

УДК 577.1

БИОХИМИЯ

А. С. Киракосова, В. Т. Галфаян, Р. О. Карапетян,
член-корреспондент АН Армянской ССР А. А. Галоян

Расщепление глюкагона калликреином, выделенным из поджелудочной железы свиньи

(Представлено 29/IV 1982)

В литературе накоплен большой фактический материал, свидетельствующий о существовании для ряда пептидных гормонов (инсулин, АКТГ, гастрин, энкефалины, эндорфины) предшественников в виде более крупных молекул (¹⁻³). Нашими работами показано, что специфические белки из гипоталамуса крупного рогатого скота, являющиеся носителями выделенных нами нейрогормонов, также являются предшественниками образования кардиоактивных нейрогормонов (⁴). Эти данные давали основание полагать, что протеолитический распад указанных соединений является существенным звеном образования множества новых биологически активных соединений и гормонов. В связи с этим возникла необходимость изучения возможности образования новых соединений из предшественников, которые имеются в поджелудочной железе, под влиянием фермента того же органа.

Рассмотрена возможность расщепления глюкагона под действием калликрейна, выделенного и очищенного нами из поджелудочной железы свиньи. Вместе с тем нами исследовалось влияние некоторых рилизинг гормонов и их аналогов на активность калликрейна *in vitro*.

В работе использовали: N-бензоил-L-аргинин-этиловый эфир гидрохлорид („Reanal“, Венгрия), трипсин („Спофа“, Чехословакия), Сефадекс Г--100 и ДЕАЕ—Сефадекс А—50 („Pharmacia“, Швеция), Амфолин (рН 3—6) („LKB Produkter“, Швеция), глюкагон („Calbiochem“, США), ДНС—Cl („Sigma“, США), флуорескамин („Roche“, Австрия), полиамидные пленки („Schleicher Shull“, ФРГ).

Калликреин поджелудочной железы свиньи [ЕС 3.4.21.8] выделяли методом, включающим фракционирование ацетоном, хроматографию на ДЕАЕ—Сефадексе А—50, гель-фильтрацию на Сефадексе G—100 и изоэлектрическое фокусирование на амфолине.

Калликреин обладает способностью гидролизовать известный субстрат этого фермента — N-Бензоил-L-аргинин-этиловый эфир (БАЕЕ). Скорость расщепления БАЕЕ оценивали по приросту оптической плотности пробы при 253 нм и t 25° (⁵) и сравнивали ее с таковой трипсина. Активность выражали в единицах: одна единица — это количество фермента, которое гидролизует 1 мкмоль субстрата в минуту при 25° и рН 8,0 (0,05 М трис-HCl). Изоэлектрофокуси-

вание проводили на колонке LKB—8100 („ЛКБ—приборы“, Швеция) в градиенте сахарозы в интервале рН 3—6 при концентрации амфолинов, равной 1%. Разделение осуществляли на колонке 110 мл в течение 24 ч при 4° и напряжении 500 В. По окончании фокусирования собирали фракции объемом 1,5 мл, в которых измеряли рН, оптическую плотность при 280 нм и калликреиновую активность. Фармакологическую активность калликреина определяли по понижению кровяного давления у кошек (⁶). Белок определяли по методу Лоури (⁷).

Условия гидролиза глюкагона: 1 мг глюкагона растворяли в 0,5 мл 0,5%-ного двууглекислого аммония, добавляли 15 мкг калликреина (активность фермента, измеренная по БАЕЕ, составляла 9,5 ед/мг белка). Смесь инкубировали при 37° в течение 18 ч.

Для выделения индивидуальных пептидов из гидролизата использовали метод препаративного фингерпринта (⁸). Электрофорез проводили в пиридин ацетатном буфере, рН 1,9 (2500 В) 1 ч, хроматографировали в системе растворителей бутанол—уксусная кислота—вода (6,5:1:2,5). Вспомогагельный фингерпринт окрашивали флуорескаминном, с основного листа вырезали зоны пептидов, элюировали 0,01 М муравьиной кислотой и лиофилизировали. N-концевую аминокислоту и аминокислотный состав пептидов определяли дансильным методом (⁹).

В работе исследовалось влияние следующих рилизинг гормонов и их аналогов на активность калликреина, выделенного из поджелудочной железы свиньи, при инкубации фермента с указанными веществами при 25° в течение 15—30 мин: люлиберина в дозе 0,1—100 мкг, суперактивного люлиберина и D-Me₅Phe⁶-люлиберина в дозе 0,1—50 мкг.

Всю процедуру выделения калликреина из поджелудочной железы свиньи выполняли при 4° по методу (¹⁰), примененному авторами для получения фермента из поджелудочной железы крыс и собак, с небольшими изменениями.

1. *Экстракция.* 270 г очищенного от жира фарша поджелудочной железы смешивали с 1350 мл дистиллированной воды и осторожно перемешивали в течение 6 ч при рН 7,5, доведенной с помощью 5 М NaOH, при комнатной температуре. Смесь центрифугировали для удаления нерастворимого осадка.

2. *Первое ацетоновое фракционирование.* Добавляли ацетон по каплям к перемешиваемому супернатанту на ледяной бане до 40%-ной концентрации. Образованный преципитат удаляли центрифугированием. Затем к 40%-ному ацетоновому супернатанту снова добавляли ацетон до конечной концентрации 70%. 70%-ный ацетоновый осадок, собранный центрифугированием, растворяли в 0,1 М Трис-HCl (рН 8,0) и доводили объем до 600 мл.

3. *Второе ацетоновое фракционирование.* Растворенный 70%-ный ацетоновый преципитат снова фракционировали ацетоном до 45%-ной концентрации и после центрифугирования и удаления осадка фракционировали до 67%-ной концентрации. Полученный 67%-ный ацетоновый преципитат растворяли в 35 мл 0,1 М Трис-HCl, содержащем 0,1 М NaCl (рН 8,0), ставили на диализ против того же буфера (2,5 л×2) в течение ночи.

4. *Хроматография на ДЕАЕ-Сефадексе А—50.* 67%-ный от-
дигализованный ацетоновый преципитат наносили на колонку с ДЕАЕ-
Сефадексом А—50 (3×45 см), уравновешенную вышеуказанным бу-
фером. После промывания колонки уравнивающим буфером кал-
ликреин элюировали линейной градиентной элюцией с помощью 0,1 М
Трис-НСI (0,1—0,6 NaCl), рН 8,0.

На рис. 1 дана хроматография калликрейна из поджелудочной
железы свиньи на ДЕАЕ-Сефадексе А-50. БАЕЕ-эстеразная ак-

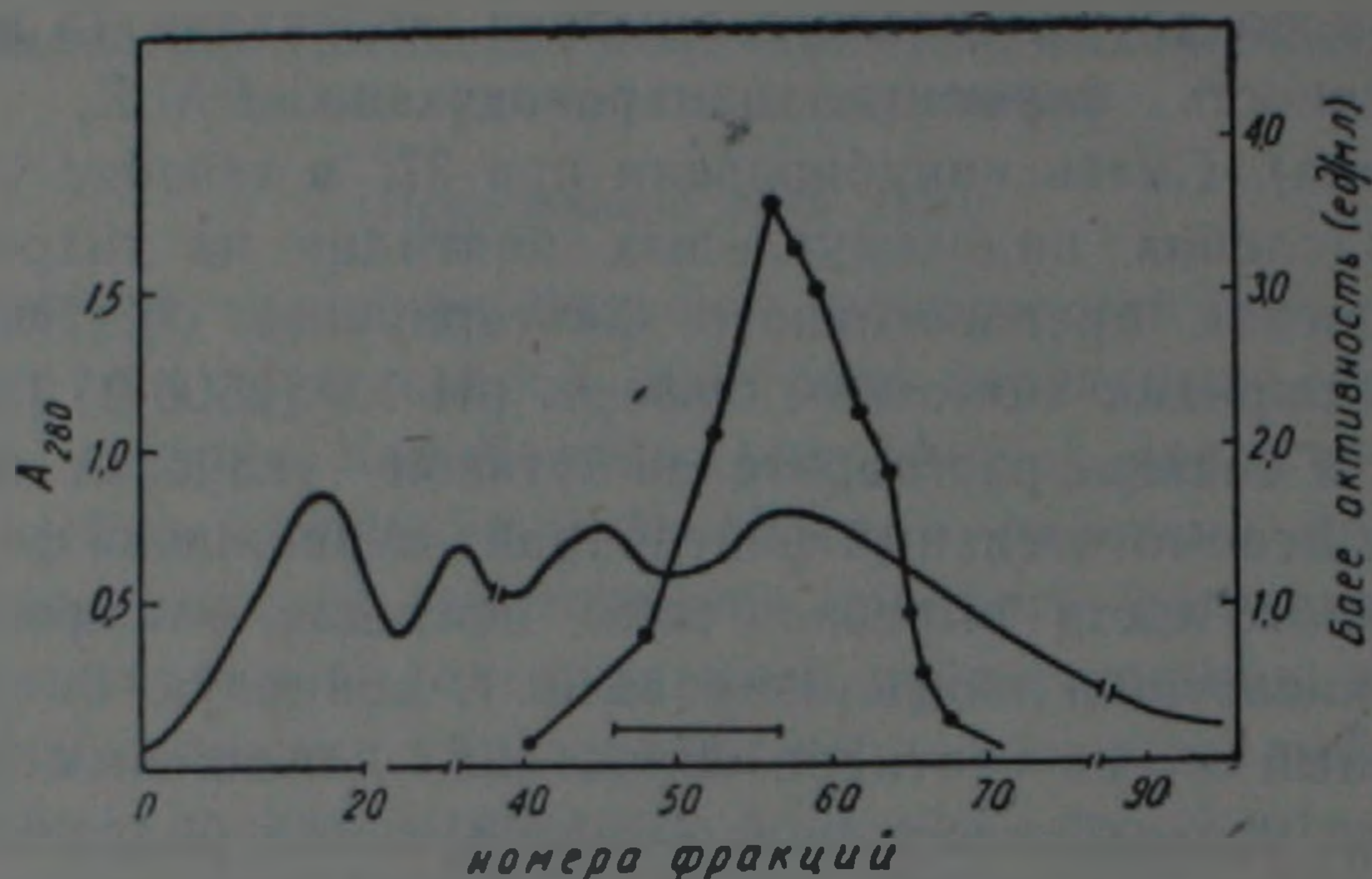


Рис. 1. Хроматография калликрейна поджелудочной железы
свиньи на ДЕАЕ-Сефадексе А—50. Элюция фермента ли-
нейным градиентом 0,1—0,6 М NaCl в 0,1 М Трис-буфере,
рН 8,0. — — A_{280} ; · · — БАЕЕ-активность; |—| — фракции, об-
ладающие вазодилаторной активностью

тивность обнаружена во фракциях № 45—66, вазодилаторная актив-
ность—во фракциях № 45—56. Наличие эстеразной активности в боль-
шем числе фракций по сравнению с вазодилаторной активностью
свидетельствует, по-видимому, о наличии ряда других аргинин эс-
тераз.

Фракции № 45—56, обнаруживающие БАЕЕ-эстеразную и вазо-
дилаторную активности, собирали и концентрировали.

5. *Гель-фильтрация на Сефадексе G—100.* Указанные сконцен-
трированные фракции наносили на колонку с Сефадексом G—100
(2,5×95 см), уравновешенную 0,02 М HCOONH_4 (рН 8,0). На рис. 2.
показан профиль элюции калликрейна поджелудочной железы свиньи
на колонке с Сефадексом G—100.

Фракции № 27—30 собраны и сконцентрированы на основе их
БАЕЕ-эстеразной и вазодилаторной активности.

6. *Изоэлектрическое фокусирование.* Собранные и сконцентри-
рованные фракции подвергнуты изоэлектрофокусированию (см. ме-
тоды).

На рис. 3. изображено изоэлектрофокусирование калликрейна
поджелудочной железы на амфолине.

Фракции № 26—40, обладающие БАЕЕ-эстеразной активностью,
собраны. Судя по характеру кривой, а также интервалу рН, равному

3,7—4,2, выделенный нами препарат калликрейна при изоэлектрофокусировании в колонке разделяется по-видимому на несколько форм, отличающихся по pI в зоне pH 3,7—4,2, что совпадает с литературными данными (¹¹). Выход фермента 6,2 мг. Удельная активность, измеренная по БАЕЕ, равна 9,5 ед/мг белка.

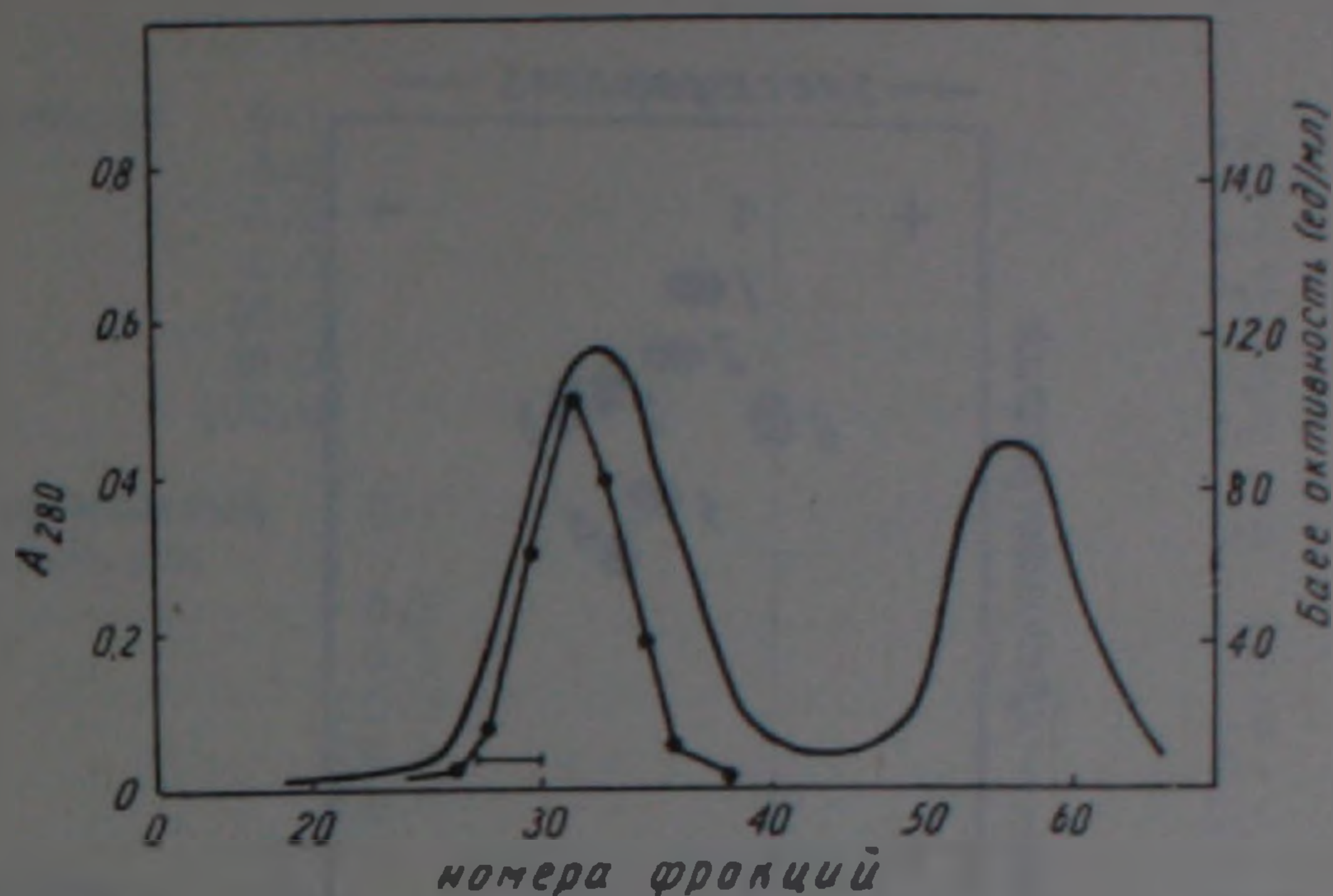


Рис. 2. Гель-фильтрация калликрейна на Сефадексе G—100 с 0,02 М муравьинокислым аммонием, pH 8,0. Обозначения те же, что на рис. 1

Полученным калликрейном из поджелудочной железы свиньи гидролизовали глюкагон. Для выделения чистых пептидов элюат из зоны гидролизованного материала подвергали препаративному элек-

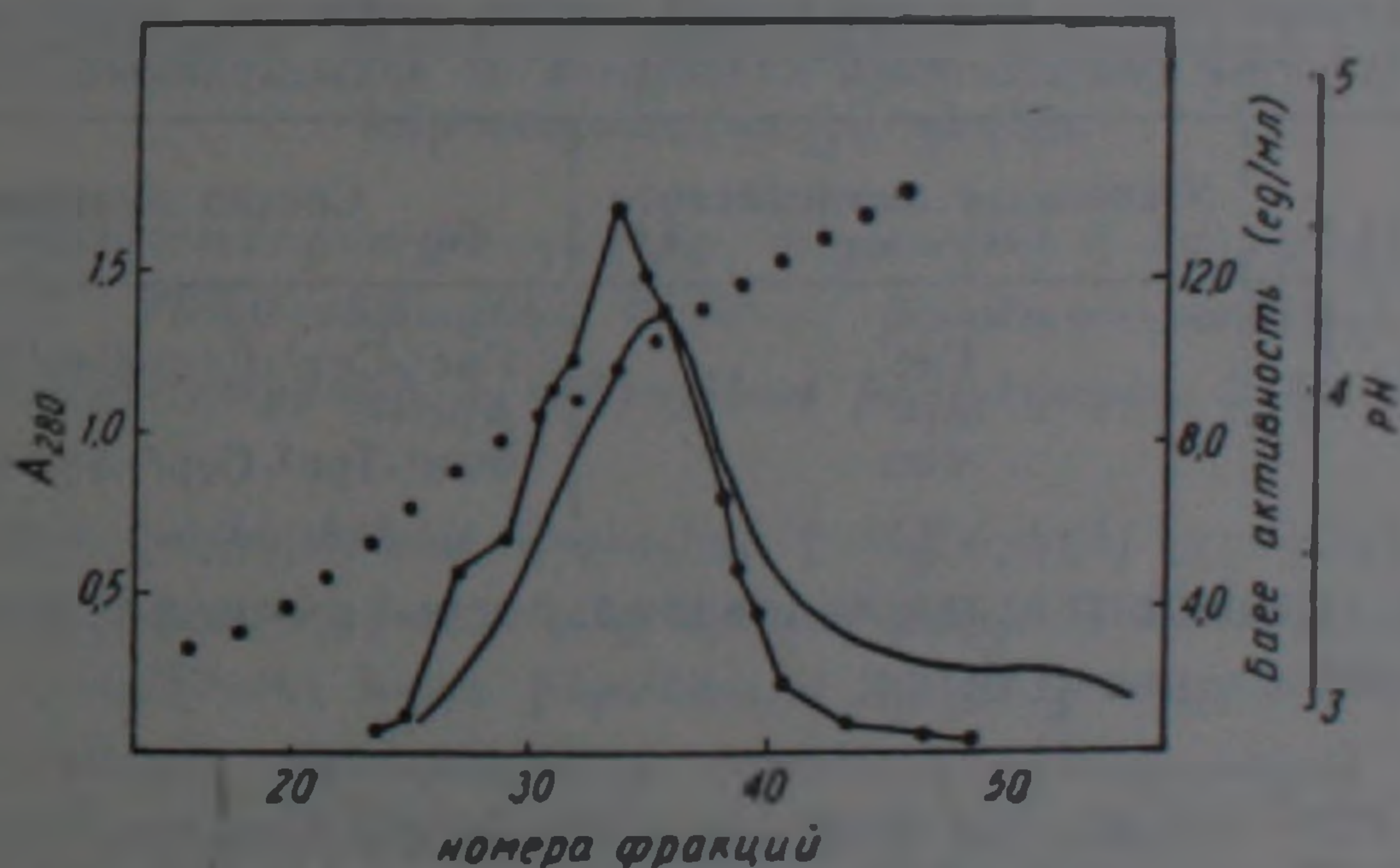


Рис. 3. Изоэлектрофокусирование калликрейна на амфолине.
— A_{280} ; • — БАЕЕ-активность; ... — pH

трофорезу и хроматографии. Пептидная карта гидролизата глюкагона приведена на рис. 4. Пептиды пронумерованы в порядке убывания флуоресценции. В гидролизате глюкагона обнаружено 7 пептидов.

Аминокислотный состав и N-концевые аминокислоты выделенных пептидов представлены в табл. 1. Данные представлены только для трех пептидов глюкагона, так как из-за малого количества остальных выделенных пептидов аминокислотный состав и N-концевые

аминокислоты их достоверно определить не представлялось возможным. Полученные данные указывают на то, что калликреин расщепляет в глюкагоне пептидные связи, образованные аминокислотными остатками Тре-Фен и Лиз-Тир, наряду с этим в третьем пептиде N-концевой аминокислотой найден Арг, а в составе этого пептида два аминокислотных остатка аргинина соседствуют, из чего можно пред-



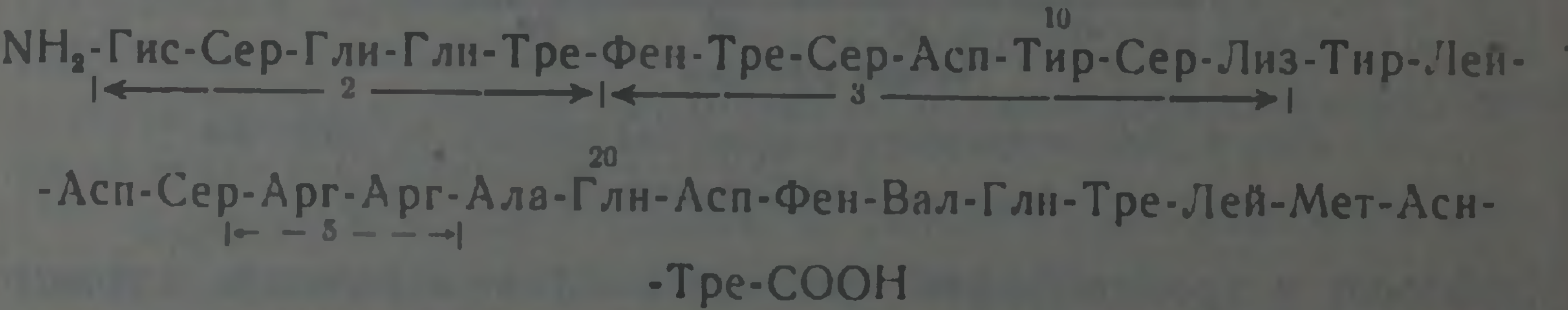
Рис. 4. Пептидная карта гидролизата глюкагона

положить, что разрываются связи 16—17, или 17—18, или же 18—19 (места предполагаемого разрыва пептидных связей указаны пункти-

Таблица 1
N-концевые аминокислоты и аминокислотный состав пептидов, полученных из гидролизата глюкагона под действием калликрена из поджелудочной железы свиньи

Пептид	N-концевая аминокислота	Состав аминокислот
2	Гис	Гис ¹ -Сер ¹ -Гли ¹ -Гли ¹ -Тре ¹
3	Арг	Арг ¹⁽²⁾
5	Фен	Фен ¹ -Тре ¹ -Сер ¹ -Асп ¹ -Тир ¹ -Лиз ¹

ром). Ниже приводится последовательность аминокислот в молекулах глюкагона свиньи и быка:



Исследования по влиянию рилизинг гормонов и их аналогов при инкубации их с полученным нами ферментом из поджелудочной железы свиньи при 25° в течение 15—30 мин не выявили каких-либо изменений в эстеролитической активности с БАЕЕ в указанных выше дозах (табл. 2).

Введенные вещества, мкг	Активность БАЕЕ, единиц мл
—	4.5
Люлиберин 0.1	4.5
0.2	5.4
0.5	5.4
5.0	4.5
10.0	5.4
50.0	4.5
100.0	4.5
Суперактивный люлиберин 0.1	4.5
0.2	4.5
0.5	5.4
10.0	4.5
20.0	4.5
50.0	5.4
Д-Ме ₃ Phe ⁶ -люлиберин 0.1	4.5
0.5	4.8
1.0	4.5
10.0	5.0
20.0	5.4
50.0	4.5

Институт биохимии Академии наук Армянской ССР

Ա. Ս. ԿԻՐԱԿՈՍՏՈՎԱ, Վ. Թ. ԳԱԼՅԱՅԱՆ.

Ռ. Հ. ԿԱՐԱԳԵՏՅԱՆ, Հայկական ՍՍՀ ԳԱ բոլորակից-անդամ Ա. Ա. ԳԱԼՈՅԱՆ

Գլուկագոնի ճեղքումը կալիկրեինով՝ անջատված խոզի
ենթաստամոքսային գեղձից

Խոզի ենթաստամոքսային գեղձից անջատված է կալիկրեին, ացետոնա-
յին մշակման, ԴԵԱԾ-սեֆադեկս Ա-50-ով խրոմատոգրաֆիայի, սեֆադեկս
Դ-100-ով գելֆիլտրացիայի և ամֆոլինով իզոէլեկտրիկ ֆոկուսացման որոշ-
ման միջոցով:

Անշատված կալիկրեհինով հիդրոլիզի է ենթարկվել գլյուկագոնը, հիդրոլիզատում որոշվել է ստացված երեք պեպտիդների ամինաթթվային կազմը և ծայրային ամինաթթուն: Նույն ֆերմենտով մի քանի ռիլիզինգ հորմոնների և նրանց անալոգների ինկուբացիայի ժամանակ օգտագործված դոզաներում էսթերոլիտիկ ակտիվության փոփոխություն չի նկատվել:

¹ S. A. Berson, R. S. Yalow, In: Les Adenomes Hypophysaires Secretants: Endocrinopathies et Immunologie. Paris, Masson et Cie, 239, 1971. ² S. A. Berson, R. S. Yalow, Metabolism, 22, 5, 703 (1973). ³ J. Hughes, Nature, 278, 5703, 394 (1979). ⁴ А. А. Галоян, Вopr. биохимии мозга, вып. 13 (1979). ⁵ J. Trautshold, E. Werle, Hoppe-Seylers, Z. Physiol. Chem., 325, 49, (1961). ⁶ Т. С. Пасхина, О. М. Гуликова, Т. П. Егорова и др., Современные методы в биохимии, Медицина, М., 1968. ⁷ О. Н. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr, J. Randall, Y. Biol. Chem., 193, 265 (1951). ⁸ А. А. Арутюнян, Е. С. Северин, ДАН СССР, т. 9, № 1 (1975). ⁹ А. А. Арутюнян, Е. С. Северин, Я. М. Варшавский, Биохимия, т. 40, № 4 (1975). ¹⁰ Y. Hojima, M. Yamashita, N. Ochi a. o., J. Biochem., 81, 599 (1977). ¹¹ Y. Hojima, Y. Matsuda, C. Moriwaki, a. o., Chem. and Pharm. Bull., 23, 5, 1120 (1975).