en combinaisons). Après l'effet simultané de la papaine et de la broméline nous avons atteint, par la chromatographie sur Sephadex G-200, la séparation partielle de l'aminopeptidase (substrat: AlaNAp) de l'activité endopeptidase (substrat: SucAla3NAp). Les deux activités étaient nettement séparées par la focusation isoélectrique (pI de l'aminopeptidase — 4,73; pI de l'endopeptidase — 5,23). L'endopeptidase de l'entérocyte du rat n'était pas encore décrite ou localisée exactement. Iv.

Čas. Lék. čes., 117, 1978, No. 40, p. 1258—1261.

Úvod

Žiháný lem enterocytu obsahuje řadu peptidázových aktivit, které se účastní terminální fáze trávení proteinů. V krysím enterocytu jsou přítomny různé dipeptidázy [12], oligopeptidázy [24], amino-oligopeptidázy [5] a několik dalších typů aminopeptidáz [21].

Prokázali jsme endopeptidázovou aktivitu v lidském enterocytu [23] a bez bližší lokalizace v tenkém střevu krysy [13]. Endopeptidázová aktivita štěpí syntetický substrát 3-karboxypropionyl-trialanin-4-nitroanilid (SucAla3NAp), který byl dříve popsán jako vhodný substrát pro pankreatickou elastázu [3, 4, 8, 9]. Tato práce se zabývá oddělením endopeptidázy od aminopeptidázy (EC 3.4.11.2.). Obě tyto aktivity spolu významně korelují v duodenu, jejunu i ileu [13] a dosud se předpokládala existence společné nosné bílkoviny [23].

Materiál a metody

Slizniční stěr jsme získali z jejunu krysích samců Wistar (320—350 g). Zvířata jsme po 24hodinovém hladovění usmrtili dekapitací a vypreparovali jsme tenké střevo. Po jeho rozstřížení a opláchnutí ve vychlazeném

fyzilogickém roztoku jsme získali stěr lehkým tlakem tupé hrany skalpelu na sliznici.

Izolace kartáčového lemu

Pro izolaci kartáčového lemu jsme modifikovali Schmitzovu metodu diferenciální centrifugace s chloridem vápenatým [22]. 1% homogenát v 50mmol manitolu-2 mmol Trisu jsme získali na mixéru (Unipan 309, PLR) homogenizací 2 X 30 sekund při plném napětí za chlazení směsí voda – led. Podle Andria [1] jsme zvýšili koncentraci pevného CaCl₂ na 20 mmol a konečnou centrifugaci na 60 minut (MSE Superspeed 65).

Solubilizace kartáčového lemu

Výslednou peletu P₂ (20 000 xg), která obsahuje kartáčový lem, jsme solubilizovali pomocí papainu (Merck, 0,4 mg/ml), trypsinu (Boehringer, 0,44 mg/ml) a Tritonu X-100 (1%) stejně jako u lidského materiálu [23]. Po solubilizaci jsme materiál centrifugovali (105 000 xg) 60 minut při 4 °C (MSE Superspeed 65).

Proteolytické štěpení

Tritonizovaný supernatant jsme inkubovali 60 minut při 37 °C ve 0,075 mol fosfátovém tlumiči pH 6,8 v přítomnosti papainu (Merck, 0,4 mg/ml), bromelinu (Merck, 0,15 %), ficinu (Koch-Light, 0,1 %) nebo trypsinu (Boehringer, 0,44 mg/ml), a to jak samostatně, tak v kombi-

Tab. 1. Aktivity membránových enzymů (mU/mg bílkoviny) v různých fázích izolace kartáčového lemu enterocyty u krysy

mU/mg bílkoviny	H ₁ (1%)	S ₁ (2000 xg)	P ₂ (20 000 xg)
Endopeptidáza	15,1	31,5	69,5
Amino-peptidáza	112	192	499
Alkalická fosfatáza	679	543	1875
Sacharáza	0,36	0,66	1,65

macích. Vzorky jsme po proteolýze centrifugovali při 20 000 xg 30 minut (4 °C, Janetzki K24). Při trávení papainem, bromelinem nebo ficinem byl do inkubačního média přidán jako aktivátor cysteinhydrochlorid (0,2 mg/ml).

Gelová filtrace

Supernatant (20 000 xg) po proteolytickém štěpení byl nanesen na kolonu K 16/100 (Pharmacia) Sephadexu G-200. Dělení probíhalo při 4 °C a při průtoku 10 ml/hod. Průtok byl řízen peristaltickou pumpou (LKB Varioperpex 12 000). 5 ml frakce byly po průchodu UV jednotkou (UV-Analyser, Vývojové dílny ČSAV) sbírány do kolektoru.

Izoelektrická fokuzace

Proteiny jsme rozdělili na koloně LKB 8101 (110 ml) v sacharózovém gradientu 0–84 %, v přítomnosti 1 % amfolytu pH 4–6 (LKB, l. c. 6). Dělení na koloně probíhalo 14 hodin při zátěži 2–3 W za chlazení vodou (počáteční napětí 500 V, proud 5 mA; konečné napětí 1200 V, proud 2,5 mA). Třicetikapkové frakce byly po průchodu UV jednotkou (Uvicord II, LKB) sbírány do kolektoru Ultrorac 7000 (LKB). pH jednotlivých frakcí jsme měřili na pH-metru PHM 62 (Radiometer).

Enzymatické aktivity

Alkalickou fosfatázu (EC 3.1.3.1.) jsme stanovili setem Lachema (substrát: 10 mmol 4-nitrofenylfosfát) metodou

Tab. 2. Enzymatické aktivity kartáčového lemu (v % celkové aktivity) po solubilizaci papainem, trypsinem a Tritonem X-100 v supernatantu (sup., 105 000 xg) a sedimentu (sed.)

% aktivity	Papain		Trypsin		Triton	
	sup.	sed.	sup.	sed.	sup.	sed.
Endopeptidáza	47	53	11	89	89	11
Amino-peptidáza	81	19	35	65	82	18
Alkalická fosfatáza	89	11	35	65	78	22

Besseye-Lowryho [2]. V izolovaném kartáčovém lemu jsme prokázali alkalickou fosfatázu simultánní azokopulací: 1 ml resuspendované pelety P₂ a 1 ml barvicího média (0,22 mg beta-naftylfosfátu a 0,5 mg Fast Blue BB v 0,08 mol borátovém tlumiči pH 9,0) jsme inkubovali 30 minut při 25 °C.

Sacharázovou aktivitu (EC 3.2.1.29.) jsme stanovili Dahlqvistovou metodou v modifikaci podle Mališe (substrát: 56 mmol sacharóza, l.c.16).

Amino-peptidázu (EC 3.4.11.2.) jsme stanovili chromogenní metodou štěpením Ala-NAP (2,5 mmol, l.c.13).

Endopeptidázu jsme stanovili štěpením SucAla3NAP nepřímo chromogenní metodou [13] nebo po oddělení amino-peptidázy přímou metodou. Jejím principem je vytřepání tydrofóbního AlaNAP do octanu etylnatého a stanovení koncentrace NAP po alkalické hydrolyze tydrofóbní fáze. Enzymová frakce (0,2 ml) se inkubuje 90 minut s 2,5 mmol SucAla3NAP (rozpuštěno: dimetylsulfoxid) v 0,1 mol Tris-HCl tlumiči (pH 8,0) při 37 °C. Po inkubaci se vytřepe 1,0 ml vzorku do 1,0 ml octanu etylnatého, 0,5 ml horní tydrofóbní fáze se pomalu vmíchá do 2,0 ml 5 N NaOH v 50 % etanolu a koncentrace uvolněného NAP se stanoví fotometricky (405 nm, Unicam SP-800).

$$\text{Aktivita endopeptidázy} = E_{405} \cdot \frac{F_1 \cdot F_2 \cdot V \cdot 1000}{e_{405} \cdot t \cdot d \cdot v} \text{ (mU/ml)}$$

F₁... 1,18 — faktor extrakce (F₁ = $\frac{D+1}{D}$; D je 5,49)

D... rozdělovací koeficient

F₂... 5 — zředovací faktor (0,5 ml tydrofóbní frakce na 2,5 ml po přidání NaOH)

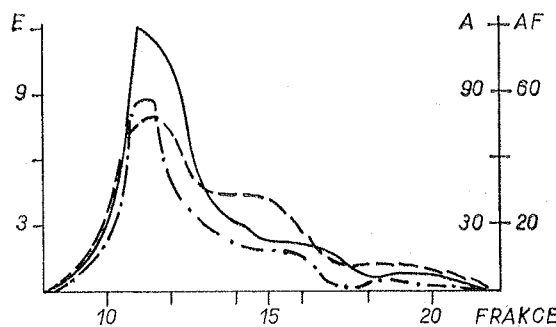
V... 1,5 — objem inkubačního média (ml)

v... 0,2 — objem enzymové frakce (ml)

t... 90 — inkubace (min)

d... 1 — šířka květy (cm)

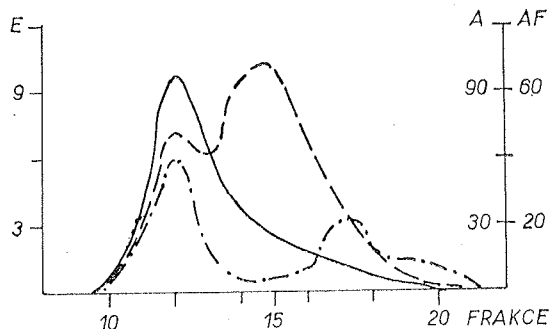
e₄₀₅... 9,35 — molární extinkční koeficient NAP X 10⁻³



Graf 1. Sephadex G-200: rozložení aktivit (mU/ml) endopeptidázy (E —————), amino-peptidázy (A ———) a alkalické fosfatázy (AF —.—) v tritonizovaném supernatantu žíhaného lemu

Bílkovinu jsme stanovili podle Lowryho (14) nebo při vypouštění kolony kontinuálně při 280 nm (Uvicord, LKB).

Štěpy jsme chromatograficky detekovali TLC metodou na Silufolu. Dělicí směs: BuOH/AcOH/H₂O v poměru 4:1:1, detekce po redukci SnCl₂ Ehrlichovým reagens (9).



Graf 2. Sephadex G-200: částečné oddělení aktivit (mU/ml) endopeptidázy, aminopeptidázy a alkalické fosfatázy po trávení tritonizovaného supernatantu papainem; symboly jako v grafu 1

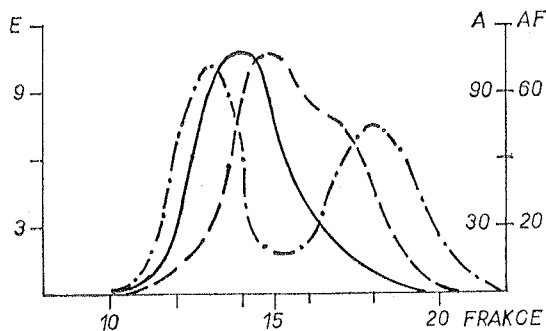
V ý s l e d k y

Přítomnost kartáčového lemu v peletě P₂ jsme ověřili histochemickou reakcí na alkalickou fosfatázu. Izolační postup je zachycen v tabulce 1, kde jsou uvedeny koncentrace sledovaných membránových enzymů v jednotlivých fázích izolace. Aktivita endopeptidázy vzrostla více než 4krát.

Solubilizace kartáčového lemu a proteolýza

Nejvyšší koncentrace membránových enzymů v supernatantu byly zjištěny po použití Tritonu X-100 (78–89 %, tab. 2). Při gelové filtraci na Sephadexu G-200 byly alkalická fosfatáza, aminopeptidáza a endopeptidáza přítomny společně v jedné frakci (graf 1). Je proto pravděpodobné, že fragmenty membrány získané tímto solubilizačním postupem jsou poměrně velké.

Nejlepší výsledek při trávení tritonizovaného supernatantu jednotlivými enzymy přineslo použití papainu, který odděluje část aktivity alkalické fosfatázy a aminopeptidázy (graf 2). Protože se neoddělila aminopeptidáza od endopeptidázy, působili jsme na tritonizovaný supernatant současně papainem a bromelinem. Při chromatografii na Sephadexu G-200 se obě aktivity oddělily (graf 3). Endopeptidáza ve frakcích 11 a 12 byla prokázána nepřímou



Graf 3. Sephadex G-200: distribuce aktivit (mU/ml) endopeptidázy, aminopeptidázy a alkalické fosfatázy po simultánní proteolýze tritonizovaného supernatantu papainem a bromelinem; symboly jako v grafu 1

metodou po přidání izolované aminopeptidázy z frakce 17.

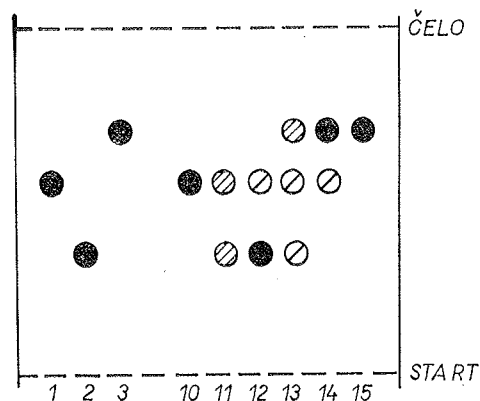
Detekci na Silufolu (graf 4) jsme prokázali ve frakcích 11 a 12 pouze endopeptidázu (odštěpený AlaNAP). Aminopeptidáza přítomná ve frakcích 13 a dalších je prezentována skvrnami NAP po rozštěpení AlaNAP.

Izoelektrická fokuzace

Na kolonu jsme nasadili 5 ml supernatantu po simultánní proteolýze papainem a bromelinem. Aminopeptidázu jsme našli ve frakcích 35–45 (graf 5) a endopeptidázu po přidání aminopeptidázy ve frakcích 55–65. Obě aktivity jsme prokázali detekcí na Silufolu a endopeptidázu jsme stanovili také námi vypracovanou metodou.

D i s k u s e

Pro izolaci subcelulárních komponent jsou popsány různé metody. Nejnovější z nich založená na zonální centrifugaci v hustotním gradientu není však pro krysí materiál vhodná (19). Použili jsme proto Schmitzovu metodu (22), která je popsána pro lidský materiál, ale byla již použita i pro izolace kar-



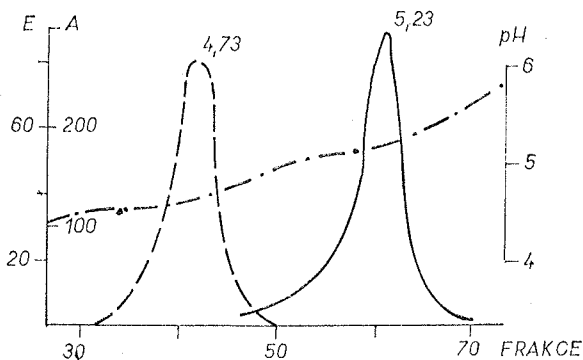
Graf 4. Detekce štěpů SucAlaNap na Silufolu. Intenzita zbarvení: ○, ●, ●. 1–2,5 mmol SucAlaNap (R_f = 0,55), 2–2,5 mmol AlaNAP (R_f = 0,35), 3–2,5 mmol NAP (R_f = 0,70). Vzorky 10–15 odpovídají frakcím získaným chromatografií tritonizovaného supernatantu po simultánní proteolýze papainem a bromelinem na Sephadexu 6–200

táčového lemu krysích enterocytů (18, 20). V naší práci jsme použili modifikaci podle Andria (1). Schmitzova metoda je založená na specifické vazbě Ca²⁺ na membrány (7). Při první centrifugaci 2000 xg sedimentují mitochondrie a bazolaterální membrány a při centrifugaci 20 000 xg sedimentují agregované membrány kartáčových lemů.

Trypsin a papain uvolňují ve srovnání s Tritonem X-100 jen malé množství endopeptidázy z žíhaného lemu enterocytů. Rovněž Marshall (17) při studiu různých solubilizačních metod pro membránové enzymy uvádí Triton X-100 jako nejúčinnější. Při další preparaci tritonizovaného supernatantu jsme dosáhli částečného oddělení aminopeptidázové a endopeptidázové aktivity až při současném působení papainu a bromelinu. Účinek této kombinace byl lepší než při trávení supernatantu samotným papainem, který sám o sobě se považuje za účinnější než ostatní proteázy (15, 23). Tyto výsledky dovolují předpoklá-

dat, že endopeptidázová aktivita je poměrně pevně zabudována do struktury žíhaného lemu.

Endopeptidáza, kterou jsme v papain-bromelinovém lyzátu zřetelně oddělili od aminopeptidázy izoelektrickou fokuzací, nebyla dosud v krysím enterocytu podrobněji popsána ani lokalizována. Zatím by-



Graf 5. Isoelektrická fokuzace v rozsahu pH 4–6; tritonizovaný supernatant po současné proteolýze papainem a bromelinem; aminopeptidáza (A-----) je od endopeptidázy (E-----) zřetelně oddělena

la tato aktivita uvedena v slizničním stěru u křesy (13) a v kartáčovém lemu lidského enterocyty (23). Neutrální endopeptidáza, jejíž příbuznost nebyla zatím objasněna, byla zjištěna v kartáčovém lemu ledvinných tubulů králíka (10, 11).

Literatura

1. Andria, G., Marzi, A., Auricchio, S.: α -glutamyl- β -naphthylamide hydrolase of rabbit small intestine. Localization in the brush border and separation from other brush border peptidases. *Biochim. biophys. Acta*, (Amst.), 419, 1976, s. 42–50. — 2. Bessey, O. A., Lowry, O. H., Brock, M. J.: A method for the rapid demonstration of alkaline phosphatase with five cubic millimeters of serum. *J. biol. Chem.*, 164, 1946, s. 321–329. — 3. Frič, P., Slabý, J., Kasafírek, E., Mališ, F.: Die elastolytische Aktivität des menschlichen Duodenalinhalts. *Dtsch. Z. Verdau. u. Stoffwechselkr.*, 36, 1976, s. 239–244. — 4. Frič, P., Slabý, J., Kasafírek, E., Mališ, F.: Elastolytic activity of human duodenal contents. *Clin. chim. acta*, 63, 1975, s. 309–316. — 5. Gray, G. M., Santiago, N. A.: Intestinal surface amino-oligopeptidases. I. Isolation of two weight isomers and their subunits from rat brush border. *J. biol. Chem.*, 252, 1977, s. 4922–4928. — 6. Haglund, H.: Isoelectric focusing in natural pH gradients. A technique of growing importance for fractionation and characterization of proteins. *Sci. Tools* (LKB Instrum. J.), 14, 1967, s. 17–23. — 7. Kamath, S. A., Kummeron, F. A., Narayan, K. A.: A simple procedure for the isolation of rat liver

8. Kasafírek, E., Frič, P., Mališ, F.: The significance of the N-acyl residue of L-alanyl-L-alanyl-L-alanine-p-nitroanilide for cleavage by pancreatic elastase. *FEBS Lett.*, 40, 1974, s. 353–356. — 9. Kasafírek, E., Frič, P., Slabý, J., Mališ, F.: p-Nitroanilides of 3-carboxypropionyl peptides. Their cleavage by elastase, trypsin and chymotrypsin. *Eur. J. Biochem.*, 69, 1976, s. 1–13. — 10. Kerr, M. A., Kenny, A. J.: The purification and specificity of a neutral endopeptidase from rabbit kidney brush border. *Biochem. J.*, 137, 1974, s. 477–488. — 11. Kerr, M. A., Kenny, A. J.: The molecular weight and properties of a neutral metallo-endopeptidase from rabbit kidney brush border. *Biochem. J.*, 137, 1974, s. 489–495. — 12. Kim, Y. S., Brophy, E. J.: Rat intestinal brush border membrane peptidases. I. Solubilization, purification and physico-chemical properties of two different forms of the enzyme. *J. biol. Chem.*, 251, 1975, s. 3199–3205. — 13. Kocna, P.: Endopeptidázová aktivita krysího tenkého stěva. *Práce I/7 XX. Fakult. stud. věd. konf. FVL UK, Praha 1977.* — 14. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J.: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. biol. Chem.*, 193, 1951, s. 265–275. — 15. Maestracci, D.: Enzymic solubilization of the human intestinal brush border membrane enzymes. *Biochim. biophys. acta*, 433, 1976, s. 469 až 481. — 16. Mališ, F.: Přímé stanovení disacharidázové aktivity v homogenátech sliznice tenkého stěva. *Sborn. lék.*, 70, 1968, s. 321–329. — 17. Marshall, J. J., Sturgeon, C. M., Whelan, W. J.: Solubilization of porcine intestinal α -glucosidases and evidence for the separate identities of isomaltase and limit dextrinase. *Analyt. Biochem.*, 82, 1977, s. 435–444. — 18. Mazzacca, G., Musella, A., Andria, G., Agostino, L. G., Cimino, L., Budillon, G.: Brush border peptidase and arylamidases in the experimental blind loop syndrome of the rat. *Acta hepato-gastroenterol.*, 24, 1977, s. 364–367. — 19. Peters, T. J.: Analytical subcellular fractionation of jejunal biopsy specimens: methodology and characterization of the organelles in normal tissues. *Clin. Sci. Mol. Med.*, 51, 1976, s. 557–574. — 20. Seetharam, B., Yeh, Kwo-Yih, Moog, F., Alpers, D. H.: Development of intestinal brush border membrane proteins in the rat. *Biochim. biophys. acta*, 470, 1977, s. 424 až 436. — 21. Shoaf, C. R., Berko, M., Heizer, W.: Isolation and characterization of four peptide hydrolases from the brush border of rat intestinal mucosa. *Biochim. biophys. acta*, 445, 1976, s. 694–719. — 22. Schmitz, J., Preiser, H., Maestracci, D., Ghosh, B. K., Cerda, J. J., Crane, R. K.: Purification of the human intestinal brush border membrane. *Biochim. biophys. acta*, 323, 1973, s. 98 až 112. — 23. Slabý, J., Frič, P., Kasafírek, E.: Endopeptidase activity of the brush border of human enterocyte. *Acta hepato-gastroenterol.*, (v tisku). — 24. Wojnarowska, F., Gray, G. M.: Intestinal surface peptide hydrolases: Identification and characterization of three enzymes from rat brush border. *Biochim. biophys. acta*, 403, 1975, s. 147–160.

Adresa: P. K., 121 11 Praha 2, Karlovo náměstí 32



Plán akcí České gerontologické společnosti pro rok 1979

Březen 1979: Pracovní den s Českou diabetologickou společností v Ústí nad Labem na téma Diabetes mellitus ve stáří. — Koordinátor: MUDr. Ivan Brožek, Ústí nad Labem.

Duben: Pracovní den s Čevní komisí České neurologické společnosti v Praze na téma Závratě ve stáří. — Koordinátor: MUDr. Hana Heřmanová, CSC.

Červen: III. jihočeské gerontologické dny se Spolkem lékařů v Českých Budějovicích na téma: Onkologie, thanatologie. — Koordinátoři: prof. MUDr. Vladimír Pacovský, DrSc., MUDr. Jan Reban.

Listopad: Vědecká konference s Českou gastroenterologickou společností v Přerově na téma: Onemocnění gastrointestinálního traktu ve stáří. — Koordinátor: MUDr. Květoslav Šipr.