

CHROM. 5769

SÄULENCHROMATOGRAPHISCHE TRENNUNG VON AMINOACYL-OLIGOPEPTIDHYDROLASEN NORMALER UND ARTERIOSKLEROTISCHER KANINCHENAORTEN*

JOACHIM WAGNER UND HANS-JOACHIM DUCK

*Medizinische Klinik***, Karl-Marx-Universität, Leipzig (D.D.R.)

(Eingegangen am 8. Juli 1971; geänderte Fassung am 22. September 1971)

SUMMARY

Separation of arylamidases of normal and atherosclerotic rabbit aortae by column chromatography

The changes in activities of arylamidases were studied in twenty-four rabbits fed cholesterol and in a group of twenty-one control animals. The total enzyme activities in serum and in the homogenates of the aortae were analysed, and, in addition, the enzymes were separated on DEAE-cellulose. The cholesterol feed did not significantly affect the total activity of the arylamidases in sera and aortae. Measurements of enzyme activities in the effluents resolved four distinct peaks in both the sera and the aortae. Neither enzyme components nor the distribution of activities identified by the degradation of substrate were affected by the atherosclerotic process. The chromatographic data show an identity in the first three components of sera and aortae. The fourth peak may be caused by two forms of the enzyme.

EINLEITUNG

Die Analyse der Isoenzyme L-Leucin- β -naphtylamid spaltender Aminopeptidasen wird vorwiegend chromatographisch an Cellulose-Ionenaustauschern betrieben, während elektrophoretische Methoden selten verwendet werden. Dabei hat sich das von PATTERSON *et al.*¹ angegebene Verfahren mit Tris-HCl-Puffer und einem von 0 bis 0.25 M steigenden Natriumchlorid-Lineargradienten für die Trennung intrazellulärer Aminoacyl-oligopeptidhydrolasen bewährt. Gleich gute Trennungen wurden auch mit Phosphatpuffern und linearem NaCl-Gradienten bis 0.3 M erzielt^{2,3}. Kombinationen von Konzentrations- und pH-Gradienten, die zur Trennung sehr heterogener Proteingemische notwendig sind⁴, wurden zur Isolierung dieser Enzyme noch nicht eingesetzt.

Solche Kombinationen bieten sich zur Lösung spezieller Fragestellungen an. So liegen heute bereits zahlreiche Einzelbefunde über bio- und histochemisch erfassbare Veränderungen der Enzymaktivitäten in pathologisch veränderten Gefäßwandbezirken, bei der Hypertonie sowie während des Alterns vor⁵⁻¹⁰. Die

* Herrn Prof. Dr. H. HANSON zum 60. Geburtstag gewidmet.

** Direktor: Prof. Dr. R. EMMRICH.

meisten der bisher erhaltenen Befunde lassen jedoch nicht erkennen, ob die nachgewiesenen Aktivitätsverluste bzw. -erhöhungen Ursache oder Folge der Gefäßwandprozesse sind und ob echte "de novo Synthesen" oder nur Enzymadaptationen an die vermehrt in der Gefäßwand abgelagerten Substrate stattfinden^{11,12}. Zur Lösung dieser Fragen tragen gezielte Trennungen von Isoenzymen mit Informationen über Veränderungen der Isoenzymmuster während pathologischer Prozesse bei.

MATERIAL UND METHODEN

Tiermaterial

Vierundzwanzig mischrassige Kaninchen beiderlei Geschlechts mit einer Anfangsgewicht von 1500–2000 g erhielten über 15 Wochen täglich 4 ml einer Suspension von einem Teil Cholesterol in fünf Teilen kaltgepressten Sonnenblumenöl über eine Schlundsonde appliziert. Neben dieser atherogenen Zulage konnten die Tiere Mischfutter und Wasser *ad libitum* zusichnehmen. Als Kontrollgruppe dienten 21 unter gleichen Umweltbedingungen, jedoch ohne Cholesterolzulage gehalten Kaninchen. Die Tiere wurden nach Beendigung der Fütterungsperiode nach 24 stündiger Nahrungskarenz durch Exsanguination getötet, das Blut gewonnen sowie die Aorten nach Präparation bis zu den Iliakalgefäßen entnommen.

Extraktpräparation

Die Aorten wurden von anhaftendem Gewebe befreit, längsgeteilt und die Blutreste mit 0,9 %iger NaCl-Lösung ab gespült. Alle cholesterolgefütterten Tiere wiesen auf mehr als 50 % der Gefäßwandfläche arteriosklerotische Plaques auf während bei den Kontrolltieren makroskopisch keine sichtbaren Veränderungen nachzuweisen waren. Dieser Beurteilung folgten eine mechanische Zerkleinerung und die Homogenisierung in 80 ml Startpuffer bei 14000 U/min unter Methanol-Trockeneis-Kühlung. Die Rückstände wurden mit weiteren 20 ml Puffer nachgewaschen. Nicht aufgeschlossene Partikel wurden danach bei 6000 U/min abzentrifugiert, der Niederschlag mit 20 ml Startpuffer nochmals in einem Potter-Elvehjem Glashomogenisator zerrieben und nach erneuter Zentrifugation der erhaltene Überstand von jeweils drei Aorten gepoolt.

In parallelen Arbeitsgängen wurden aus den so angefertigten Aortenextrakten bzw. den Seren durch Zusatz von Aceton (Verhältnis 1:1) die Hauptmenge der Aminosäurearylamidasen ausgefällt und nach Zentrifugation (4000 U/min) in Präzipitat angereichert. Dieses wurde in 20 ml 0,9 %iger NaCl-Lösung aufgenommen für 16 h bei +4° gegen den Startpuffer dialysiert und danach auf 5–8 ml eingeeengt.

Ionenaustauschchromatographie

Die Fraktionierung der Serum- bzw. Aortenextrakte erfolgte an DEAE Cellulose (Serva, Heidelberg) mit einer kontinuierlichen Gradientenelution, die von SOBER und Mitarb.⁴ für Serumproteine angegeben worden war. Vor dem Auftragen der Proben war die beladene und mit dem Startpuffer äquilibrierte Säule auf 5–8° vorgekühlt worden. Zur Erzielung eines von pH 7,0 auf 4,5 sinkenden pH-Gradienten und eines von 0,01 Mol/l auf 0,13 Mol/l steigenden Gradienten der Ionenstärke wurden bei einem konstanten Volumen von 250 ml im geschlossenen Mischgefäß mit nichtparallelen Wänden nacheinander verwendet: 100 ml 0,005 M Phosphat

puffer pH 7.0, 300 ml 0.02 M Phosphatpuffer pH 6.0, 500 ml 0.05 M NaH_2PO_4 -Lösung, 350 ml 0.05 M NaH_2PO_4 -Lösung + 0.02 Mol NaCl/l, 750 ml 0.05 M NaH_2PO_4 -Lösung + 0.05 Mol NaCl/l sowie 750 ml 0.05 M NaH_2PO_4 -Lösung + 0.1 Mol NaCl/l. Sämtliche Puffer und Salzlösungen enthielten ausserdem 0.0005 M MgCl_2 . Die Durchflussgeschwindigkeit betrug 20 ml/h. Der Verlauf der Gradienten wurde für die Serumfraktionierungen mit einer Glaselektrodenmesskette bzw. einem Nomogramm nach KOČENT¹³ ermittelt. Die weiteren Versuchsdaten sind den Beschreibungen der Elutionsdiagramme zu entnehmen.

Analytische Methoden

Die Proteinkonzentrationen in den Gesamtextrakten wurden mit einer Biuret-methode¹⁴ ermittelt, im Eluat wurde der Konzentrationsverlauf durch Messung der Absorbanz bei 280 nm registriert. Aus der Gruppe der Aminoacyl-oligopeptidhydro-lasen wurde die Aktivität der Aminosäurearylamidasen mit dem Substrat L-Leucin-*p*-nitroanilid (Leupa) gemessen¹⁵. 2.0 ml Eluat und 1.0 ml 0.1 M Phosphatpuffer pH 7.2 wurden dazu mit 0.1 ml 0.025 M Leupa (Serva, Heidelberg) für 60 min bei 25° inkubiert und die Spaltung bei 405 nm (Glasküvette, 1 cm Schichtdicke) registriert.

In Anlehnung an eine von WEBER¹⁶ angegebene Mikromethode wurden die Aktivitäten zusätzlich mit L-Leucin- β -naphthylamid (Leuna) im Eluat gemessen. Dazu wurden 1.0 ml Eluat mit 2.0 ml Puffer-Substrat-Lösung (Serva, Heidelberg) für 60 min bei 37° inkubiert, mit 1.0 ml Echtröt B-Lösung (Fluka, Schweiz) versetzt, 10 min unter mehrmaligem Durchmischen stehengelassen und gegen einen entsprechenden Leerwert bei 546 nm abgelesen. Für beide Methoden wurden die Extinktionsdifferenzen auf Internationale Enzymeinheiten umgerechnet.

ERGEBNISSE

In Fig. 1 ist der typische Verlauf der Serumchromatogramme dargestellt. Für die Fraktionierungen des Gesamtserums wurden 600–900 mg und für die des Acetonpräzipitates 400–600 mg Eiweiss auf eine 40 × 2.5 cm-Säule aufgetragen. Das Eluat wurde in Fraktionen zu 6 ml gesammelt. Die Proteinpeaks wurden durch Agargelelektrophorese als γ - und β_1 -Globuline bis zu den Elutionsvolumina um 700 ml, als β_1 -Globuline zwischen 700 und 900 ml, als Albumine und β_1 -Globuline bis 1400 ml und ab 1400 ml als Albumine und α -Globuline identifiziert. Der Acetonfällung fehlen vor allem Albumine und α -Globuline.

Für die Gesamtaktivität der Aminosäurearylamidasen im noch nicht fraktionierten Serum, gemessen mit Leupa als Substrat und 0.1 ml Testflüssigkeit im Ansatz ergaben sich mit 12.5 ± 6.0 mE pro 1 ml vor und 13.8 ± 6.2 mE 1 ml nach Cholesterolfütterung keine Unterschiede. Im Ausgangshomogenat der Aorten fanden sich nach Cholesterolfütterung mit 9.2 ± 4.8 mE/1 ml zwar höhere Gesamtaktivitäten als bei den Kontrolltieren mit 6.5 ± 3.4 mE/1 ml, doch bestanden keine signifikanten Differenzen ($p > 0.05$).

In Fig. 2 ist der Verlauf der im Eluat gemessenen Enzymaktivitäten des Serums dargestellt. Es waren vier Aktivitätsmaxima nachweisbar, die bei den Elutionsvolumina von 60, 180, 420 und 980 ml lagen, wobei die Zweitmessungen mit Leuna lediglich beim letzten Peak ein gering differierendes Maximum ergaben. Qualitative

Unterschiede der Serumenzyme cholesterolfütterter Kaninchen und der Kontrolltiere konnten aus den angefertigten fünfzehn Chromatogrammen nicht entnommen werden.

In Fig. 3 sind die Charakteristika der Fraktionierungen von Aortenhomogenaten

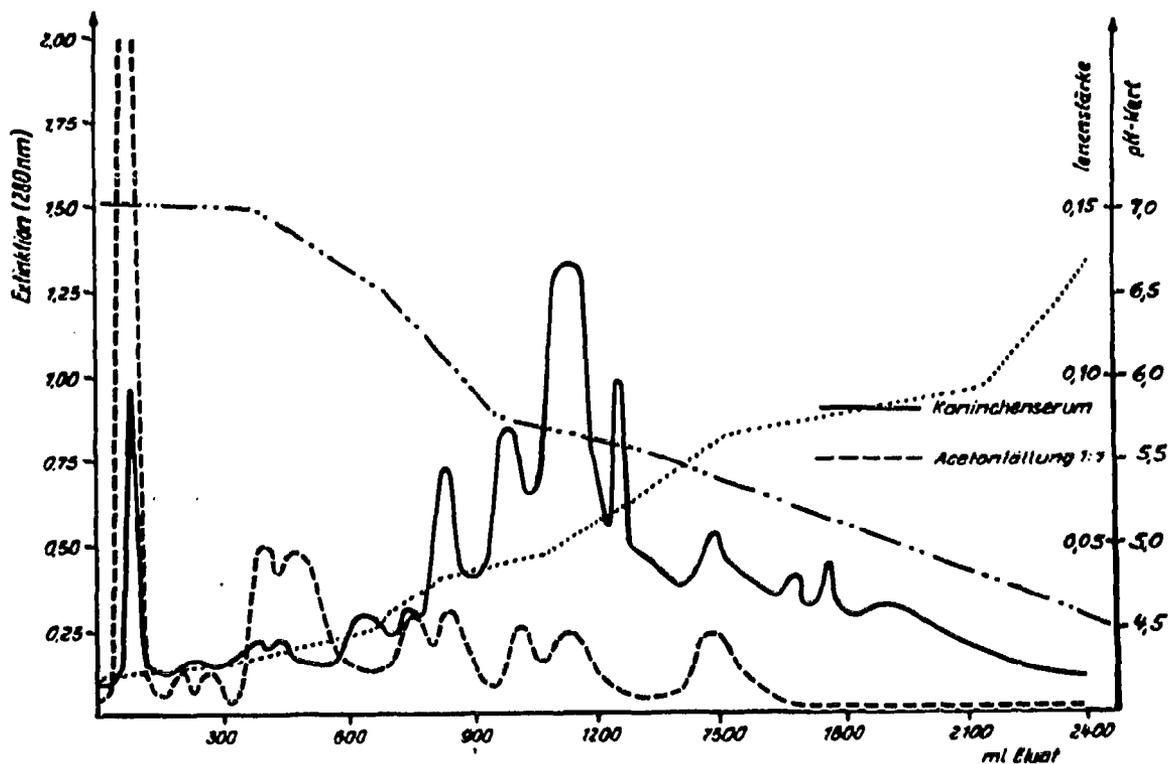


Fig. 1. Fraktionierung der Serumproteine vom Kaninchen durch kontinuierliche Gradientenelution an DEAE-Cellulose.

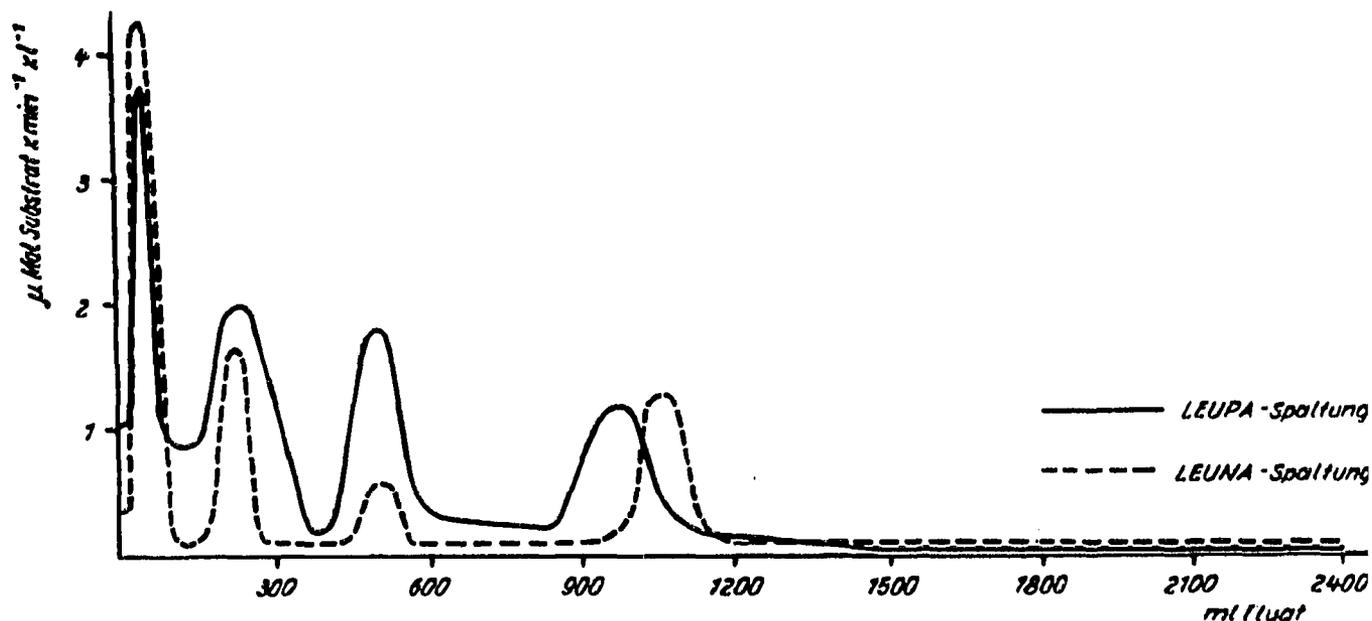


Fig. 2. Verteilung der Aktivitäten Leupa und Leuna spaltender Enzyme des Kaninchenserum im Eluat.

normaler und cholesterolfütterter Kaninchen dargestellt. Aufgetragen wurden bei den einzelnen Versuchen 50–80 mg der Aortenproteine auf eine 27×1.5 cm-messende Säule. Die weiteren Trennbedingungen entsprachen denen der Serumenzyme. Die Proteinmessungen zeigten unbeeinflusst durch die Fütterungsversuche jeweils zwei

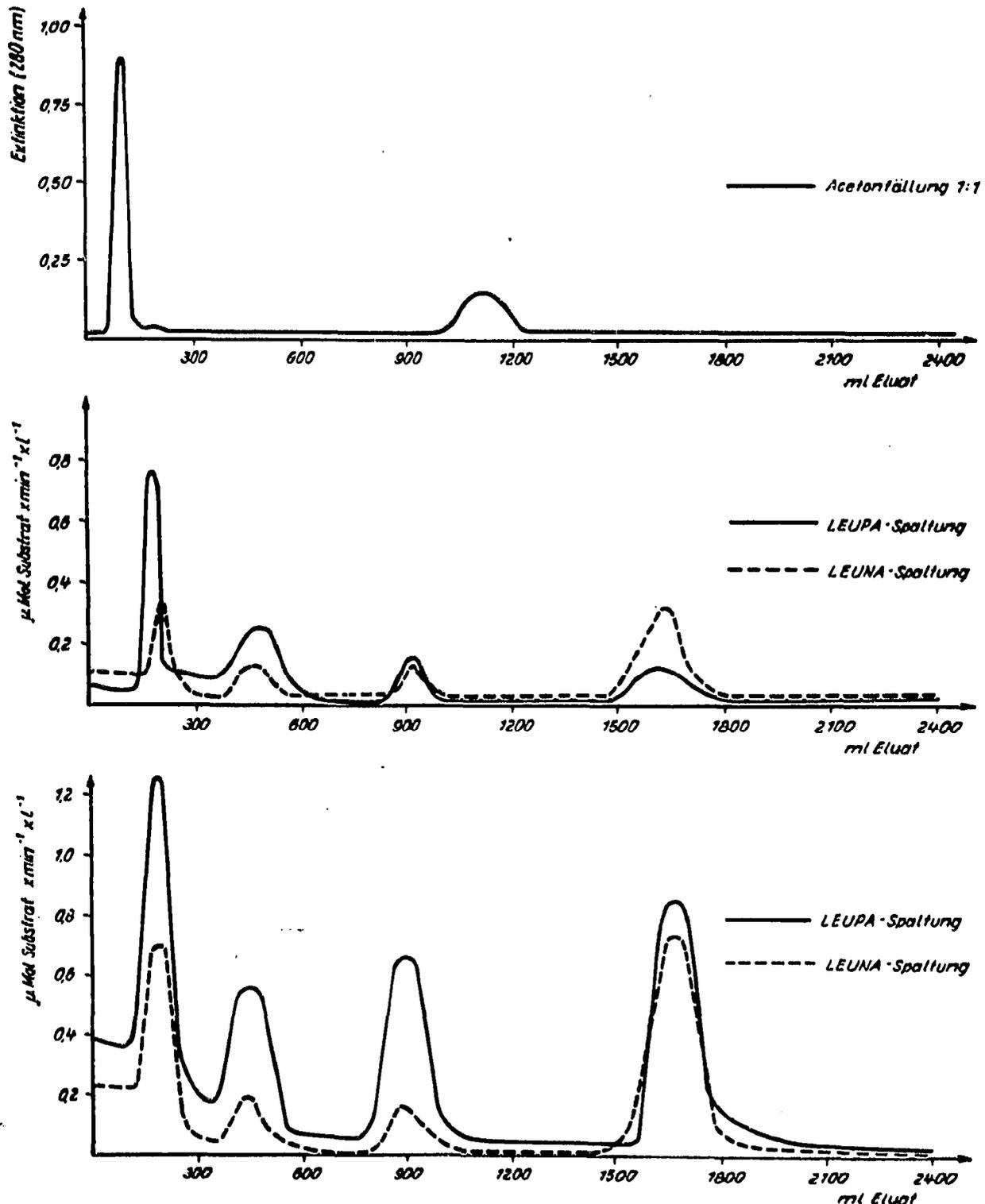


Fig. 3. Fraktionierung der Proteine und Aminosäurearylamidasen normaler (oben und Mitte) und arteriosklerotischer Kaninchenaorten (unten).

Extinktionsmaxima. Von diesen Proteinpeaks unabhängig waren in normalen und arteriosklerotischen Aorten vier voneinander gut abtrennbare Aktivitätsmaxima bei 120, 420, 900 und 1600 ml nachzuweisen. Ein qualitativer Unterschied in den Substratspaltungsmustern der Aorten vor und nach Cholesterolfütterung konnte somit nicht erhoben werden. Vergleicht man die Serum- und Aortenenzyme miteinander, so ergibt sich ein Verhältnis der Elutionsvolumina von 1:3:7:16 für die Serumenzyme und von 1:3.5:7.5:13 für die der normalen und pathologisch veränderten Aorten.

DISKUSSION

Mit der angewandten kontinuierlichen Gradientenelution an DEAE-Cellulose und den nachfolgenden Aktivitätsmessungen lassen sich die als Aminosäurearylamidasen bezeichneten Aminoacyl-oligopeptidhydrolasen sowohl im Serum als auch in den Organhomogenaten in vier gut voneinander abgegrenzte Aktivitätspeaks auftrennen. Die gleiche Anzahl von "Leucinaminopeptidase"-Komponenten fanden BEHAL und Mitarb.¹⁷ bei der chromatographischen Trennung der Arylamidasen des menschlichen Serums. Qualitative Veränderungen dieses Isoenzymmusters während pathologischer Prozesse konnten dabei nicht ermittelt werden. Entsprechend dem breiten Spektrum möglicher Aufgaben der Aminosäurearylamidasen im Proteinstoffwechsel und beim Abbau pharmakologisch aktiver Polypeptide wurden in den verschiedensten Organen und Zellverbänden molekular unterschiedliche Formen nachgewiesen und isoliert^{1-3,5}. Der Nachweis eines Leunasplattendes Enzyms in der Gefäßwand gelang 1955 zuerst GREEN und Mitarb.¹⁸. Bisher wurden bei diesem Enzym in der Gefäßwand nur quantitative Abweichungen der Aktivität untersucht. Beim Menschen fanden sich durch die Arteriosklerose in der Aorta keine signifikanten Veränderungen¹⁹. Dagegen konnte ZEMPLÉNYI⁹ beim Kaninchen histochemisch Aktivitätserhöhungen durch die Arteriosklerose nachweisen.

Übereinstimmend mit diesen Ergebnissen wurden in der vorliegenden Arbeit für die Aminosäurearylamidasen keine so erheblichen Aktivitätsanstiege gefunden, dass man daraus eine besondere Rolle dieser Enzyme im intrazellulären Proteinstoffwechsel während der Arteriosklerose ableiten könnte. Während die Entstehung arteriosklerotischer Gefäßveränderungen mit einer erheblich erhöhten Umsatz- und Einbaurrate für viele Stoffwechselfparameter in der Gefäßwand einhergeht²⁰⁻²³ und auch für eine Reihe von Enzymen der Nachweis einer stark erhöhten Aktivität, vor allem in den Randwinkeln arteriosklerotischer Beete und in den multifunktionellen Zellen der Media gelungen ist^{6,9,10}, nehmen die lysosomalen Aminosäurearylamidasen offenbar nicht in grossem Umfang an dieser Steigerung teil. Obgleich beträchtliche Stoffwechseldifferenzen vorhanden sind, gehen die Strukturveränderungen der Aortenwand nach den vorliegenden Ergebnissen auch nicht mit einer Änderung des Enzymbesatzes an Aminoacyl-oligopeptidhydrolasen einher.

Dafür spricht das fehlende Auftreten einer oder gar mehrerer neuer molekularer Formen Leupa und Leuna spaltender Enzyme in der pathologisch veränderten Gefäßwand. Serum und Aorta wiesen unabhängig von den Gefäßwandprozessen ständig je vier Aktivitätspeaks auf, wobei man für die ersten drei Enzyme bei den geringen Abweichungen der Elutionsvolumina eine Identität postulieren kann, weil durch die unterschiedliche Proteinzusammensetzung der beiden aufgetragenen Aus-

gangsmaterialien differierende Trennbedingungen bei der Ionenaustauschchromatographie angenommen werden müssen. Der Unterschied im Trennverhalten des letzten Aktivitätspeaks spricht für das Vorliegen zweier verschiedener Molekülformen von Arylamidasen in Serum und Aorta. Bei den hohen Absolutmengen der zur Elution dieser Enzyme notwendigen Volumina ist die Entscheidung darüber jedoch mit der Säulenchromatographie allein nicht zu fällen.

ZUSAMMENFASSUNG

Bei vierundzwanzig cholesterolgefütterten Kaninchen und einundzwanzig Kontrolltieren wurden quantitative und qualitative Aktivitätsänderungen der Aminosäurearylamidasen durch den Prozess der Arteriosklerose untersucht. Die Enzymaktivitäten wurden mit L-Leucin-*p*-nitroanilid und L-Leucin- β -naphthylamid als Substraten im Serum und den Aortenhomogenaten ermittelt. Anschliessend erfolgte die säulenchromatographische Trennung der Enzyme durch eine kontinuierliche Gradientenelution an DEAE-Cellulose. Für die Gesamtaktivität der Arylamidasen im Serum und den Ausgangshomogenaten der Aorten ergaben sich vor und nach Cholesterolfütterung keine signifikanten Änderungen. Die Aktivitätsmessungen im Eluat liessen im Serum und den Aorten jeweils vier Maxima erkennen. Dieses Substratspaltungsmuster wurde durch die Arteriosklerose nicht beeinflusst. Der Vergleich der Elutionsvolumina der Aktivitätspeaks lässt eine Identität der zuerst eluierten drei Enzyme aus Serum und Aorta erkennen, während das vierte Peak durch zwei molekular unterschiedliche Enzyme bedingt sein dürfte.

LITERATUR

- 1 E. K. PATTERSON, S. -H. HSIO UND A. KEPPEL, *J. Biol. Chem.*, 283 (1963) 3611.
- 2 F. J. BEHAL UND M. N. STORY, *Arch. Biochem. Biophys.*, 131 (1969) 74.
- 3 A. S. BRECHER UND J. B. SUSZKIW, *Biochem. J.*, 112 (1969) 335.
- 4 H. A. SOBER, F. J. GUTTER, M. M. WYCKOFF UND E. A. PETERSON, *J. Amer. Chem. Soc.*, 78 (1956) 756.
- 5 C. W. M. ADAMS, O. B. BAYLISS, Y. H. ABDULLA, F. R. MAHLER UND M. A. ROOT, *J. Atheroscler. Res.*, 9 (1969) 87.
- 6 Z. LOJDA UND T. ZEMPLÉNYI, *J. Atheroscler. Res.*, 1 (1961) 101.
- 7 V. MARINESCU, E. PAUSESCU, I. PAVELESCU UND D. FAGARASANU, *J. Cardiovasc. Surg.*, 9 (1968) 54.
- 8 J. PATELSKI, D. E. BOWYER, A. N. HOWARD, I. W. JENNINGS, C. J. R. THORNE UND G. A. GRESHAM, *Atherosclerosis*, 12 (1970) 41.
- 9 T. ZEMPLÉNYI, *J. Atheroscler. Res.*, 2 (1962) 2.
- 10 T. ZEMPLÉNYI, *Enzyme Biochemistry of the Arterial Wall as related to Atherosclerosis*, Lloyd-Luke, London, 1968.
- 11 D. PLATT, *Klin. Wochenschr.*, 45 (1967) 92.
- 12 D. PLATT, *Med. Klin.*, 64 (1969) 1261.
- 13 A. KOČENT, in M. RYBÁK, Z. BRADA UND I. M. HAIS (Herausgeber), *Säulenchromatographie an Cellulose-Ionenaustauschern*, Fischer, Jena, 1966.
- 14 F. GREENSPAN UND D. DREILING, *Arch. Int. Med.*, 91 (1953) 474.
- 15 H. TUPPY, U. WIESBAUER UND E. WINTERSBERGER, *Z. Physiol. Chem.*, 329 (1962) 279.
- 16 H. WEBER, *Clin. Chim. Acta*, 10 (1964) 521.
- 17 F. J. BEHAL, C. B. KANAVAGE UND R. D. HAMILTON, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 109 (1962) 411.
- 18 M. N. GREEN, K. TSOU, R. BRESSLER UND A. M. SELIGMAN, *Arch. Biochem. Biophys.*, 57 (1955) 458.
- 19 J. E. KIRK, *J. Gerontol.*, 15 (1960) 136.
- 20 P. CONSTANTINIDES, *Experimental Atherosclerosis*, Elsevier, Amsterdam, 1965.
- 21 H. A. I. NEWMAN, G. W. GRAY UND D. B. ZILVERSMIT, *J. Atheroscler. Res.*, 8 (1968) 745.
- 22 R. SANWALD, E. RITZ UND B. HUG, *J. Atheroscler. Res.*, 8 (1968) 433.
- 23 S. VIRÁG, T. POZSONYI, R. DÉNES UND S. GERÖ, *J. Atheroscler. Res.*, 8 (1968) 859.