

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA

*UMA NOVA METALO-ENDOPEPTIDASE  
PURIFICADA DO CÉREBRO HUMANO QUE  
HIDROLISA NEUROPEPTÍDIOS*

MARIA ANDRÉA FROTA RUCHON

Tese de mestrado apresentada no  
Curso de Pós-Graduação em Farmacologia  
da Universidade Federal do Ceará.

FC-00002672-0

TESE  
615  
2890  
1994

FORTALEZA - CE  
1994

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
BIBLIOTECA - AV. ALBUQUERQUE, 1500  
FORTALEZA - CE

C211125  
R489441

UFC	BIBLIOTECA CENTRAL
Nº.	489441
14 / 06 / 96	

UFC	BIBLIOTECA CENTRAL
Nº.	1107
15 / 09 / 94	

R899u  
1994

Ruchon, Maria Andréa Frota  
 Uma nova metalo-endopeptidase purificada do cérebro humano que hidrolisa neuropeptídios / Maria Andréa Frota Ruchon - Fortaleza - CE : UFC, 1994  
 p. 51

Orientador: Prof. Dr. Krishnamurti de Moraes Carvalho.

Dissertação ( Mestrado ). Universidade Federal do Ceará. Departamento de Fisiologia e Farmacologia.

1. Peptídio Peptidoidrolases
2. Neuropeptídios
- I. Título

MARIA ANDRÉA FROTA RUCHON

UMA NOVA METALO-ENDOPEPTIDASE PURIFICADA DO  
CÉREBRO HUMANO QUE HIDROLISA NEUROPEPTÍDIOS

Dissertação apresentada à Universidade Federal do  
Ceará com parte dos requisitos necessários à obtenção do  
grau de Mestre em Farmacologia.

Aprovada, em 27 de Junho de 1994, por:

---

Prof. Dr. Krishnamurti de Moraes Carvalho  
( Orientador )

---

Profa. Dra. Glauce Socorro de Barros Viana

---

Prof. Dr. José Afonso Bruno

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ



## **Dedico**

**Ao meu esposo, Jean Pierre Ruchon, pelo incentivo, carinho e compreensão nas horas mais difíceis.**

**Aos nossos filhos, Julien e Christian, por inocentemente suportarem minha ausência de mãe.**

**Aos meus pais, Manuel Artur e Vera, por tudo o que fizeram por mim.**

## AGRADECIMENTOS

A Deus, para quem nada é impossível.

Ao Prof. Dr. Krishnamurti de Moraes Carvalho, pela orientação, disponibilidade, amizade e incentivo à carreira científica.

A senhorita Maria Silvandira Freire de França, pela sua cooperação imprescindível no laboratório.

Aos colegas do laboratório, especialmente aos amigos Maria Angelina da Silva Medeiros e Antônio Raimundo Nava, pela cooperação e companheirismo.

Enfim, a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Este trabalho foi realizado com suporte financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico ( CNPq ), da Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior ( CAPES ) e da Financiadora de Estudos e Projetos ( FINEP ).

## INDICE

	Página
Resumo	
Abstract	
INTRODUÇÃO	
1.1. Peptídios biologicamente ativos	01
1.2. Enzimas conhecidas implicadas na degradação de peptídios biologicamente ativos	05
1.2.1. Endopeptidase Neutra (E.C.3.4.24.11., NEP, encefalinase )	06
1.2.2. Enzima conversora de angiotensina (E.C.3.4.15.1., ACE, cininase II )	09
1.2.3. Enzima degradadora de insulina (E.C.3.4.22.11., IDE, insulinase )	10
1.2.4. Endo-oligopeptidase A (E.C.3.4.19.22., endo A )	11
1.3. Objetivos	13
MATERIAL E MÉTODOS	
2.1. MATERIAL	
2.1.1. Origem da enzima	14
2.1.2. Peptídios utilizados	14
2.1.3. Reagentes diversos	14
2.1.4. Aparelhos	15

## 2.2. MÉTODOS

2.2.1.	Extração enzimática	16
2.2.2.	Determinação da atividade enzimática	16
2.2.3.	Determinação da concentração de proteínas	17
2.2.4.	Diálise das amostras	17
2.2.5.	Cromatografia em coluna de DEAE-Trissacril	17
2.2.6.	Cromatografia em coluna de Hidroxiapatita	18
2.2.7.	Cromatografia em coluna de Sephacril S-200	18
2.2.8.	Perfil de inibição da atividade enzimática purificada	18
2.2.9.	Eletroforese em placa de gel de poliacrilamida na ausência e presença de SDS	19
2.2.10.	Hidrólise de alguns peptídios pela metalo-endo-peptidase cerebral humana	20

## RESULTADOS

3.1.	Cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-Trissacril da fração sobrenadante do homogenato de cérebro humano	21
3.2.	Cromatografia em coluna de Hidroxiapatita do pool resultante do DEAE-Trissacril	21
3.3.	Cromatografia em coluna de Sephacril S-200 do pool resultante da Hidroxiapatita	24
3.4.	Balanço da purificação da metalo-endopeptidase isolada do cérebro humano	24
3.5.	Eletroforese em placa de gel de poliacrilamida da metalo-endopeptidase da fração solúvel do cérebro humano	27



3.6.	Determinação do pH ótimo de atuação da metalo-endopeptidase cerebral humana	27
3.7.	Perfil de inibição da atividade enzimática purificada do cérebro humano	27
3.8.	Hidrólise de alguns peptídios pela ennzima cerebral purificada	31

## DISCUSSÃO

4.1.	Purificação da metalo-endopeptidase da fração solúvel do cérebro humano	37
4.2.	Caracterização da endopeptidase do cérebro humano	39

CONCLUSÕES	42
------------	----

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	44
----------------------------	----

## RESUMO

Um número bastante limitado de peptidases parece estar envolvido na inativação pós-secretora de mensageiros hormonais peptídicos. A importância desses mecanismos proteolíticos na regulação da ação hormonal pode ser demonstrada pelo fato de que seus efeitos podem ser prolongados "in vivo" ou "in vitro" por inibidores seletivos dessas enzimas.

Neste estudo, uma nova endopeptidase foi purificada à partir do cérebro humano. Esta peptidase exibe um caráter termolisina-símile e hidroliza ligações peptídicas no lado amino terminal de aminoácidos hidrofóbicos, clivando seletivamente as ligações Xaa-Phe, Xaa-Leu ou Xaa-Ile ( Xaa = Ser, Phe, Tyr, His ou Gly ) de diversos hormônio-peptídios, como a substância P, a bradicinina, o fator natriurético atrial (ANF) e a angiotensina II . Essa peptidase também cliva o peptídeo  $\beta$ -amilóide (1-40). Essa enzima exibe um pH ótimo entre 7,3 e 7,8 e apresenta um peso molecular de aproximadamente 200 KDa. A atividade endopeptidásica foi inibida por quelantes de cátions divalentes como o-fenantrolina, EDTA e DTT e foi insensível aos inibidores clássicos da endopeptidase neutra (NEP), da enzima conversora de angiotensina, das serinas e cisteínas, assim como das carboxipeptidases.

Hipotetizamos que esta enzima, que é diferente da NEP, possa participar de uma recém-descrita família de metalo-endopeptidases correlatas, protagonizada pela PHIE ( Carvalho et al., 1992 ) que inativam substratos peptídicos através de clivagem nas ligações Xaa-Phe, Xaa-Leu ou Xaa-Ile.

## ABSTRACT

A rather limited number of peptidases seem to be involved in the post-secretory inactivation of peptide hormone messengers. The importance of these proteolytic mechanisms in regulating hormonal action can be demonstrated by the fact that their effects can be prolonged "in vivo" or "in vitro" by selective inhibitors of these enzymes.

In this study, a new endopeptidase was purified from normal human brain. This peptidase exhibits a thermolysin-like character and hydrolyzes bonds on the amino terminus of hydrophobic amino acids, performing a selective cleavage at the Xaa-Phe, Xaa-Leu, or Xaa-Ile doublets ( Xaa = Ser, Phe, Tyr, His, or Gly ) of a number of peptide hormones, including substance P, bradykinin, atrial natriuretic factor (ANF) and angiotensin II. This peptidase also cleaves the  $\beta$ -(1-40) amyloid peptide. This enzyme exhibited optimal activity at pH 7,3 - 7,8 and has an apparent molecular weight of 200 KDa.

The endopeptidase activity was inhibited by divalent cation chelators like o-phenanthroline, EDTA and DTT and was insensitive to classical inhibitors of neutral endopeptidase (NEP), angiotensin convertase, and serine and cysteine peptidase, as well as carboxypeptidases.

It is hypothesized that this enzyme, which is distinct from NEP, may participate in a recently described family of related metalloendopeptidases that inactivate peptide substrates by cleavage at the Xaa-Phe, Xaa-Leu, or Xaa-Ile bond.

## INTRODUÇÃO

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. PEPTÍDIOS BIOLOGICAMENTE ATIVOS

Os peptídios biologicamente ativos constituem a mais nova classe de moléculas envolvidas em funções chaves como transmissão ou modulação no sistema nervoso central e periférico e em outros tecidos. Tornou-se claro , principalmente nos últimos vinte anos , que os peptídios são no mínimo tão importantes como moléculas sinalizadoras quanto os neurotransmissores clássicos como acetilcolina , noradrenalina , dopamina , etc. Atualmente o número de mediadores peptídicos conhecidos é superior ao dos não peptídicos , com tendência para crescer mais ainda. Essa inversão é justificada pelo avanço relativamente recente na metodologia necessária para o estudo dos peptídios , como por exemplo o uso de anticorpos tanto para radioimunensaio , quanto para localização imunocitoquímica, e de técnicas de biologia molecular, que permitiram a clonagem de vários peptídios ou de seus precursores ( Schwartz e Costa , 1986; Eipper et al. , 1986).

O tamanho dos peptídios biologicamente ativos varia de três a 50 aminoácidos dispostos geralmente em cadeia linear; moléculas com mais de 50 resíduos são convencionalmente chamadas de proteínas. A figura 1 mostra alguns mediadores peptídicos típicos relacionados de acordo com o seu número de aminoácidos.

A estrutura dos peptídios é codificada diretamente no genoma da célula, que produz uma proteína precursora na qual está inserida a sequência de aminoácidos do peptídio, juntamente com enzimas proteolíticas específicas que o liberam já na sua forma ativa. Desde a década de 70, foram definidas as estruturas de 30 ou mais precursores peptídicos ( Schwartz e Costa, 1986 ).

De um modo geral a proteína precursora, também conhecida como pré-pró-hormônio, é uma grande molécula constituída por uma sequência sinalizadora , que permite sua passagem através da

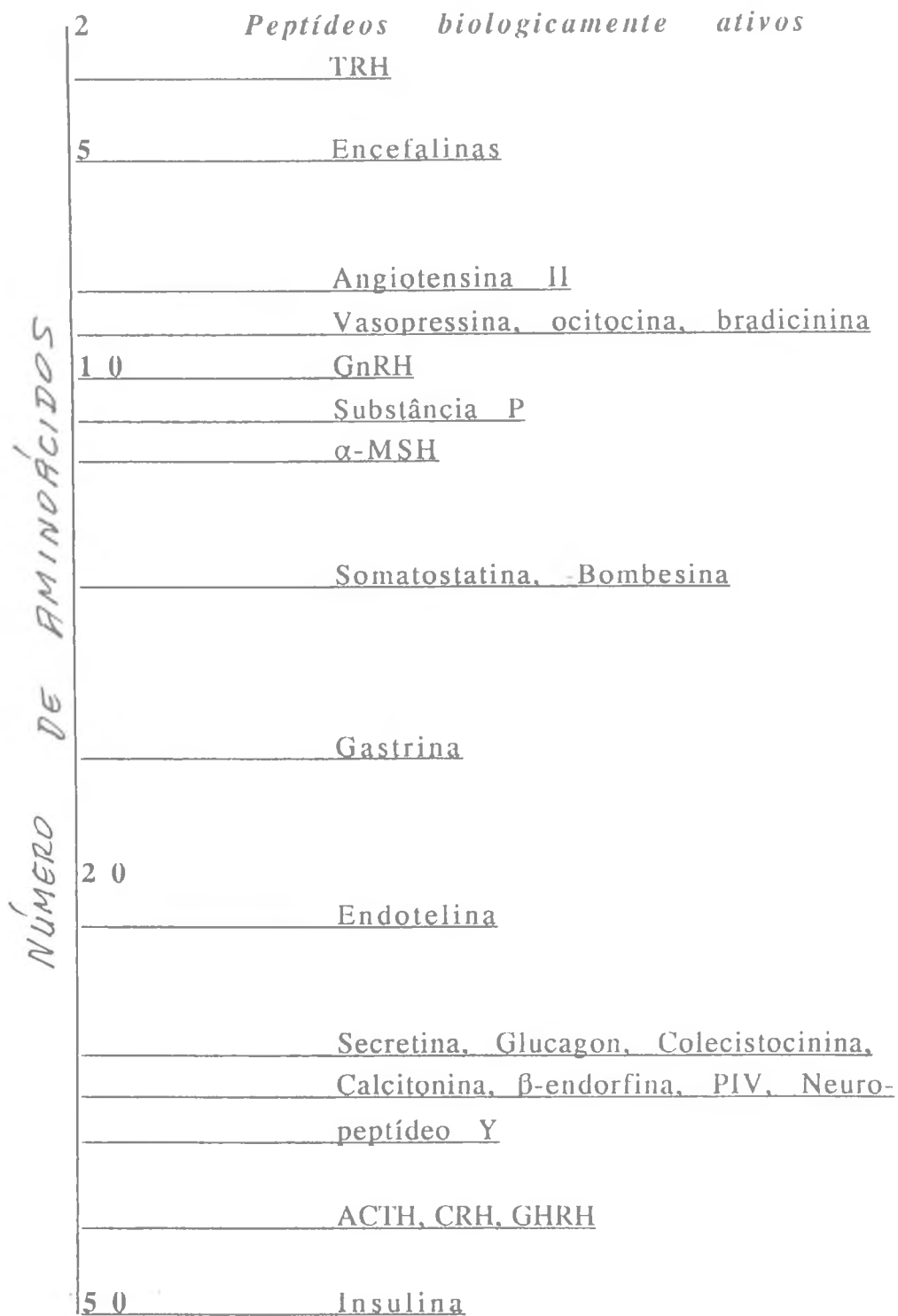


Fig. 1- Alguns mediadores peptídicos típicos (TRH= hormônio liberador de tireotrofina, GnRH= hormônio liberador de gonadotrofina,  $\alpha$ -MSH= hormônio estimulador dos  $\alpha$ -melanócitos, PIV= peptídeo intestinal vasoativo, ACTH= hormônio adrenocorticotrófico, CRH= hormônio liberador de corticotrofina, GHRH= hormônio liberador de hormônio do crescimento ).

membrana, e pelo pró-hormônio, que contem as sequências encaixadas de um ou mais peptídios ativos. Estes são liberados no meio intracelular por clivagem enzimática seletiva, e na maioria dos casos, acumulados em vesículas para serem liberados.

A maioria dos peptídios conhecidos é proveniente do sistema nervoso e órgãos endócrinos, embora alguns sejam formados no plasma ou em outros tecidos ( por exemplo endotélio vascular, coração, células do sistema imunológico, etc.). Com o auxílio da imunohistoquímica, vários mapeamentos foram realizados no sistema nervoso central como por exemplo para: substância P ( Cuello e Kanazawa , 1978 ), encefalinas ( Hökfelt et al. ,1977 ; Bloom et al., 1978 ; Larsson et al., 1979 ), neurotensina ( Uhl et al., 1977 , 1979 ), bradicinina (Correa et al., 1979) e angiotensina (Changaris et al., 1976). As áreas mais ricas nestes peptídios foram o hipotálamo, o complexo amigdalóide, o bulbo e a medula espinhal ( Carvalho, 1981).

A ampla distribuição das múltiplas formas de peptídios biologicamente ativos não apenas no tecido nervoso como também nos sistemas endócrino e imune, no plasma e diversos outros tecidos, indica que eles podem estar envolvidos na regulação de um largo espectro de processos fisiológicos. De fato, numerosos são os estudos sugerindo o envolvimento de um ou mais desses peptídios nos processos fisiológicos de analgesia, stress, regulação cardiovascular, aprendizado e memória, termorregulação, imunomodulação, desenvolvimento do câncer entre outros ( Olson et al.,1990 ). Mais especificamente , podemos citar a substância P ( o protótipo dentro da família das taquicininas ) e as encefalinas ( pertencentes às famílias da pró-encefalina e pró-dinorfinas ) envolvidas na mediação da dor; o Fator Natriurético Atrial ( ANF ) envolvido no controle fisiológico da pressão arterial e a bradicinina ( pertencente a família das cininas ) envolvida nos processos inflamatórios.

Assim como ocorre com os neurotransmissores clássicos, as funções fisiológicas desses peptídeos estão intimamente relacionadas com os seus processos de síntese e inativação. Uma vez delivrada a informação através de receptores específicos, a degradação seletiva desses peptídeos é realizada através de enzimas proteolíticas, sendo de fundamental importância para o término da ação dessas substâncias. As enzimas envolvidas tanto na síntese ( sua liberação do precursor ) quanto na degradação dos peptídeos tem sido alvo de intensas investigações.

Desde o trabalho pioneiro de Hooper, em 1962, demonstrando a degradação da bradicinina, ocitocina, substância P e vasopressina pelo homogenato de hipotálamo de cão, até a presente data, inúmeros trabalhos tem sido realizados com o intuito de identificar as enzimas do tecido nervoso capazes de degradar peptídeos biologicamente ativos. Nos últimos 10 anos, com o grande avanço no campo da pesquisa com neuropeptídeos, o número destes trabalhos vem aumentando de uma maneira exponencial. Infelizmente, muitos desses estudos tem sido feitos com frações enzimáticas impuras de tecido nervoso, o que geralmente dificulta a interpretação dos resultados obtidos, uma vez que os peptídeos podem ser potencialmente degradados por várias enzimas proteolíticas diferentes. Portanto poucas dessas enzimas foram até o momento completamente purificadas, bem caracterizadas e clonadas.



## 1.2. ENZIMAS CONHECIDAS IMPLICADAS NA DEGRADAÇÃO DE PEPTÍDIOS BIOLÓGICAMENTE ATIVOS.

Parece claro atualmente que tanto no sistema nervoso central quanto em tecidos periféricos, os peptídios são degradados extracelularmente por um número provavelmente limitado de enzimas com pouca especificidade. Grande parte dessas enzimas são ectoenzimas, isto é, proteínas membranares cujo centro ativo localiza-se no meio extracelular, e muitas são metalopeptidases com um átomo de zinco no seu centro ativo ( Turner et al., 1987; Maroux, 1987 ).

As metaloproteinases portadoras de zinco formam um grande grupo de enzimas que incluem a endopeptidase neutra ( NEP ), a enzima conversora de angiotensina ( ACE ), a aminopeptidase N, carboxipeptidases A, B e E, collagenases e estromalisina, e a termolisina, uma endopeptidase bacteriana ( Valleé e Auld, 1990 ). O grande interesse envolvendo as endopeptidases surgiu no final da década de 70 após a descoberta de que a inibição da ACE , enzima implicada na formação de Angiotensina II a partir de Angiotensina I, produzia efeitos anti-hipertensivos ( Ondett et al., 1977 ), e três anos depois que a inativação de outra metalo-endopeptidase membranares, envolvida na inativação de encefalinas no cérebro, induzia respostas analgésicas ( Roques et al., 1980 ). Devido a sua capacidade em metabolizar encefalinas , esta enzima foi designada Encefalinase ( Malfroy et al., 1986 b ) e pouco tempo depois foi demonstrado que ela era idêntica à NEP, uma metalo-endopeptidase dependente de zinco já bem caracterizada , presente na borda em escova de células epiteliais dos túbulos proximais do rim ( Kerr e Kenny , 1974 a , b ).

A medida que progrediam os estudos dessas enzimas , tornou-se claro que , igualmente aos seus substratos peptídicos , sua distribuição no organismo era bastante ampla e o conceito de uma peptidase para cada substrato tornou-se ultrapassado ( Schwartz ,

1983 ; Kenny ,1986 ). Corroborando este fato , sabe-se hoje que a NEP participa também da inativação do Fator Natriurético Atrial ( ANF ) circulante no plasma ( Koehn et al., 1987 ; Stephenson e Kenny , 1988 a ; Sonnemberg et al. , 1988 ; Olins et al. , 1989 ) além de ter sido identificada como uma das proteínas usadas pelos imunologistas como marcadores de linfócitos conhecida como CALLA ( CD 10 ) ( Greaves et al. , 1975 ; Letarte et al . , 1988 ) .

Portanto a luz do conhecimento atual , acredita-se que existam poucas enzimas capazes de inativar os substratos peptídicos , com larga distribuição no organismo e com diferentes especificidades dependendo de sua localização. Dentre estas apenas a NEP , a ACE , a IDE ( Enzima Degradadora de Insulina ) e a Endo-oligopeptidase A ( Endo A ) foram clonadas ou bem caracterizadas a ponto de serem classificadas pelo NOMECLATURE COMMITTEE OF INTERNATIONAL UNION OF BIOCHEMISTRY.

### **1.2.1. ENDOPEPTIDASE NEUTRA ( E.C.3.4.24.11. , NEP , ENCEFALINASE ).**

Descoberta na borda em escova de células epiteliais dos túbulos proximais do rim de coelho por Kerr e Kenny em 1974 e no cérebro de rato por Malfroy e colaboradores em 1978 , e clonada quase simultaneamente por dois grupos , o de Malfroy ( Malfroy et al. , 1987 ) e o de Boileau em Montreal ( Devault et al. , 1987 ), a NEP é uma proteína membranaar com caracter de ectoenzima , peso molecular que varia de 90 a 94 KDa , e cuja forma humana é constituída por 742 aminoácidos com 93% de homologia com as formas do rato e do coelho ( Erdös e Skidgel , 1989 ).

Trata-se de uma metalo-endopeptidase dependente de zinco com mecanismo de ação semelhante ao da Termolisina ( caracter termolisina-like ), clivando substratos no lado amino de aminoácidos hidrofóbicos ( fenilalanina , leucina , isoleucina , triptofano e tirosina ).

Além de estar presente em altas concentrações no sistema nervoso central ( Schwartz et al. , 1981 ) e na borda em escova dos túbulos proximais do rim ( Kerr e Kenny , 1974 ), a NEP também é encontrada nas microvilosidades intestinais ( Danielsen et al.,1980 ), em fibroblastos pulmonares ( Johnson et al. , 1985 ) e cutâneos ( Schulz et al. , 1988 ), na placenta ( Johnson et al., 1984 ), no trato genital masculino ( Erdös et al. , 1985 ) e na membrana celular de neutrófilos humanos ( Connelly et al. , 1985 ), onde é idêntica ao antígeno das leucemias linfoblásticas agudas ( CALLA , CD 10 ).

Nas células e tecidos descritos acima ela está inserida na membrana , mas uma forma solúvel foi encontrada em vários fluídos biológicos humanos como plasma , líquido amniótico e plasma seminal ( Spillantini et al. , 1990 ). O modo pelo qual a NEP se solubiliza ainda é desconhecido.

Diante de tão ampla distribuição era de se esperar uma atuação à altura, e de fato, muitos peptídios de importância fisiológica são clivados pela NEP dependendo de sua localização como substância P e encefalinas no cérebro, substância P no pulmão , ANF nos rins e bradicinina em diversos tecidos ( Gafford et al., 1983; Pozgay et al., 1985; Skidgel e Erdös, 1986; Ura et al., 1987; Erdös e Skidgel, 1989 ). O número de substratos da NEP aumenta a cada dia ( tabela 1 ) e muito do seu significado biológico ainda está para ser esclarecido.

Atualmente são conhecidos alguns inibidores da NEP como Fosforamidom, Tiorfam, Retrotiorfam, Acetorfam, Kelatorfam e a busca de uma maior especificidade de inibição com possibilidade de utilização terapêutica é motivo de intensas pesquisas.

O interesse científico e os rápidos avanços obtidos no estudo desta enzima são motivos de realização de Simpósios Anuais Internacionais sobre o assunto.

Tabela 1 - Peptídios clivados pela NEP " in vivo " e " in vitro "

<i>in vivo</i>	<i>in vitro</i>
encefalinas	cadeia $\beta$ da insulina
bradicinina	encefalinas
substância P	dinorfinas
neurotensina	$\alpha$ e $\beta$ -neendorfinas
peptídio quimiotáxico	$\gamma$ - endorfina
gastrina	bradicinina
ANF	angiotensinas I e II
	substância P
	neuroquininas A e B
	fisalaemina
	$\beta$ -lipotrofina
	neurotensina
	ocitocina
	peptídios quimiotáxico
	colecistoquinina
	gastrina
	ANF
	interleucina 1 $\beta$
	LHRH

## 1.2.2 ENZIMA CONVERSORA DE ANGIOTENSINA ( E.C.3.4.15.1. , ACE , CININASE II )

Descrita nos anos 50 ( Skeggs et al.,1956 ), chamada de cininase II por inativar a bradicinina circulante de passagem pelo pulmão ( Kroneberg e Stoepel,1963 ; Ferreira e Vane,1967 ; Vane ,1969),conhecida também como Enzima Conversora de Angiotensina por converter angiotensina I em angiotensina II na circulação pulmonar ( Helmer,1957 ; Biron e Huggins,1968 ; Yang et al.,1970 a), somente na década de 70 se descobriu que se tratava da mesma enzima ( Yang et al., 1970 a, b; Igic et al., 1972) .

A ACE é uma enzima transmembranar formada por uma única cadeia de aminoácidos, com peso molecular variando de 195 a 200 KDa, com capacidade de hidrolisar diversos substratos peptídicos com peso molecular de até 1,2 KDa, como por exemplo a bradicinina, as encefalinas , a substância P , a neurotensina e o LHRL ( Skidgel e Erdös, 1985,1987 ; Skidgel et al.,1987).

É encontrada no endotélio vascular ( Cadwell et al.,1976; Ryan et al.,1986), nas células neuro-epiteliais, no plexo coróide, nos microvilos da placenta, no intestino delgado e nos túbulos renais (Hall et al., 1986; Sculz et al., 1988) Nos testículos acredita-se que ela seja secretada pelas células do epitélio luminal para o plasma seminal. Do mesmo modo que a NEP, a ACE também é encontrada em forma solúvel nos fluídos biológicos. Sua presença em tecidos onde ocorre transporte de sódio parece ser de importância fisiológica e acredita-se que, através da regulação dos níveis de angiotensina , ANF e cininas , a ACE possa modular o transporte de sódio nas células. No cérebro, ela também cliva as encefalinas na ligação Gly - Phe, como a NEP ( Erdös et al., 1978 ) porém sua baixa afinidade por este substrato (Km de aproximadamente de  $10^{-3}$  M ), torna improvável um papel fisiológico relevante no metabolismo desses peptídios .

Atualmente alguns inibidores da ACE como o Captopril, o Enalapril e o Ramipril já estão sendo utilizados terapeuticamente no controle de pacientes hipertensos.

### 1.2.3. ENZIMA DEGRADADORA DE INSULINA ( E.C.3.4.22.11. IDE , INSULINASE )

A enzima degradadora de insulina ( IDE ) é uma protease citosólica neutra com peso molecular de aproximadamente 110 KDa e pH ótimo igual a 7,0. Seu espectro de inibição revela tratar-se de uma tiol-metaloproteinase. Dados obtidos da clonagem e de estudos de imunomarcagem mostraram que esta proteína é altamente conservada filogeneticamente( Kuo et al., 1990), ocorrendo nos diversos tecidos testados até agora, como sistema nervoso central (Müller et al., 1991 ), na musculatura esquelética( Brush, 1971 ), no fígado ( Burghen et al., 1972 ), no rim ( Duckworth, 1976 ), nos adipócitos ( Goldstein e Livingston, 1980 ), no pâncreas ( Goldfine et al., 1984 ; Bhathema et al., 1985 ), na placenta ( Posner, 1973), nos fibroblastos ( Stentz et al., 1985 ) e em eritrócitos humanos ( Shii et al., 1985 ).

Apesar de ser conhecido há mais de 40 anos o envolvimento da IDE no metabolismo da insulina, sua função biológica e sua localização subcelular ainda não estão esclarecidas. Diversas evidências indicam que a IDE é uma enzima citosólica não lisossomal ( Hari et al.,1987; Akyama et al., 1988 ). Foi demonstrado que a degradação da insulina pela IDE ocorre após o processo de internalização mediado pelo receptor após sua ligação com o substrato ( Duckworth et al., 1988). No entanto, o significado fisiológico da degradação da insulina pela IDE ainda é motivo de discussão. A degradação da insulina iniciada pela IDE pode ser importante para inativar o hormônio ( Yonezawa et al, 1989) ou, alternativamente, a clivagem específica originando peptídios intermediários pode servir para gerar novos transmissores intracelulares ( Rose et al., 1988 ; Steiner, 1977 ).

Questões adicionais derivam de estudos mostrando que a enzima apresenta especificidade para clivar vários outros substratos peptídicos ativos além da insulina, como por exemplo o ANF, o fator de crescimento tumoral  $\alpha$  ( TGF  $\alpha$  ), o fator de crescimento epidérmico e o glucagon ( Garcia et al.,1989; Müller et al., 1991 , 1992 ) .

#### 1.2.4. ENDO-OLIGOPEPTIDASE A ( E.C.3.4.19.22., ENDO A )

Purificada por Carvalho e Camargo em 1981 a partir do homogenato de cérebro de coelho, a Endo-oligopeptidase A apresenta as seguintes características: ponto isoelétrico 4,9, peso molecular de aproximadamente 70 KDa e espectro de inibição que sugere tratar-se de uma tiol-metalopeptidase. Está presente no cérebro humano tanto na fração solúvel ( Camarão, 1987 ) quanto na membrana ( Furtado, 1990 ). Seu mecanismo de ação ainda não está totalmente compreendido, porém sabe-se que ela cliva ligações peptídicas de vários peptídeos opióides, desde que sejam constituídos por 8 a 16 resíduos de aminoácidos, liberando encefalinas, sendo também dotada de importante atividade cininásica ( Carvalho e Camargo,1981 ).

Além dessas quatro enzimas descritas acima, uma nova família de metalo-endopeptidases vem sendo estudada nos últimos cinco anos pelo grupo do Professor Krishnamurti de Moraes Carvalho. Evidências de uma atividade enzimática insensível ao fosforamidom ( portanto diferente da NEP ), tanto no sistema nervoso central quanto na medula da supra-renal humana já existiam no nosso laboratório desde 1990 ( Carvalho et al., 1991).

Em 1992, o professor Krishnamurti identificou, no exudato da pele do *Xenopus laevis*, uma rã sul-africana muito utilizada como modelo para o estudo de peptídios biologicamente ativos, uma nova enzima de degradação desses peptídios, a PHIE ( Peptide Hormone Inactivating Enzyme ). Essa enzima, purificada até a homogeneidade, apresenta um peso molecular de 110 KDa, um pH ótimo de 7,5 e um perfil de inibição que indica tratar-se de uma metalo-endopeptidase. Essa endopeptidase hidrolisa seletivamente as ligações Xaa-Phe, Xaa-Leu e Xaa-Ileu ( Xaa= Ser, Phe, Tir, His, Gly ) de diversos hormônio-peptídios tais como o ANF, a substância P, a angiotensina II, a bradicinina, a somatostatina, as neuromedinas B e C e a litorina. O valor do Km para esses peptídios é da ordem de micromoles, valor este que sugere uma degradação fisiológica dos mesmos pela PHIE ( Carvalho et al.,1992; Joudiou et al., 1993 ). Essa nova endopeptidase é uma enzima distinta da NEP, já que não é inibida pelo fosforamidom e tiorfan em concentrações de ordem micromolar.

A descoberta da PHIE revestiu-se de grande importância quando demonstrou-se que uma endopeptidase muito semelhante é secretada por células de neuroblastoma humano ( NB-OK1 ) em cultura ( Carvalho et al., 1992), as quais apresentam receptores para o ANF em sua superfície. Esta enzima também foi encontrada em vários outros tipos de neuroblastomas e melanomas humanos em cultura ( Carvalho et al., 1993). Portanto, em tecidos tumorais humanos de origem neuroectodérmica foi encontrado uma enzima, também com características de metalo-endopeptidase, importante candidata à degradação fisiológica de vários neuropeptídios e distinta da NEP.



### 1.3. OBJETIVOS

#### a) GERAL:

- Demonstrar a existência dessa nova metalo-endopeptidase em tecidos normais de mamíferos, tendo sido escolhido como objeto de estudo o cérebro humano.

#### b) ESPECIFICOS:

- Purificar até a homogeneidade essa enzima;
- Caracterizá-la através da determinação do seu pH ótimo, peso molecular e espectro de inibição;
- Demonstrar a degradação " in vitro " de alguns hormônio-peptídios por essa enzima;
- Comparar a enzima do cérebro humano com as outras metalo-enzimas.

**MATERIAL E  
MÉTODOS**

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. MATERIAL

#### 2.1.1. ORIGEM DA ENZIMA

Cérebro humano congelado a  $-18^{\circ}\text{C}$  durante 72h, proveniente do Serviço de Verificação de Óbitos do Departamento de Patologia e Medicina Legal da Universidade Federal do Ceará, após um tempo "*post mortem*" de aproximadamente 6 horas. Trata-se de tecido nervoso não tumoral e sem patologia aparente, uma vez que a "*causa mortis*" do paciente foi infarto agudo do miocárdio.

#### 2.1.2. PEPTÍDIOS UTILIZADOS

Substância P - Sigma Chemical Co. , USA

Bradicinina - Sigma Chemical Co., USA

Fator Natriurético Atrial (ANF(5-28)) - Sigma Chemical Co.,USA

Angiotensina II - Sigma Chemical Co., USA

$\beta$  - amilóide (1-40) - Sigma Chemical Co., USA

Abz-Leu-encefalina-Arg-EDDnp : substrato fluorescente sintético cedido pelo professor Antônio Juliano, da Escola Paulista de Medicina.

#### 2.1.3. REAGENTES DIVERSOS

Acido acético P.A. - E. Merck, Darmsdatt

Acido clorídrico P.A. - Merck, Ind. brasileira

Acido etilenediaminotetraacético (EDTA)- Sigma Chemical Co.

Acido tricloroacético P.A. - E. Merck, Darmsdatt

Acrilamida - Fluxa A.G. Buchs S.G.

Albumina sérica bovina - Miles Laboratories Inc. USA

Bacitracina- Sigma Chemical Co., USA

Benzamidina- Sigma Chemical Co., USA

Blue Dextran - Pharmacia Fine Chemicals,Upalla, Suécia

Captopril - Sigma Chemical Co.,USA

Carbonato de calcio - Reagen, Ind. brasileira

DEAE-Trissacryl ( DE-52 ) microgranular, lote 245243  
Whatman, England  
Ditiotreitol (DTT), Cálbio Chemicals, San Diego,  
Califórnia, USA  
Dodecil sulfato de sódio (SDS) - Sigma Chemical Co., USA  
Etanol P.A. - Merck, Ind. brasileira  
Folin ciocalteus phenol reagents - E. Merck, Darmsdatt  
Fosforamidon- Sigma Chemical Co., USA  
Glicerol - Carlo Erba, Brasil  
Membranas para diálise - Union Carbide Cooperation, USA  
Metanol P.A. - Merck, Ind. brasileira  
N-etilmaleimida (NEM) - Sigma Chemical Co., USA  
N-n-metileno bis acrilamida - Fluxa A.G. Buchs S.G.  
N-tosil-L-fenilalanine clorometil cetona (TPCK) - Sigma  
Chemical Co., USA  
O-fenantrolina- Sigma Chemical Co. , USA  
Phenilmetanosulfonil fluoride (PMSF)- Sigma Chemical Co.  
Sephacryl S-200 - Pharmacia Fine Chemicals, Suecia  
Silicone (pasta) Toshiba TKS 50, Japão  
Soybean trypsin inhibitor (STI) - Sigma Chemical Co., USA  
Tosilarginilmetil ester (TAME)- Sigma Chemical Co., USA

#### 2.1.4. APARELHOS

Bomba peristáltica - Technicon Inst. Corporation, USA  
Centrífuga refrigerada - Beckmann, modelo J-212C, Beckmann  
Instruments, USA  
Centrífuga elcelsa Baby modelo 206 - FANEM  
Coluna de vidro para cromatografia de DEAE-Trissacryl,  
hydroxyapatita e Sephacryl S-200  
Coluna C<sub>18</sub>- LC Shim-pack CLC-ODS  
Câmara fria  
Espectrofotômetro modelo G-2400 - Beckmann Instruments  
Munchen, Alemanha  
Espectrofluorômetro modelo F-2000 Hitashi  
Cromatógrafo Líquido de Alta Pressão ( HPLC ) - modelo  
SCL-10A Shimadzu , Japão

## 2.2. MÉTODOS

### 2.2.1. EXTRAÇÃO ENZIMÁTICA

Um cérebro humano normal ( não tumoral e sem patologia aparente ) pesando aproximadamente 1100 gramas , obtido com um tempo "post mortem" de 6 horas, foi homogenizado em água (1:4 p/v) a 4°C, com o objetivo de provocar uma citólise maciça.

Ao homogenato foi adicionado tampão Tris-HCl 0,5 M, para uma concentração final de 50mM. Em seguida, o mesmo foi centrifugado sob refrigeração a 25.000 x G durante 1 hora à temperatura de 0-4°C. Após a centrifugação, obteve-se uma fração representada pelo precipitado ( membranas celulares, núcleos e organelas maiores, além de qualquer célula ainda íntegra ) e outra correspondente ao sobrenadante. O precipitado foi descartado e o sobrenadante utilizado para a purificação enzimática.

### 2.2.2. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

A determinação da atividade enzimática foi realizada utilizando-se um substrato fluorogênico com apagamento intramolecular. O princípio da metodologia empregada foi muito bem explicado por Yaron e colaboradores (1979). Resumindo, utiliza-se uma molécula que apresenta numa das extremidades um grupamento fluorescente (o-aminobenzoil, Abz) e na outra um grupamento apagador de fluorescência (N-(2,4-dinitrofenil)etileno-diamino, EDDnp). Enquanto a molécula estiver intacta não emitirá fluorescência significativa; porém após qualquer ruptura entre os aminoácidos, com a separação do Abz e do EDDnp, o primeiro passará a emitir uma fluorescência pronunciada, que será captada pelo espectrofotômetro nas seguintes condições: excitação - 318 nm e emissão - 419 nm.

Para o nosso estudo, o substrato utilizado foi o Abz-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-EDDnp (Abz-Leu-encefalina-ARG-EDDnp), sintetizado e cedido pelo professor Luiz Juliano, da Escola Paulista de Medicina.

### 2.2.3. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS

A concentração de proteínas nas frações enzimáticas foi determinada pelo método de Lowry (1951) modificado, utilizando como padrão a albumina sérica bovina (1mg/ml).

O perfil de proteínas das frações obtidas durante as cromatografias foi realizado através da absorção de luz ultravioleta, no comprimento de onda de 280 nm.

### 2.2.4. DIALISE DAS AMOSTRAS

O volume da fração sobrenadante foi submetido à diálise com três trocas do tampão Tris-HCl 50mM, a cada 12 horas (1:5, v/v).

### 2.2.5. CROMATOGRAFIA EM COLUNA DE DEAE-TRISSACRYL

De acordo com a metodologia utilizada por Carvalho e colaboradores (1992), o sobrenadante dialisado (1000ml) foi aplicado numa coluna de DEAE-Trissacryl (30x2,6cm), equilibrada com tampão Tris-HCl 50mM, pH 7,5, a um fluxo de 90 ml/h e a uma temperatura de 4°C. Após a aplicação da amostra, a coluna foi lavada com o tampão de equilíbrio e foram desenvolvidos gradientes do tampão contendo NaCl nas seguintes concentrações: 50mM, 100mM, 150mM, 300mM, e 1M. As frações 19 a 52, correspondentes à eluição com 50mM, foram reunidas e constituíram o pool principal.

## 2.2.6. CROMATOGRAFIA EM COLUNA DE HIDROXIAPATITA

O pool resultante do DEAE-Trissacryl foi concentrado à vácuo sob pressão reduzida, a uma temperatura de 4°C, até um volume final de 60 ml, dialisado contra tampão fosfato de sódio 10 mM, pH 7,5 (1:5, v/v) e aplicado na coluna de hidroxiapatita (11 x 2,6cm), equilibrada com o mesmo tampão da diálise. A coluna foi eluída com o tampão de equilíbrio, seguido por um gradiente linear de 10 a 400 mM do mesmo tampão a um fluxo de 60 ml/h e uma temperatura de 4°C. O pool resultante principal foi constituído pelas frações 1 a 18, cujas proteínas não foram retidas pela resina.

## 2.2.7. CROMATOGRAFIA EM COLUNA DE SEPHACRYL S-200

O pool resultante da hidroxiapatita foi concentrado à vácuo sob pressão reduzida, até um volume final de 5ml, dialisado contra tampão Tris-HCl 50mM, pH 7,5 (1:5, v/v) e aplicado numa coluna de sephacryl S-200 (160 x 1,9cm), equilibrada com o mesmo tampão da diálise. A coluna foi eluída com o tampão de equilíbrio a um fluxo de 60 ml/h à 4°C. O pool principal foi formado pelas frações 1 a 21.

## 2.2.8. PERFIL DE INIBIÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA PURIFICADA

A atividade enzimática foi avaliada diante do substrato Abz-Leu-encefalina-Arg-EDDnp na presença de um único inibidor de cada vez. Foram testados inibidores das diversas classes de proteases, todos em concentrações da ordem de micromoles, a saber: o-fenantrolina, EDTA (ácido etilenodiaminotetraacético) e DTT (ditiotreitól) para as metalopeptidases, PCMPS (ácido P-(cloromercúri)-benzeno sulfônico) e NEM (N-etilmaleimida) para as cisteínas, PMSF (fenilmetanosulfonil fluoride), STI (soibean inibidor de tripsina) e TPCK (N-tosil-L-fenilalanina clorometil cetona) para

as serinas, e pepstatina para as carboxipeptidases. Utilizamos ainda o fosforamidom e o captopril como inibidores da NEP e da ACE respectivamente, além da benzamidina, TAME (tosilarginilmetil ester) e bacitracina como inespecíficos. O inibidor era inicialmente pré-incubado com a enzima durante 30 minutos a 37°C e posteriormente era adicionado o substrato Abz-Leu-encefalina-Arg-EDDnp e realizada a leitura da fluorescência no espectrofluorômetro (excitação-318nm, emissão-419nm). Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

### **2.2.9. ELETROFORESE EM PLACA DE GEL DE POLIACRILAMIDA NA AUSENCIA E PRESENÇA DE DODECIL SULFATO DE SODIO (S.D.S.)**

A eletroforese foi realizada segundo o método de Maizel (1965) modificado para proteínas nativas. Como a metalopeptidase cerebral humana apresentava indícios de um peso molecular elevado (sephacryl S-200), optamos por um gel a 6%, que permitiria mais facilmente a entrada das proteínas.

As soluções utilizadas na preparação do gel foram guardadas em frascos escuros a 4°C e desprezadas após 6 meses de seu preparo, exceção feita a solução de persulfato de amônio que deve ser preparada na hora.

O processo eletroforético foi desenvolvido em câmara fria a uma temperatura de 2 a 4°C, com uma corrente de 12mA. Após uma pré-corrida de 30 minutos, duas frações enzimáticas foram aplicadas em poços paralelos e, ao final da migração, uma das colunas foi corada pelo método da prata (Bio-Rad Silver Stain), como descrito por Merril e colaboradores (1984), enquanto a outra foi cortada em pedaços de aproximadamente 2mm de espessura. Cada pedaço foi então incubado com o substrato Abz-Leu-encefalina-Arg-EDDnp em 150µl do tampão Tris-HCl 50mM, pH 7,5, a 37°C durante 12 horas quando então era realizada a leitura da fluorescência de cada incubação para detectarmos em que altura do gel estava a atividade enzimática.



Para a eletroforese com SDS também foi utilizado uma placa de gel a 6% de poliacrilamida. Esta eletroforese foi realizada de acordo com a metodologia de Weber & Osbon (1969) e de Davies & Stark (1970).

As amostras foram diluídas na proporção de 1:1 (v/v) com tampão fosfato de sódio, pH 7,0, contendo 2% (p/v) de SDS e 2% (p/v) de  $\beta$ -mercaptoetanol. A eletroforese foi desenvolvida com uma corrente de 16 mA e a uma temperatura de 4°C. Como padrão de pesos moleculares utilizamos os kits MW-SDS-70 e MW-SDS-200 da Sigma Chemical Company. Para a coloração o método de prata (Bio-Rad Silver Stain) também foi empregado.

#### 2.2.10. HIDROLISE DE ALGUNS PEPTÍDIOS PELA METALO-ENDOPEPTIDASE CEREBRAL HUMANA

Foram realizados diversos experimentos para demonstrar a hidrólise dos peptídios substância P, bradicinina, fator natriurético atrial (ANF), angiotensina II e b-amilóide (1-40), nas seguintes condições: 5 a 15  $\mu$ l de uma solução à 2% do substrato era incubado com 1 a 10  $\mu$ l da enzima purificada ( resultante da cromatografia em coluna de sephacryl S-200) em 5 a 15  $\mu$ l do tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, durante 15 minutos a 37°C. Após esse tempo, a reação era interrompida por desnaturação das proteínas ( aquecimento à 80°C durante 10 min.) e centrifugado a 3000 x G por 10 min. O sobrenadante era então injetado no HPLC com uma coluna C<sub>18</sub> ( LC Shim-pack CLC-ODS, 15 x 0,6 cm ) acoplada, e eluído por um gradiente de 0 a 50% de acetonitrila em 30 a 45 min., com um tampão de trietilamina e ácido acético, pH 5,3, e a um débito de 1ml/min. A detecção era feita a 214 nm espectrofotometricamente.

## RESULTADOS

### 3. RESULTADOS

#### 3.1. CROMATOGRAFIA DE TROCA IONICA EM COLUNA DE DEAE-TRISSACRYL DA FRAÇÃO SOBRENADANTE DO HOMOGENATO DE CÉREBRO HUMANO.

A fig. 2 apresenta o perfil da cromatografia em coluna de DEAE-TRISSACRYL da fração sobrenadante do cérebro humano, submetida anteriormente à diálise em tampão Tris-HCl 0,05N, pH 7,5 e efetuada por aumentos discretos de força iônica do tampão eluente ( Carvalho, 1981 e Carvalho & Carmago, 1981 )

Neste cromatograma observamos dois tipos de traçados :

a) O traçado com bolinhas pretas representa a leitura de proteínas no espectrofotômetro em 280 nm. Os picos a, b, c e d representam as proteínas que foram eluídas com tampão Tris-HCl, pH 7,5, contendo 50mM, 100mM, 150mM e 300mM de NaCl respectivamente.

b) O traçado com bolinhas brancas representa a atividade enzimática. Notam-se dois picos principais sendo a atividade predominante coincidente com as proteínas eluídas com 50mM de NaCl.

As frações com maior atividade enzimática foram reunidas ( 363ml ) e concentradas sob pressão reduzida ( 60ml ).

#### 3.2. CROMATOGRAFIA EM COLUNA DE HIDROXIAPATITA DO POOL RESULTANTE DO DEAE-TRISSACRYL.

A fig. 3 mostra o perfil da cromatografia em coluna de Hidroxiapatita, a qual retém as proteínas dependendo do número de radicais fosfato nelas contidos. O gráfico contínuo traduz a leitura de proteínas no espectrofotômetro a 280nm. Observam-se dois picos que representam as proteínas que atravessaram livremente a coluna ( pico I ) e as que ficaram retidas, e que foram eluídas posteriormente através de um gradiente linear de 10 a 400mM do tampão Fosfato de Sódio, pH 7,5. A atividade enzimática ( traço com

## DEAE-TRISSACRYL

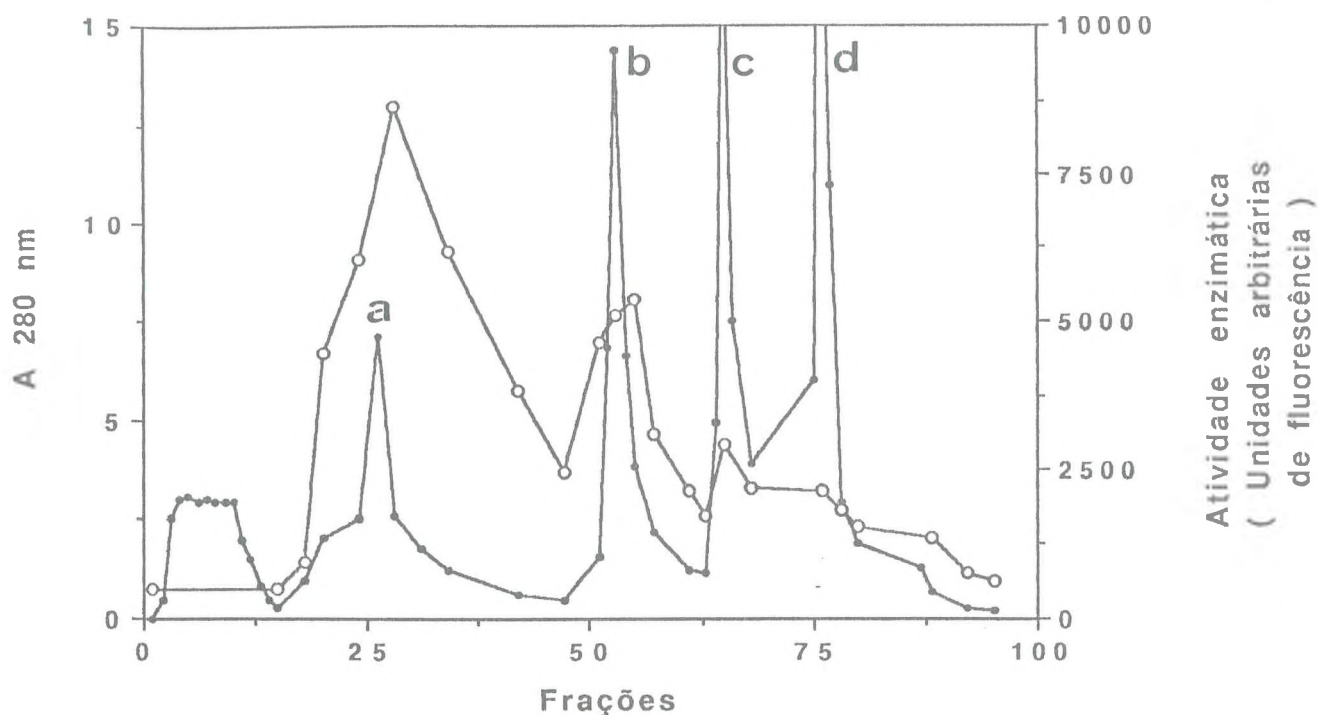


Fig. 2 - Cromatografia da metalo-endopeptidase da fração solúvel do cérebro humano numa coluna de DEAE-Trissacryl. A fração sobrenadante obtida do homogenato do cérebro humano foi dialisada contra tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, e foram aplicados 1000 ml numa coluna de DEAE-Trissacryl (30 x 2,6cm) equilibrada com o mesmo tampão, com um fluxo de 90 ml/h. Após aplicação da amostra, a coluna foi lavada com o tampão de equilíbrio e foram desenvolvidos gradientes do tampão contendo NaCl nas seguintes concentrações: 50 mM, 100 mM, 150 mM, 300 mM e 1000 mM. As frações 19 a 52 foram reunidas e constituíram o pool principal (363ml).

(—●—) Absorbância em 280 nm

(—○—) Atividade enzimática ( Unidades arbitrárias de fluorescência)

## HIDROXIAPATITA

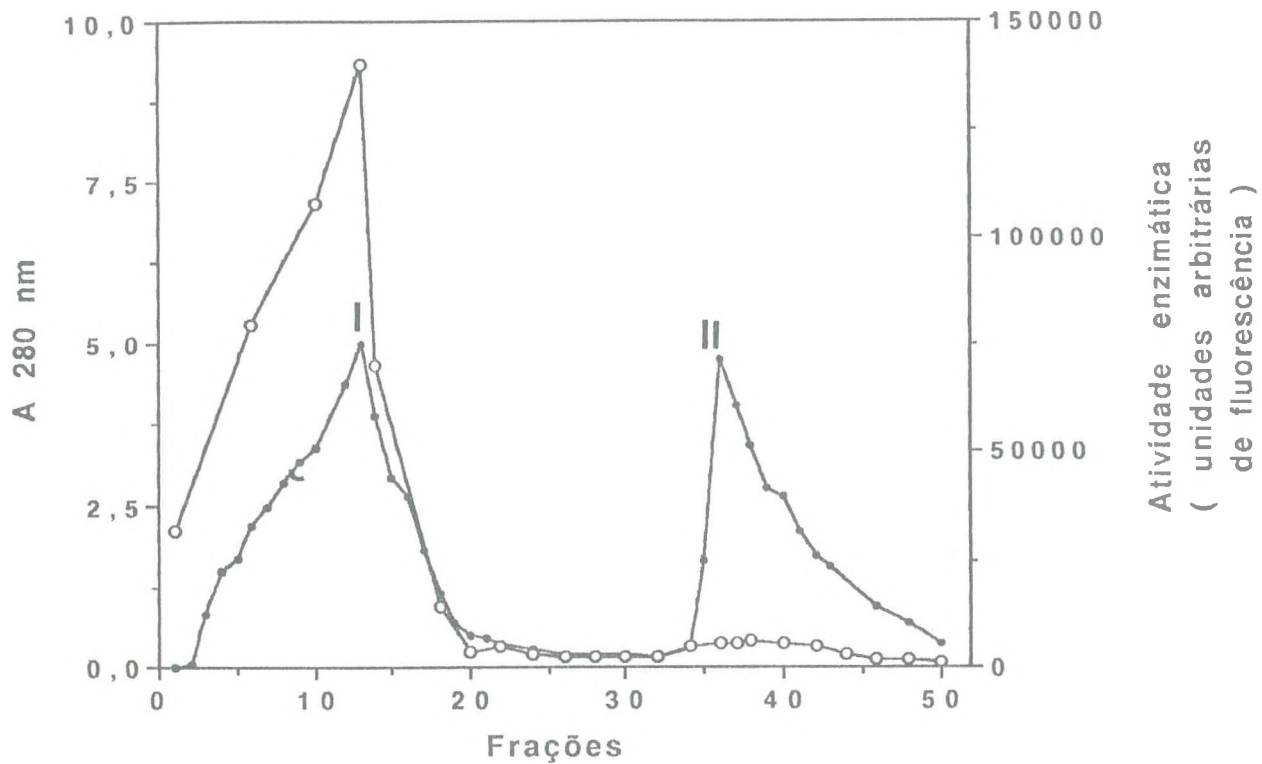


Fig.3 - Cromatografia da metalo-endopeptidase do cérebro humano em coluna de Hidroxiapatita. O pool resultante do DEAE-Trissacryl foi concentrado a um volume final de 60 ml, dialisado e aplicado na coluna de hidroxiapatita (11x2,6cm) equilibrada com um tampão fosfato de sódio 10mM, pH 7,5. A coluna foi eluída com o tampão de equilíbrio, seguido por um gradiente linear de 10 a 400 mM do tampão fosfato de sódio, pH 7,5, a um fluxo de 60 ml/h e a uma temperatura de 4°C. O pool principal (69ml) foi formado pelas frações 1 a 18.

(—●—) Absorbância em 280 nm.

(—○—) Atividade enzimática ( Unidades arbitrárias de fluorescência).

bolinhas brancas) coincidiu com as proteínas não retidas pela coluna. As frações 1 a 18 constituíram o pool principal ( 69ml ) que foi concentrado para 6ml.

### **3.3. CROMATOGRAFIA EM COLUNA DE SEPHACRYL S-200 DO POOL RESULTANTE DA HIDROXIAPATITA**

A fig.4 mostra o cromatograma em coluna de Sephacryl S-200, a qual separa as proteínas de acordo com o seu peso molecular, deixando passar livremente as de elevado peso ( $> \text{ou} = 200.000$  Daltons) e retendo as de menor peso.

Nele foi observado o seguinte:

a) A maior parte das proteínas da amostra aplicada na coluna foi adsorvida pela resina. Logo a minoria que foi eluída inicialmente deve possuir um bom grau de pureza.

b) O pico da atividade enzimática coincide com as primeiras proteínas eluídas da coluna, significando que se trata de uma enzima de alto peso molecular ( $> \text{ou} = 200.000$  Daltons ).

As frações 1 a 21 constituíram o pool principal (11ml) que foi concentrado para um volume final de 3ml.

### **3.4. BALANÇO DA PURIFICAÇÃO DA METALO-ENDOPEPTIDASE ISOLADA DO CÉREBRO HUMANO.**

A tab.2 mostra o balanço de toda a purificação realizada com o cérebro humano. A completa purificação da enzima foi obtida através de quatro etapas a partir da homogeneização do tecido, com um grau final de purificação de 1756 e uma percentagem de recuperação de 16%.

## SEPHACRYL S-200

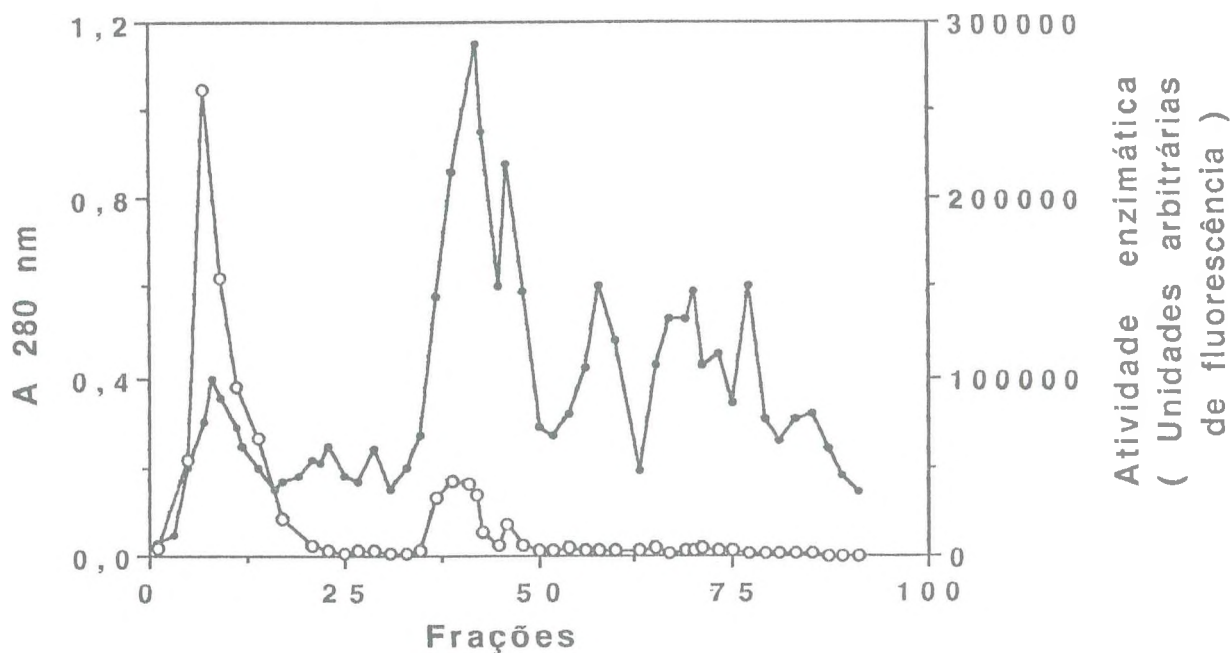


Fig.4- Cromatografia da metalo-endopeptidase da fração solúvel do cérebro humano numa coluna de Sephacryl S-200. O pool obtido da coluna de Hidroxiapatita foi concentrado a um volume final de 5ml e aplicado numa coluna de Sephacryl S-200 ( 160 x 1,9cm ), equilibrada com tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,5. A coluna foi eluída com o tampão de equilíbrio com um fluxo de 60 ml/h e a uma temperatura de 4°C. O pool principal foi constituído pelas frações 1 a 21 (11ml).

(—●—) Absorbância a 280 nm.

(—○—) Atividade enzimática (Unidades arbitrárias de fluorescência )

Tabela 2- Purificação da metalo-endopeptidase da fração solúvel do cérebro humano.

Etapa	Proteína Total	Atividade Total mg	Atividade Específica nmoles/h	Purificação nmoles/h/mg	Recuperação %
HOMOGENATO	11300	63906	5,6	1	100
SOBRENADANTE	6690	51426	7,7	1,4	80
DEAE-TRISSACRIL	237	30855	130	23,2	48
HIDROXIAPATITA	8	18485	2310	412,5	29
SEPHACRIL S-200	0,1	10057	10057	1796	16

A atividade enzimática foi avaliada em alíquotas de cada passo de purificação; o substrato utilizado foi o Abz-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-EDDnp. A atividade foi expressa em nmoles do substrato clivado por hora.



### **3.5. ELETROFORESE EM PLACA DE GEL DE POLIACRILAMIDA DA METALO-ENDOPEPTIDASE DA FRAÇÃO SOLUVEL DO CÉREBRO HUMANO.**

A fig.5 apresenta as eletroforeses em placa de gel de poliacrilamida com e sem Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) da metalo-endopeptidase citosólica do cérebro humano purificada.

Na eletroforese sem SDS foi identificada uma única banda, de contornos não bem delimitados, que coincide com o pico de atividade enzimática.

Na eletroforese com SDS apareceram duas bandas bastante nítidas com pesos moleculares em torno de 100 KDa além de duas outras na região de baixo peso (peso molecular em torno de 20 KDa).

### **3.6. DETERMINAÇÃO DO pH ÓTIMO DA METALO-ENDOPEPTIDASE DA FRAÇÃO SOLUVEL DO CÉREBRO HUMANO.**

A fig.6 representa a variação da atividade enzimática, expressa em unidades que traduzem a fluorescência emitida, em função do pH do meio de incubação, para a endopeptidase purificada do cérebro humano. A faixa de pH compreendida entre 6,25 e 8,1 foi obtida com tampão Fosfato de Sódio. O valor do pH ótimo para a atividade enzimática purificada ficou dentro da neutralidade (entre 7,3 e 7,7 ).

### **3.7. PERFIL DE INIBIÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA PURIFICADA DO CÉREBRO HUMANO.**

A tab.3 apresenta o efeito dos inibidores de proteases sobre a atividade da endopeptidase do cérebro humano isolada. Para este experimento foi utilizado o substrato Abz-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-EDDnp, que contém ao mesmo tempo um grupamento fluorescente e um outro apagador na mesma molécula (ver métodos).

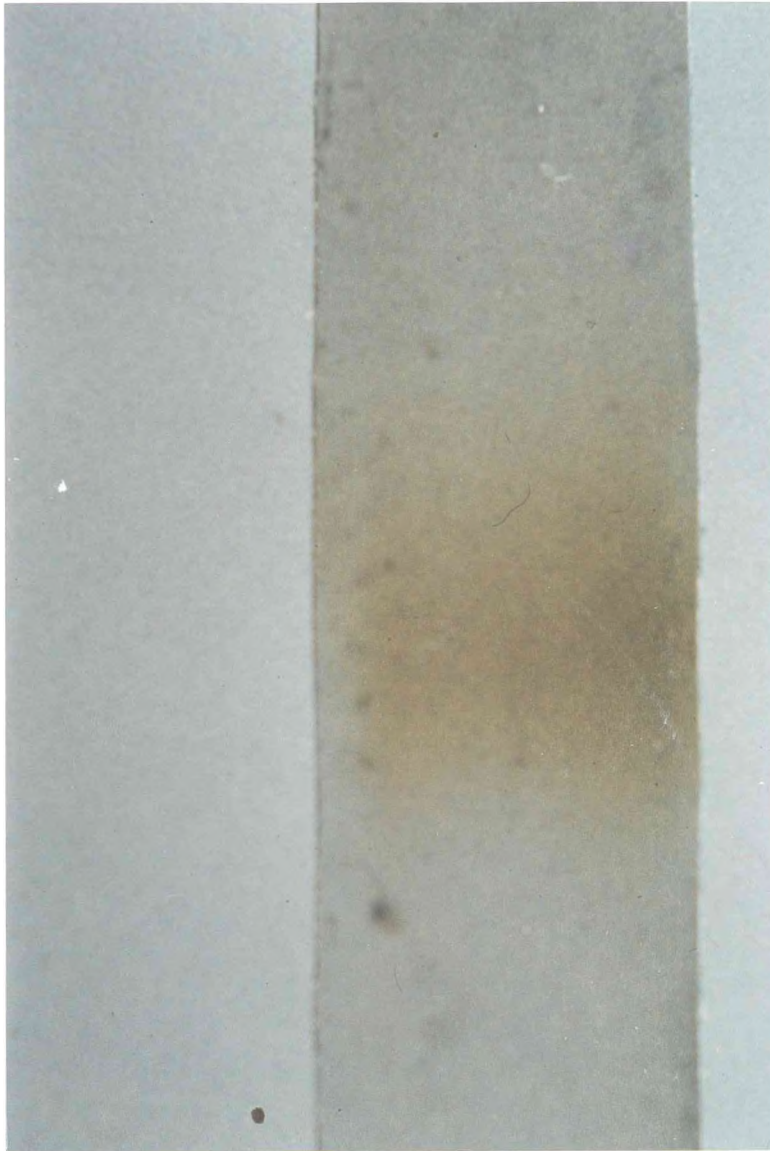


Fig. 5A - Eletroforese em placa de gel de poliacrilamida à 6% da metalo-endopeptidase cerebral humana purificada, corada pelo método de prata ( Bio-Rad Silver Stain ) na ausência de Dodecil Sulfato de Sódio ( SDS ).

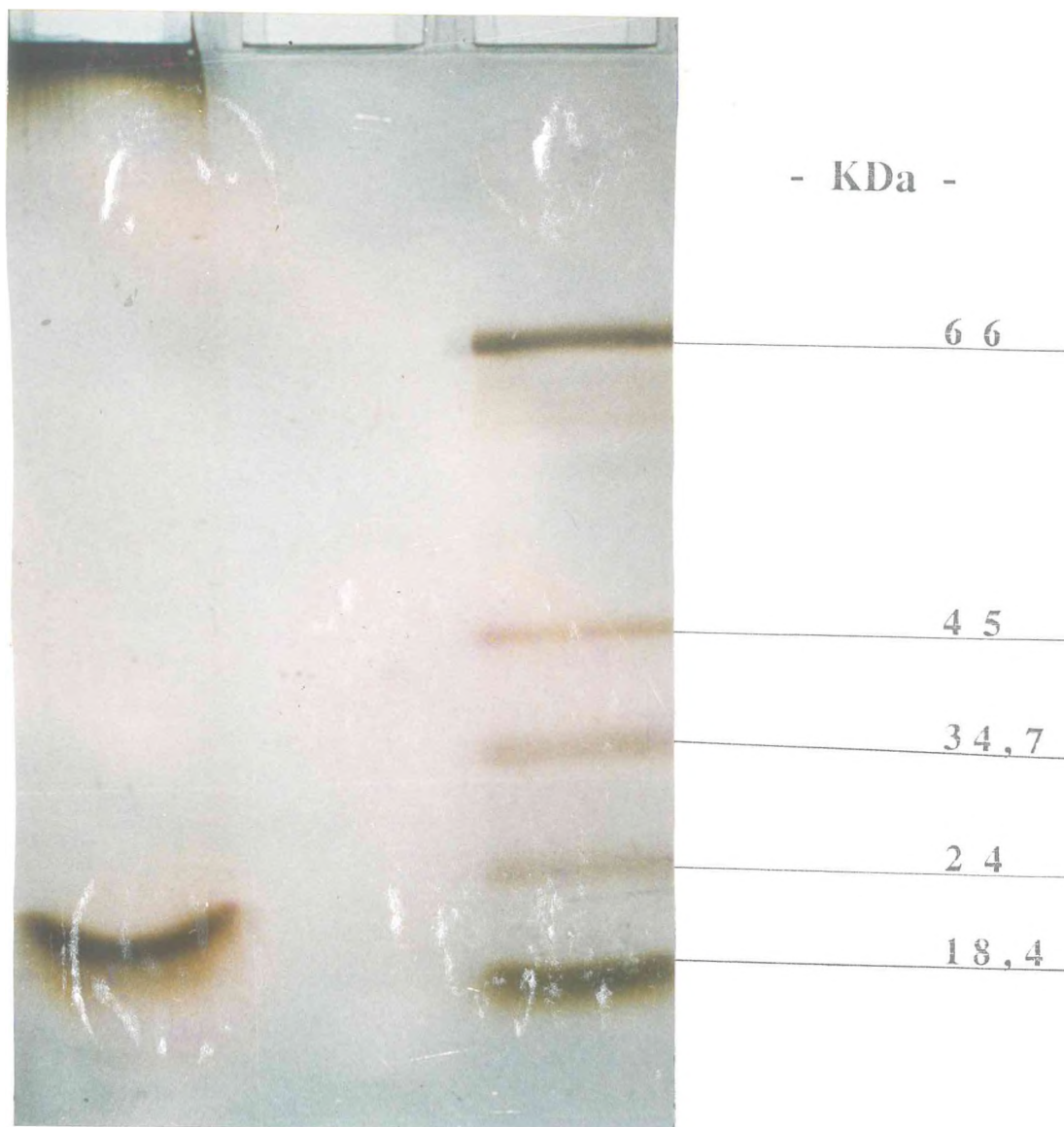


Fig. 5B - Eletroforese em placa de gel de poliacrilamida à 6% da metalo-endopeptidase cerebral humana purificada, corada pelo método de prata ( Bio-Rad Silver Stain ) na presença de Dodecil Sulfato de Sódio ( SDS ).

Na coluna à esquerda visualizamos os padrões de pesos moleculares ( Kit MW-SDS-70 da Sigma Chemical Co.); de cima para baixo: albumina bovina ( 66 KDa ), ovalbumina ( 45 KDa ), pepsina ( 34,7 KDa ), tripsinogênio ( 24 KDa ) e  $\beta$ -lactoglobulina ( 18,4 KDa ).

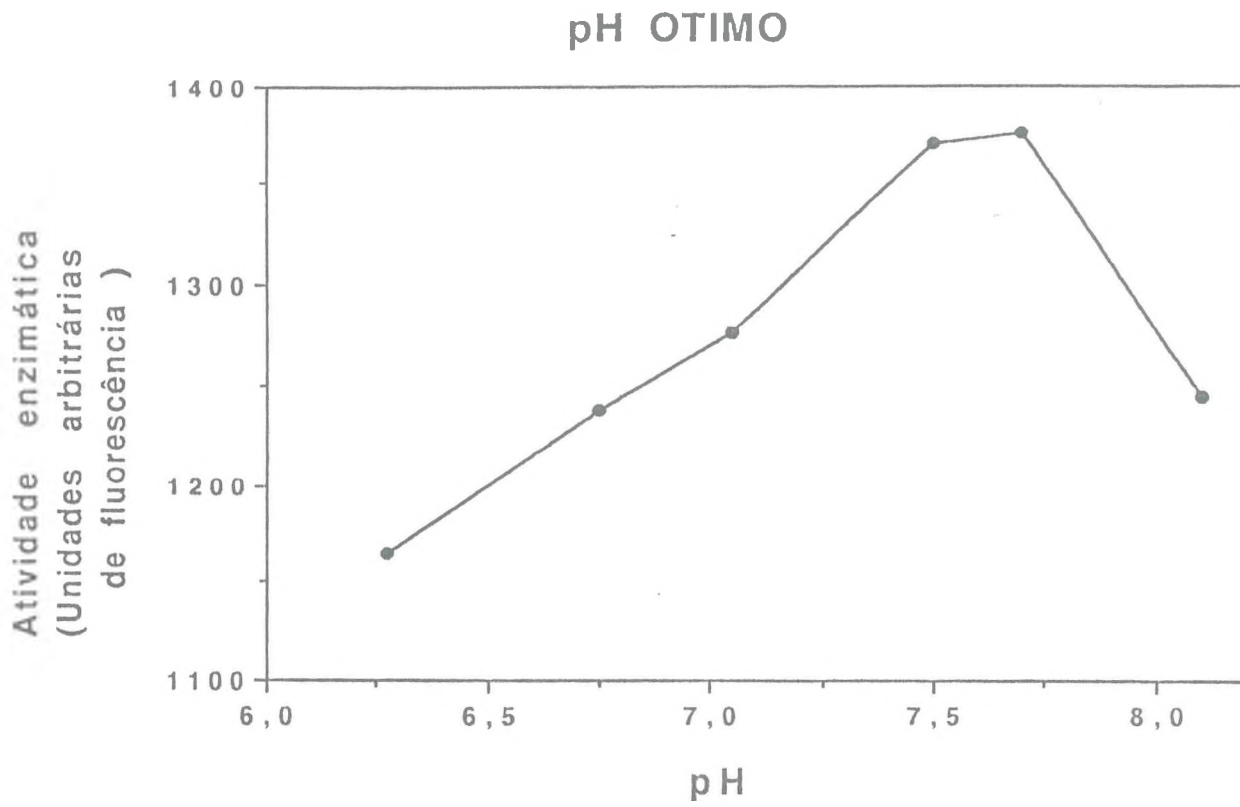


Fig.6- Efeito do pH na atividade da enzima purificada; o tampão utilizado foi o Fosfato de Sódio 0,1M ( pH 6,25-8,1 )

A atividade enzimática foi significativamente inibida pela o-fenantrolina, EDTA e DTT em concentrações da ordem de micromoles ( 100, 80 e 100% de inibição respectivamente ) sugerindo fortemente um caráter de metalo-endopeptidase à enzima. Por outro lado, inibidores clássicos da NEP ou ACE como o fosforamidom e o captopril foram pouco eficientes ou ineficientes em provocar inibição da enzima. Os inibidores de cisteínas, serinas ou carboxipeptidases também não foram eficazes em provocar inibição nessas concentrações.

### 3.8. HIDROLISE DE ALGUNS PEPTÍDIOS PELA METALO-ENDOPEPTIDASE CEREBRAL HUMANA PURIFICADA

A fig.7 apresenta a sequência de aminoácidos dos peptídeos utilizados como substratos para a enzima purificada do cérebro humano normal. Observamos que a substância P apresentou dois pontos de clivagem, nas ligações Gly<sup>9</sup>-Leu<sup>10</sup> e Phe<sup>7</sup>-Phe<sup>8</sup>, sendo a primeira de um modo majoritário. A bradicinina foi hidrolisada na ligação Gly<sup>4</sup>-Phe<sup>5</sup>, a angiotensina II na Tyr<sup>4</sup>-Ile<sup>5</sup> e o ANF(5-28) na Ser<sup>25</sup>-Phe<sup>26</sup>.

As figuras 8, 9 e 10 são exemplos de perfis de eluição destes peptídeos e seus produtos no HPLC.

O peptídeo  $\beta$ -amilóide (1-40) também foi testado como substrato para a metalo-endopeptidase cerebral humana e apresentou mais de um local de clivagem.

Tabela 3- Efeitos dos inibidores de proteases sobre a atividade da endopeptidase de cérebro humano.

Classe das peptidases	Inibidores	Conc., mM	Inibição %
Metalo	o-Fenantrolina	1	100
	EDTA	1	80
	DTT	10	100
Cisteína	PCMPS	1	0
	NEM	1	20
Serina	PMSF	1	10
	STI	1	0
	TPCK	1	30
Carboxil	Pepstatina	0.16	15
NEP	Fosforamidom	0.01	18
ACE	Captopril	1	0
Inespecífico	Benzamidina	1	90
		0.1	5
	TAME	1	65
	Bacitracina	1	18

A atividade enzimática foi avaliada com o substrato Abz-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-EDDnp na presença de um único inibidor de cada vez. Todos os ensaios foram realizados no mínimo duas vezes. PCMPS, ácido p- ( chloromercurio ) benzeno sulfônico ; NEM, N-ethylmaleimida ; PMSF, fenilmetanosulfonil fluoride; STI, soybean inibidor de tripsina ; TPCK, N-tosil-L-fenilalanina clorometil cetona; TAME, tosilarginilmetil ester.



Fig.7 - Sequência de aminoácidos dos peptídeos usados como substratos para a metalo-endopeptidase cerebral humana. As setas largas indicam o local de clivagem majoritário observado, enquanto as finas indicam locais secundários de ruptura.

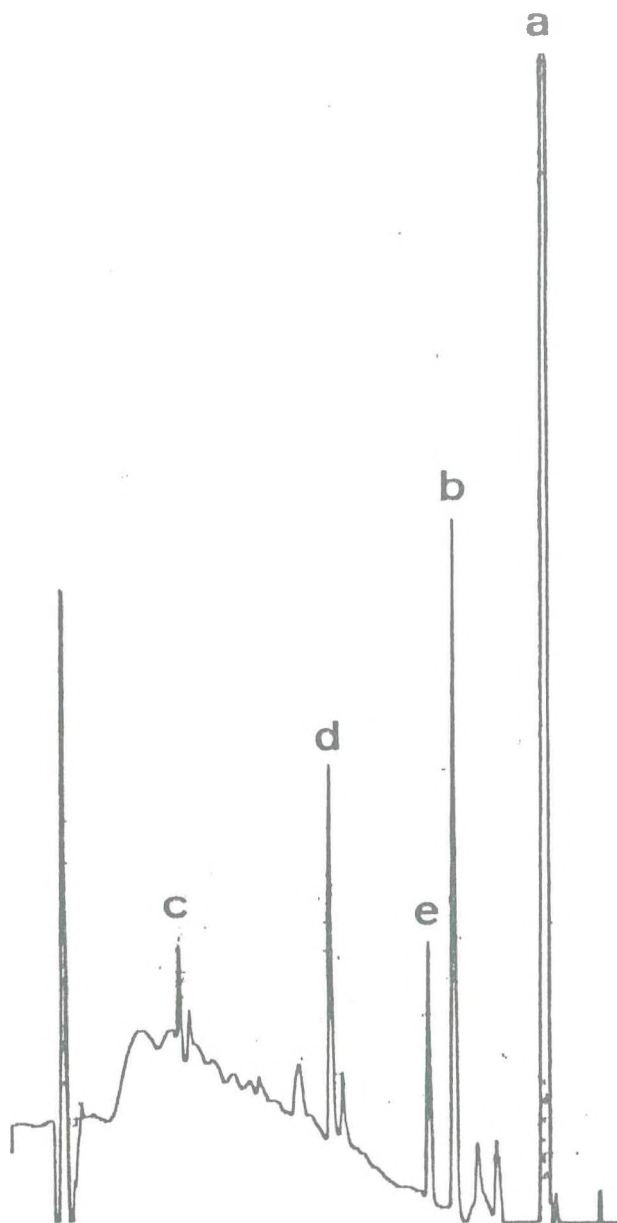


Fig.8- Perfil de eluição da substância P e seus produtos após a ação da metalo-endopeptidase cerebral humana.

Sete  $\mu\text{l}$  de uma solução da substância P a 2% foram incubados com 1  $\mu\text{l}$  da enzima purificada e 16  $\mu\text{l}$  do tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, durante 15 min. a 37°C. A reação foi interrompida por desnaturação ( fervura por 10 min. a 80°C ). Após a centrifugação, o sobrenadante foi injetado no HPLC. Os peptídios foram eluídos por um gradiente de 0 a 50% de acetonitrila em 45 min., com um tampão de trietilamina e ácido acético, pH 5,3 e a um débito de 1 ml/min. Os produtos foram detectados à 214 nm.

- a- substância P (RPKPQNFFGLM(NH<sub>2</sub>))
- b- fragmento RPKPQNFFG
- c- fragmento LM(NH<sub>2</sub>)
- d- fragmento RPKPQNF
- e- fragmento FGLM(NH<sub>2</sub>)



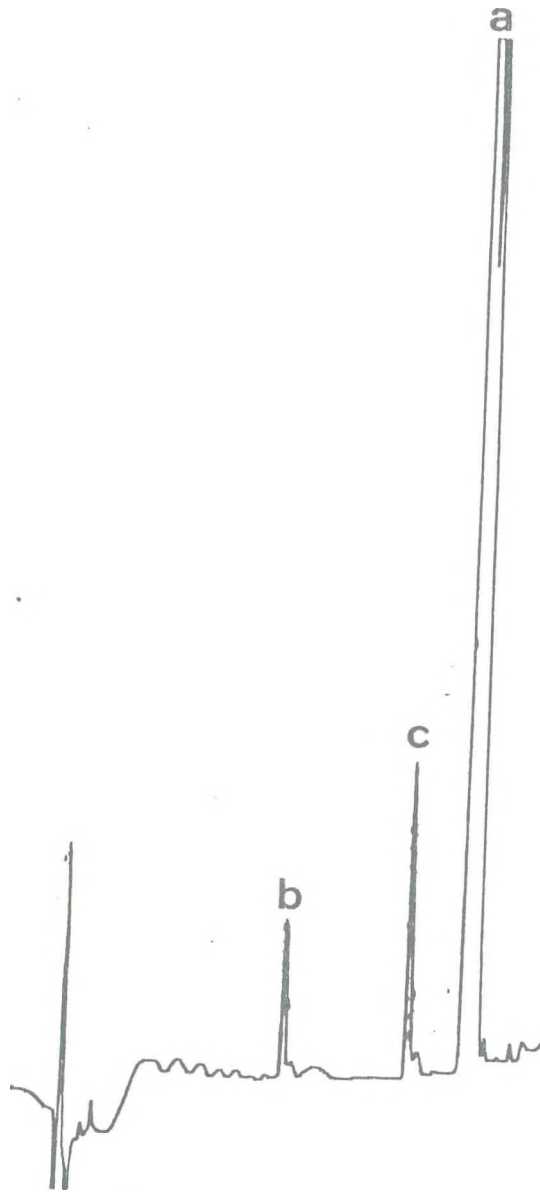


Fig.9- Perfil de eluição da angiotensina II e seus produtos após a ação da metalo-endopeptidase cerebral humana.

Quinze  $\mu\text{l}$  de uma solução de angiotensina II a 2% foram incubados com 10  $\mu\text{l}$  da enzima purificada e 5  $\mu\text{l}$  do tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, durante 15 min. a 37°C. A reação foi interrompida por desnaturação ( fervura por 10 min. a 80°C ). Após a centrifugação, o sobrenadante foi injetado no HPLC. Os peptídeos foram eluídos por um gradiente de 0 a 50% de acetonitrila em 35 min., com um tampão de trietilamina e ácido acético, pH 5,3 e a um débito de 1 ml/min. Os produtos foram detectados à 214 nm.

- a- angiotensina II ( DRVYIHPF )
- b- fragmento DRVY
- c- fragmento IHPF

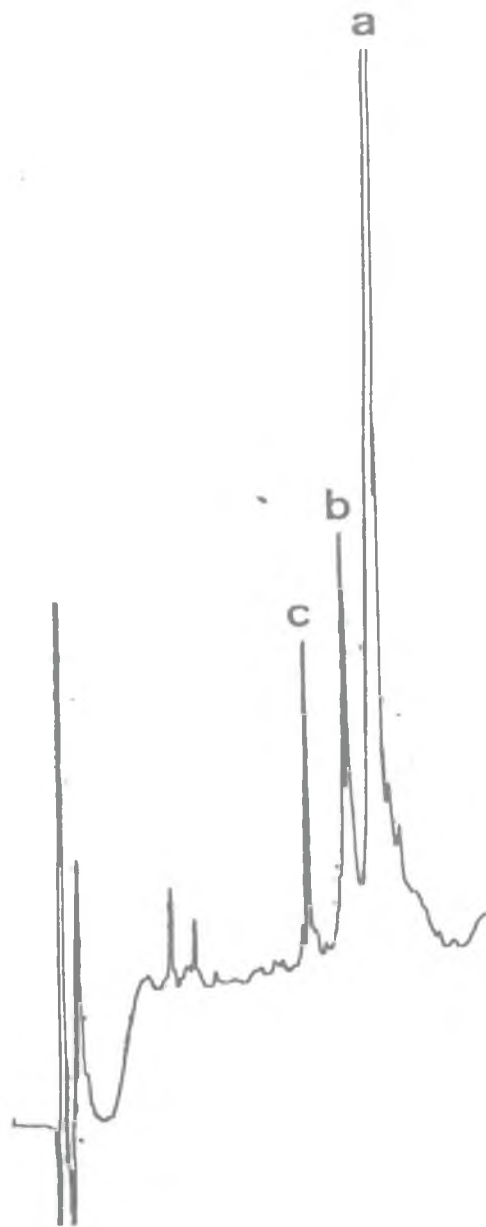


Fig.10- Perfil de eluição do ANF(5-28) e seus produtos após a ação da metalo-endopeptidase cerebral humana.

Quinze  $\mu$ l de uma solução do ANF(5-28) a 2% foram incubados com 10  $\mu$ l da enzima purificada e 5  $\mu$ l do tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, durante 15 min. a 37°C. A reação foi interrompida por desnaturação ( fervera por 10 min. a 80°C ). Após a centrifugação, o sobrenadante foi injetado no HPLC. Os peptídios foram eluídos por um gradiente de 0 a 50% de acetonitrila em 30 min., com um tampão de trietilamina e ácido acético, pH 5,3 e a um débito de 1 ml/min. Os produtos foram detectados à 214 nm.

- a- ANF(5-28), (SSCFGGHMDRIGAQSGLGCNSFRY)
- b- fragmento SSCFGGHMDRIGAQSGLGCNS
- c- fragmento FRY

## DISCUSSÃO

## 4. DISCUSSÃO

### 4.1. PURIFICAÇÃO DA METALO-ENDOPEPTIDASE DA FRAÇÃO SOLÚVEL DO CÉREBRO HUMANO

A purificação da metalopeptidase citosólica do cérebro humano foi realizada através de três etapas cromatográficas consecutivas em colunas de DEAE-Trissacril, Hidroxiapatita e Sephacril S-200.

A cromatografia em coluna de DEAE-Trissacril é um método de troca iônica que separa as proteínas de acordo com sua carga de elétrons. Na resina utilizada, o dietilaminoetil (DEAE) é um grupamento carregado positivamente, atuando como unidade de troca iônica para os fracionamentos das proteínas carregadas negativamente. As proteínas de carga positiva não são adsorvidas pela resina, atravessando livremente a coluna e saindo no volume de eluição inicial. O nosso perfil cromatográfico demonstra claramente os picos de proteínas eluídas. Para o nosso estudo, utilizamos as proteínas do primeiro pico de eluição (50 mM de NaCl), o que sugere tratar-se de proteínas com cargas ligeiramente negativas.

O princípio da cromatografia em coluna de Hidroxiapatita baseia-se na riqueza de grupamentos fosfatos presentes na molécula. Assim sendo, são obtidos dois picos: um inicial constituído de proteínas pobres em fosfatos; e um outro final de proteínas ricas nos mesmos. Nossa atividade enzimática coincidiu com o primeiro pico.

O terceiro tipo de cromatografia utilizado, em coluna de Sephacril S-200, separa as proteínas de acordo com seu peso molecular, até aproximadamente 200 KDa. As proteínas de maior peso atravessam mais livremente a resina, enquanto as de menor

peso são retidas e eluídas pouco a pouco pelo tampão. Em nosso estudo, o pico de atividade enzimática coincidiu com as primeiras proteínas que saíram da coluna, sugerindo um peso molecular elevado de nossa enzima, em torno de 200 KDa.

Esta sequência de cromatografias mostrou-se eficaz pois resultou em 16% de recuperação e num índice de purificação de 1796 em relação ao homogenato bruto de cérebro (tabela 2).

Todas as cromatografias foram reveladas utilizando-se o substrato Abz-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-EDDnp, uma molécula sintética com a sequência de aminoácidos da Leu-encefalina e apresentando nas extremidades um grupamento fluorescente( Abz ) e um apagador ( EDDnp ) ( Juliano et al.,1990; ver métodos ). Como o objetivo maior do nosso trabalho foi demonstrar a existência de uma nova metalo-endopeptidase, no cérebro humano normal, semelhante àquela do *X. laevis* , a escolha do substrato fluorescente Abz-Leu-encefalina-Arg-EDDnp baseou-se no fato de que a Leu-encefalina-Arg foi um dos melhores substratos para a PHIE (Delporte et al.,1993). Além disso essa escolha foi estratégica já que sabíamos que a Abz-Leu-encefalina-Arg-EDDnp fluorescente não é degradada nem pela NEP( Carvalho et al., 1994, resultados não publicados), nem pela Endo-oligopeptidase A (Juliano et al., 1990).

O grau de pureza da enzima isolada foi demonstrado através da eletroforese em placa de gel de poliacrilamida a 6% sem SDS, que revelou apenas uma banda de limites imprecisos. Esta banda coincidiu com o pico de atividade enzimática, avaliado através de incubações de pedaços do gel da eletroforese com o substrato.

Na eletroforese em presença de SDS observamos a existência de duas bandas bem nítidas na região de alto peso (em torno de 100 KDa) e ainda duas outras na região de baixo peso (aproximadamente 20 KDa). Este resultado necessita de maiores confirmações e o significado desta decomposição precisa ser esclarecido. No momento, estamos realizando nova purificação com intenção de obter mais enzima para confirmar este achado e tentar interpretá-lo.

## 4.2. CARACTERIZAÇÃO DA ENDOPEPTIDASE DO CÉREBRO HUMANO

A enzima por nós purificada apresentou as seguintes propriedades:

a)Peso molecular em torno de 200 KDa;

b)pH ótimo dentro da neutralidade (entre 7,3 e 7,8);

c)Seu espectro de inibição sugere tratar-se de uma metalopeptidase já que a atividade enzimática foi significativamente inibida por o-fenantrolina, EDTA e DTT, inibidores clássicos das metalo-enzimas;

d)Capacidade de hidrolisar de maneira majoritária as ligações Xaa-Phe, Xaa-Ileu e Xaa-Leu de peptídios como bradicinina, substância P, ANF (5-28) e angiotensina II ( onde Xaa= Ser, Phe, Tir, His, ou Gly );

e)Capacidade de hidrolisar o peptídio  $\beta$ -amilóide (1-40).

O peso molecular da endopeptidase do cérebro humano é diferente daqueles da NEP (90 a 94 KDa), da IDE (110 KDa), da Endo-oligopeptidase A (70 KDa) e da própria PHIE (110 KDa), sendo comparável apenas ao da ACE (195 a 200 KDa). No entanto, os experimentos utilizando Captopril revelaram tratar-se de uma enzima diferente da ACE, já que nossa atividade não é significativamente inibida pelo Captopril em dosagens que seguramente inibiriam totalmente a enzima conversora de angiotensina.

O fato de nossa enzima ter sido inibida apenas por o-fenantrolina, EDTA e DTT (tabela 3) sugere tratar-se de uma metalopeptidase pura, como a NEP e a PHIE, e diferente da IDE e da Endo-oligopeptidase A. Estas últimas, além da presença de metais

em suas moléculas, são também inibidas pelo NEM e outros inibidores de cisteínas, sugerindo a presença de grupamentos tiois. Estudos recentes sugerem que tais grupamentos seriam tão ou mais importantes para a atividade da enzima do que os próprios metais, que atuariam mais na conformação estrutural da molécula (Boileau, comunicação pessoal). Em relação a nossa enzima, estudos posteriores deverão demonstrar se ela é uma metalopeptidase dependente de zinco, e a elucidação de sua estrutura primária indicará se ela apresenta a sequência de aminoácidos His-Glu-Xaa-Xaa-His característica de um grande número de metalo-enzimas com caráter termolisina-like, como a NEP (Pozsgay et al., 1985; Jongeneel et al., 1989; Carvalho et al., 1992).

O clearance de hormônio-peptídios por inativação proteolítica é um mecanismo geral que pode ser topograficamente associado com receptores em órgãos alvos ( Roques e Beaumont, 1990; Schwartz et al., 1990 ). Nossa enzima produz uma clivagem seletiva majoritária nas ligações Xaa-Phe, Xaa-Ile, Xaa-Leu de diversos hormônio-peptídios como a substância P, a bradicinina, o ANF (5-28) e a angiotensina II. O significado e importância fisiológica dessas clivagens ainda precisa ser melhor esclarecido. No entanto, sabe-se atualmente que a clivagem na ligação Xaa-Phe do ANF, por exemplo, é a responsável por sua inativação ( Thibault et al., 1984). Além disso, estudos recentes revelaram que, em células musculares lisas, a remoção do tripeptídio C-terminal do ANF, resultante da clivagem na ligação Ser-Phe, não é abolida por um inibidor específico da NEP, sugerindo que uma peptidase diferente é a responsável pela degradação do ANF endógeno ( Johnson et al., 1989). Diante deste fato, levantamos a hipótese de que a endopeptidase do cérebro humano possa desempenhar um papel fisiológico na degradação de hormônios-peptídios.

A hipótese acima é ainda corroborada pelo pH ótimo da metalopeptidase cerebral humana, o qual se encontra dentro da neutralidade ( entre 7,3 e 7,8 ). Este valor do pH ótimo é também indicativo de uma possível localização intracelular, citosólica e não lisossomal da enzima, já que as enzimas lisossomais, como as

catepsinas, apresentam um pH ótimo mais baixo, em torno de 5,0, devido à sua atuação fisiológica em meio ácido.

O peptídeo  $\beta$ -amilóide por nós utilizado era constituído por uma sequência de quarenta aminoácidos e apresentava dois sítios potenciais de clivagem pela endopeptidase cerebral humana ( fig. 11 ). Nosso resultados demonstram claramente que ele é clivado, em mais de uma ligação, quando incubado com nossa enzima.

*$\beta$ -amilóide (1-40)*

D A E F R H D S G Y E V H H Q K L V F F A

E D V G S N K G A I I G L M V G G V V

Fig. 11- Estrutura de aminoácidos do B-amilóide (1-40) com os potenciais pontos de clivagem pela metalo-endopeptidase cerebral humana.

No entanto, não nos foi possível, até o momento, determinar quais as ligações rompidas e em que ordem de preferência. Nossos estudos com esse peptídeo ( o  $\beta$ -amilóide ) ainda são preliminares. Porém, o fato dele ser degradado por nossa enzima, uma nova endopeptidase cerebral humana, abre enormes perspectivas para estudos futuros que poderão resultar em importantes implicações fisiológicas.

Diante do exposto acima, finalizamos esta discussão com a proposta da descoberta de uma nova enzima isolada do cérebro humano, provavelmente pertencente a uma recém-descoberta família de metalo-enzimas ( Carvalho et al.,1992), capaz de degradar diversos hormônio-peptídios.



CONCLUSÃO

## 5. CONCLUSÕES

A metalo-endopeptidase isolada da fração solúvel do cérebro humano foi purificada até a homogeneidade, fato demonstrado pela eletroforese sem SDS que revelou apenas uma banda. Foram utilizadas as seguintes etapas de purificação:

- a) Homogenização em água na proporção de 1:4 (p/v);
- b) centrifugação a 25.000 G, durante 1 hora;
- c) cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-Trissacril;
- d) cromatografia em coluna de Hidroxiapatita; e
- e) cromatografia em coluna de Sephacril S-200.

A endopeptidase cerebral humana apresenta as seguintes características:

- a) Peso molecular em torno de 200 KDa;
- b) pH ótimo de atuação enzimática dentro da neutralidade (entre 7,3 e 7,8), o que sugere um possível papel fisiológico na degradação de hormônio-peptídios;
- c) é sensível à o-fenantrolina, EDTA e DTT, o que sugere um caráter de metalo-enzima;
- d) insensibilidade ao fosforamidom e ao captopril, sendo portanto diferente da NEP e ACE, respectivamente;
- e) insensibilidade a inibidores das serinas ( PMSF, STI, TPCK ), cisteínas ( PCMPS, NEM ) e carboxipeptidases ( pepstatina );
- f) caráter termolisina-like por atuar de maneira semelhante a esta enzima bacteriana bastante estudada, que cliva seus substratos no lado amino de aminoácidos hidrofóbicos ( fenilalanina, leucina, isoleucina, triptofano e tirosina );

g) capacidade de clivar o substrato fluorescente Abz-Leu-encefalina-Arg-EDDnp na ligação Phe-Leu, diferentemente da NEP e Endo-oligopeptidase A, que não o degradam;

h) capacidade de clivar a ligação Ser<sup>25</sup>-Phe<sup>26</sup> do ANF, as ligações Phe<sup>7</sup>-Phe<sup>8</sup> e Gly<sup>9</sup>-Leu<sup>10</sup> da substância P, a ligação Tir<sup>4</sup>-Ile<sup>5</sup> da angiotensina II e a Gly<sup>4</sup>-Phe<sup>5</sup> da bradicinina;

i) capacidade de clivar o peptídeo  $\beta$ -amilóide (1-40) em mais de uma ligação.

Portanto, trata-se de uma enzima nova, ainda não descrita, provavelmente pertencente à recém-descoberta família de metalopeptidases protagonizada pela PHIE. Sugerimos uma possível participação dessa nova metalo-endopeptidase cerebral humana na degradação fisiológica de alguns hormônio-peptídios como por exemplo, substância P, ANF, bradicinina, angiotensina II e também do  $\beta$ -amilóide.

As perspectivas de prosseguimento deste estudo são enormes e incluem purificações em larga escala para a obtenção de uma quantidade de enzima suficiente para permitir:

- seu sequenciamento e clonagem;
- produção de anticorpos anti-enzima para seu mapeamento no sistema nervoso central e, quem sabe, em outros tecidos;
- esclarecimento do seu papel fisiológico, com a utilização de um maior número de substratos naturais, especialmente os pertencentes às famílias da pró-encefalina, pró-dinorfina e pró-opiomelanocortina;
- esclarecimento de sua atuação frente ao  $\beta$ -amilóide e ao seu precursor "in vitro" e "in vivo".

**REFERENCIAS  
BIBLIOGRAFICAS**

## 6. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Akiyama, H., Shii, K., Yokono, K., Yonezawa, K., Sato, S., Watanabe, K. & Baba, S. (1988) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 155, 914-922.

Almenoff, J., & Orlowski, M. (1984) *J. Neurochem.*, 42, 151-157.

Almenoff, J., Wilk, S., & Orlowski, M. (1981) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 102, 206-214.

Bhathema, S., Timmers, K., Ole, H., Voyles, N. & Recant, L. (1985) *Diabetes* 34, 121-128.

Biron, P. & Huggins, C.G. (1968) *Life Sci.* 7, 965-970.

Bloom, F.; Battenberg, F.; Rossier, J.; Line, N. & Guillemin, R. (1978) *Proc. Natn. Acad. Sci.* 75, 1591.

Brush, J. (1971) *Diabetes* 33, 140-145.

Burghen, G., Kitabchi, A. & Brush, J. (1972) *Endocrinology* 91, 633-642.

Caldwell, P.R.B., Seegal, B.C., Hsu, K.C., Das, M. & Soffer, R.L. (1976) *Science* 191, 1050-1051.

Carvalho, K.M. (1981) Tese Doutorado, Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

Carvalho, K.M., & Camargo, A.C.M. (1981) *Biochemistry* 20, 7082.

Carvalho, K.M., Joudiou, C., Boussetta, H., Leseney, A.M., & Cohen, P. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 84-88.

Carvalho, K.M., de Laurenzi, V., Melino, G., & Cohen, P. (1993) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 191, 172-179.

Connelly, J.C., Skidgel, R.A., Schulz, W.W., Johnson, A.R., and Erdos, E.G. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 8737-8741.

Correa, F.M.A. ; Innis, R.B. ; Uhl, G.R. & Snyder, S.H. (1979) Proc. Natn. Acad. Sci. 76, 1489.

Cuello, A.C. & Kanazawa, I. (1978) J. Comp. Neurol. 178, 129.

Danielsen, E.M., Cowell, G.M., Noren, O. and Sjostrom, H. (1987) ed. by A.J. Kenny and A.J. Turner, pp. 47-85, Elsevier, Amsterdam, The Netherlands.

Davies, G., & Stark, M. (1970) Proc. Nat. Acad. Sci. 66, 651.

Delporte, C., Carvalho, K.M., Leseney, A. M., Winand, J., Christophe, J., & Cohen, P. (1992) Biochem. Biophys. Res. Commun. 182, 158-164.

Devault, A., Lazure, C., Nault, C., Lemoual, H., Seidah, N.G., Chrétien, M., Kahn, P., Powell, J., Mallet, J., Beaumont, A., Roques, B.P., Crine, P., and Boileau, C. (1987) EMBO J. 6, 1317-1322.

Devault, A., Sales, V., Nault, C. & Boileau, G. (1988) FEBS. Lett. 231, 54-58.

Duckworth, W.C. (1976) 437, 531-532.

Duckworth, W.C. (1988) Endocr. Rev. 9, 319-345.

Eipper, B.A., Mains R.E. & Herbert E. (1986) Trends in Neurosci. 9, 463 - 468.

Erdős, E.G., and Skidgel, R.A. (1989) FASEB J. 3, 145-151.

Erdős, E.G., Wagner, B., Harbury, C.B., Painter, R.G., Skidgel, R.A., and Xiang-Guang, F. (1989) J. Biol. Chem. 264: 14519-14523.

Ferreira, S.H. & Vane, J.R. (1967) Br. J. Pharmacol. 30, 417-424.

- Garcia, J.V., Gehm, B.D. & Rosner, M.R. (1989) *J. Cell Biol.* 109, 1301-1307.
- Greaves, M.F., Brown, G., Rapson, N.T., & Lister, T.A. (1975) *Clin. Immunol. Immunopathol.* 4, 67.
- Goldfine, I., Williams, J., Bailey, A., Wong, K.Y., Iwamoto, Y., Yokono, K., Baba, S. & Roth, R. (1984) *Diabetes* 33, 64-72.
- Goldstein, B. & Livingston, J. (1980) *Biochem. J.* 186, 351-360.
- Hari, J., Shii, K. & Roth, P.A. (1987) *Endocrinology* 120, 829-831.
- Helmer, O.M. (1975) *Am. J. Physiol.* 188, 571-577.
- Hökfelt, T.; Elde, E.; Johansson, O.; Terenius, L, & Stein, L. (1977 a) *Neurosci. Lett.* 5, 25.
- Hökfelt, T.; Elfvin, L.G.; Elde, R.; Schutzberg, M.; Goldstein, M. & Luft, R. (1977 b) *Proc. Natn. Acad. Sci.* 74, 3587.
- Igic, R., Sorrels, K., Yeh, H.S.J. & Erdös, E.G. (1972) In *Neuropeptides: Chemistry, Pharmacology and Pathphysiology.* ( ed. by Back and Sicuteri, Plenum Press, New York ) pp. 149-153.
- Johnson, A.R., Ashton, J., Schulz, W., and Erdös, E.G., (1985) *Am. Rev. Respir. Dis.* 132: 564-568.
- Johnson,G.D. & Hersh, L.B. (1992) *J. Biol. Chem.* 267, 13505-13512.
- Johnson,G.R., Arik,L., & Foster, C.J. (1989) *J. Biol. Chem.* 264,11637-11642.
- Joudiou,C., Carvalho, K.M., Camarão, G., Bousseta,H. & Cohen,P. (1993) *Biochemistry* 32, 5959-5966.

Juliano, L. , Chagas, J.R., Hirata, I.Y. ,Carmona, E. & Camargo, A.C.M (1990) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 173, 647-652.

Kenny, A. J. (1986) *Trends Biochem. Sci.* 11, 40-42.

Kenny, A.J. & Stephenson, S.L. (1988) *FEBS Lett.* 232, 1-8.

Kerr,M.A. & Kenny,A.J. (1974a) *Biochem.J.* 137,477-488.

Kerr,M.A. & Kenny,A.J. (1974b) *Biochem.j.* 137, 489-495.

Koehn,J.A., Norman, J.A., Jones, B.N., Le Sueur, L., Sakane, Y., & Ghai, R.D. (1987) *J. Biol. Chem.* 262, 11623-11627.

Kroneberg, G. & Stoepel, K. (1963) *Arch. Exp. Pathol. Pharmakol.* 245, 284-285.

Kuo,W-L., Gehm, B.D. & Rosner, M.R. (1990) *Mol. Endocrinol.* 4, 1580-1591.

Larsson, L.I. ; Childres, S.R. & Snyder, S.H. (1979) *Nature* 282, 407.

Letarte,M., Vera,S., Tran,R., Addis, J.B., Onizuka, R.J., Quackenbush, E. J., Jongeneel, C. V. & McInnes,R.R. (1988) *J. Exp. Med.* 168, 1247-1253.

Lowry, O.H., Rosembrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.V. (1951) *J. Biol. Chem.* 193, 265\_275.

Maizel Jr.,J.V. (1965) In *Fundamental Techniques of Virology* ( Habel, K. & Salzman, N.P., Ed.) pp 334\_362.

Malfroy, B., & Schwartz, J.C. (1985) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 130, 372-378.

Malfroy, B., Swerts, J.P., Shwartz, J.C., Gacel, G., Fournié-Zaluski, M.C., & Roques, B.P. (1978a) In *Characteristics and Functions of Opioids* ( Van Ree, J.M., Ed.) pp 485\_486.



- Malfroy, B., Swerts, J.P., Guyon, A., Roques, B.P., & Schwartz, J.C. (1978) *Nature* 276, 523-526.
- Malfroy, B., Swerts, J.P., Llorens, C., & Shwartz, J.C. (1979) *Neurosci. Lett.* 11, 329-334.
- Malfroy, B., Schofield, P.R., Kuang, W. J., Seeburg, P. H., Mason, A. J., & Henzel, W.J. (1987) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 144, 59-66.
- Malfroy, B., Kuang, W., Seeburg, P.H., Mason, A.J., & Schofield, P.R. (1988) *FEBS. Lett.* 229, 206-210.
- Maroux, S. (1987) In *Mammalian Ectoenzymes* ( Kenny, A.J., Ed.) pp 15-45.
- Matrisian, L.M. (1990) *Trends Genet.* 6, 121-125.
- Merril, C.R.; Goldman, D. & Van Keuren, M.L. (1984) *Methods Enzimol.*, 104, 441.
- Müller, D., Baumeister, H., Buck, F. & Richter, D. (1991) *Eur. J. Biochem.* 202, 285-292.
- Müller, D., Schulze, C., Baumeister, H., Buck, F. & Richter, D. (1992) *Biochemistry* 31, 11138-11143.
- Olins, G.M., Krieter, P.A., Trapani, A.J., Spear, K.L. & Bovy, P.R. (1989) *Mol. Cell. Endocrinol.* 61, 201-208.
- Olsen, J., Corvell, G.M., Königshofer, F.G., Danielsen, E.M., Moller, J., Laustsen, L., Hausen, O.C., & Noren, O. (1990) *FEBS Lett.* 238, 307-314.
- Ondetti, M.A., & Cushman, D.W. (1984) *Crit. Rev. Biochem.* 16, 381-411.

- Ondetti, M.A., Rubin, B., & Cushman, D.W. (1977) *Science* 196, 441-444.
- Posner, B. (1973) *Diabetes* 22, 552-563.
- Pozsgay, M., Michaud, C., & Orlowski, M. (1985) *Biochem. Soc. Trans.* 13, 44-50.
- Pozsgay, M., Michaud, C., Liebman, M. & Orlowski, M. (1986) *Biochemistry* 25, 1292-1299.
- Roques, B.P., Fournié-Zaluski, M.C., Soroca, E., Lecomte, J.M., Malfroy, B., Llorens, C., & Schwartz, J.C. (1980) *Nature* 288, 286-288.
- Rose, K., Savoy, L.-A., Davies, J.G., Offord, R.E. & Turcatti, G. (1988) *Biochem. J.* 256, 847-851.
- Ryan, J.W., Roblero, J. & Stewart, J.M. (1986) *Biochem. J.* 110, 795-797.
- Schwartz, J.C. (1983) *Trends Neurosci.* 6, 45-48.
- Schwartz, J.C. & Costa, E. (1986) *Annu. Rev. Neurosci.* 9, 277 - 304.
- Schwartz, J.C., Costentin, J., & Lecomte, J.M. (1985) *Trends Pharmacol. Sci.* 6, 472-476.
- Schwartz, J.C., Malfroy, B., & De La Baume, S. (1981) *Life Sci.* 29, 1715-1740.
- Shii, K., Yokono, K., Baba, S. & Roth, R.A. (1985) *Diabetes* 35, 675-683.
- Skeggs, L.T., Kahn, J.R. & Shumway, N.P. (1956) *J. Exp. Med.* 103, 295-299.

Skidgel, R.A., Defendini, R., & Erdös, E.G. (1987) in *Neuropeptides and Their Peptidases* ( Turner, A.J., Ed.) pp165-182, Ellis-Horwood, Chichester, U.K.

Skidgel, R.A. & Erdös, E.G. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 1025-1029.

Skidgel, R.A. & Erdös, E.G. (1987) *Clin. Exp. Hypertens.* A9, 243-259.

Skidgel, R.A., Schulz, W.W., Tam, L.T. & Erdös, E.G. (1987) *Kidney Int.* 31, 45-48.

Sonnemberg, J.L., Sakane, Y., Jeng, A.Y., Koehn, J.A., Ansell, J.A., Wennogle, L.P., & Ghai, R.D. (1988) *Peptides* 9, 173- 180.

Spillantini, M.G., Sicuteri, F., Salmon, S., & Malfroy, B. (1990) *Biochem. Pharmacol.* 39, 1353\_1356.

Steiner, D.F. (1977) *Diabetes* 26, 322-340.

Stephenson, S.L. & Kenny, A.J. (1987a) *Biochem. J.* 243, 183- 187.

Stephenson, S.L. & Kenny, A.J. (1987b) *Biochem. J.* 241, 237\_247.

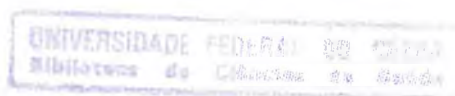
Stentz, F., Harris, H. & Kitabchi, A. (1985) *Endocrinology* 116, 926-934.

Turner, A.J. (1987) in *Neuropeptides and Their Peptidases* pp183-201.

Turner, A.J., Hooper, N.M., & Kenny, A.J. (1987) In *Mammalian Ectoenzymes* ( Kenny, A.J., Ed.) pp. 211-248.

Uhl, G.R. ; Goodman, R.R. & Snyder, S.H. (1979) *Brain Res.* 167, 77.

Uhl, G.R. ; Kuhan, M.S. & Snyder, S.H. (1977) *Proc. Natn. Acad. Sci.* 74, 4059.



Vallée, B.L., & Auld, D.S. (1990) *Biochemistry* 29, 5647\_5659.

Vane, J.R. (1969) *Br. J. Pharmacol.* 35, 209-242.

Weber, K., & Osborn, M. (1969) *J. Biol. Chem.* 244, 4406.

Yang, H.Y.T., Erdős, E.G. & Levin, Y. (1970a) *Biochim. Biophys. Acta* 214, 374-376.

Yang, H.Y.T., Jenssen, T.A. & Erdős, E.G. (1970b) *Clin. Res.* 18, 88.

Yaron, A., Carmel, A., & Katchalski-Katzir, E. (1979) *Anal. Biochem.* 95, 228-235.

Yonezawa, K., Yokono, K., Hari, J., Yaso, S. & Baba, S. (1989) *Endocrinology* 124, 496-504.