

Ю. Е. ЕЛИСЕЕВА, Л. В. ПАВЛИХИНА,
действительный член АМН СССР В. Н. ОРЕХОВИЧ

ВЫДЕЛЕНИЕ КАРБОКСИКАТЕПСИНА (ПЕПТИДИЛ-ДИПЕПТИДАЗА 3.4.15.1) ИЗ ПОЧЕК БЫКА

Участие ренин-ангиотензиновой и кининовой систем в регуляции кровяного давления в организме, в особенности при ряде патологических состояний, в настоящее время не вызывает сомнений (¹⁻³). Образующиеся в процессе функционирования этих систем физиологически активные пептиды: ангиотензин II, оказывающий прессорное действие, и брадикинин, вызывающий снижение кровяного давления, оказывают не только местное действие на сосуды в органах (²⁻³), но и общее действие на всю систему кровообращения (¹⁻²).

В 1962—1963 гг. в почках быка нами был обнаружен фермент (⁴), обладающий свойством отщеплять дипептиды от С-конца различных пептидов (⁵). Более поздние исследования (⁶) показали, что этот фермент, названный нами карбоксикатепсином, катализирует образование ангиотензина II, отщепляя от ангиотензина I С-концевой дипептид гис-лей, и инактивирует биологический антагонист ангиотензина II — брадикинин. От карбоксильного конца пептидной цепи брадикинина карбоксикатепсин удаляет последовательно дипептиды фен-арг и сер-про. Результаты изучения свойств высокоочищенного карбоксикатепсина дали нам основание считать, что карбоксикатепсин, совмещая в себе функции двух считавшихся специфическими ферментов, описанных как «ангиотензин I превращающий фермент» (⁷) и «кининаза II» (⁸), является ключевым ферментом в ренин-ангиотензин-кининовой системе (⁶)*. Существование в организме фермента, который катализирует и образование ангиотензина II из ангиотензина I и разрушение брадикинина путем отщепления С-концевых дипептидов, подтверждается рядом исследователей (^{9, 10}).

В настоящей статье описан разработанный нами метод получения гомогенного препарата карбоксикатепсина и некоторые свойства фермента. Карбоксикатепсин получали из коркового слоя почек быка. Корковый слой замораживали, оттаивали и замораживали снова. Затем ткань измельчали в мясорубке, гомогенизировали с водой в соотношении 1 : 5 в течение 1,5 мин. и центрифугировали 1 час при 8000 *g* при 2°. Осадок экстрагировали повторно приблизительно равным объемом воды и снова центрифугировали в тех же условиях. Оба экстракта объединяли, добавляли 0,5 *M* фосфатный буфер, pH 6,5, до концентрации фосфата в растворе 0,005 *M* и вносили в него КМ-целлюлозу, уравновешенную фосфатным буфером pH 6,5, 0,05 *M*. В этих условиях карбоксикатепсин не связывался КМ-целлюлозой. Смесь оставляли при постоянном перемешивании на 1 час. КМ-целлюлозу отфильтровывали на воронке Бюхнера и промывали тем же буфером. Фильтраты объединяли и фракционировали сульфатом аммония. Концентрацию сульфата аммония в растворе белка доводили до 43% насыщения, pH 7,4, и через 1 час разливали на складчатые фильтры.

* В кн. «Enzyme Nomenclature Recommendations (1972) of the Commission on Biochemical Nomenclature» (1973) карбоксикатепсин и кининаза II вошли под одним названием — «пептидил-дипептидаза» 3.4.15.1.

Осадок выбрасывали, в фильтрат снова добавляли сульфат аммония до концентрации 65% насыщения и через 1–1,5 часа фильтровали с отсасыванием. Полученный сульфатный осадок может длительно храниться в холодильнике без заметной потери активности. Осадок растворяли в 0,9% растворе NaCl, на колонке с сефадексом G-25 переводили в 0,075 M фосфатный буфер pH 7,65 и на колонке ДЭАЭ-целлюлозы, уравновешенной тем же буфером, удаляли балластные белки, которые прочно связываются

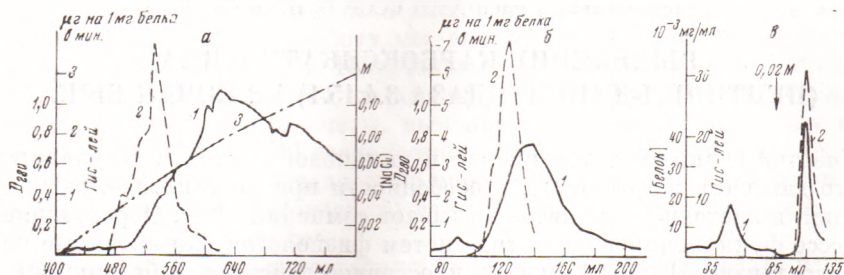


Рис. 1. Хроматография карбоксикапепсина на ДЭАЭ-целлюлозе (а), на сефадексе G-200 (б), на гидроксилатапите (в). 1 — D_{280} , 2 — активность карбоксикапепсина, 3 — градиент NaCl

с ДЭАЭ-целлюлозой, в то время как карбоксикапепсин в этих условиях не связывается. Степень очистки на этом этапе невелика (табл. 1), но это давало возможность на следующем этапе существенно увеличить емкость ионообменника по отношению к карбоксикапепсину. Элюат, сконцентрированный с помощью ДЭАЭ-целлюлозы и переведенный в 0,03 M фосфатный буфер pH 7,65, наносили на колонку (3,4×22 см) с ДЭАЭ-целлюлозой, уравновешенной тем же буфером. Адсорбированный на ионообменнике карбоксикапепсин элюировали при градиенте концентрации 0–0,25 M NaCl в том же буфере. Карбоксикапепсин десорбировался с ДЭАЭ-целлюлозы при концентрации NaCl 0,03–0,06 M (рис. 1а). При этом достигалась 18-кратная очистка препарата. Активные фракции собирали, концентрировали ультрафильтрацией и наносили на колонку с сефадексом G-200 (2,2×67 см) в мединаловом буфере 0,02 M pH 7,1, содержащем 0,1 M NaCl. Карбоксикапепсин выходил с колонки на подъеме основного пика белка (рис. 1б). При электрофорезе в акриламидном геле в препарате фермента на этой стадии обнаруживалось 2–3 полосы (рис. 2а). Последующая хро-

Таблица 1

Очистка карбоксикапепсина из коры почек

Фракции	Общий белок, мг	Общая активность, ед. *	Удельная активность, ед. на 1 мг белка	Выход, %	Степень очистки, отн. ед.
Экстракт	18500	350	0,019	100	1
КМ-целлюлоза	14700	440	0,030	125	1,6
Сульфат аммония	4300	260	0,060	75	3
ДЭАЭ-целлюлоза	2400	250	0,105	70	5,5
ДЭАЭ-градиент	39	63	1,750	18	90
Сефадекс G-200	4,2	19	4,500	5,5	240
Гидроксилатапит	0,11	3,4	31,000	1	1600

* За единицу ферментативной активности принимали количество фермента, которое гидролизует 1 мкмоль субстрата за 1 мин.

матография на колонке (0,9×14 см) с гидроксилпатитом давала 7-кратное увеличение активности (табл. 1): фермент, адсорбированный на гидроксилпатите в 0,0025 М фосфатном буфере рН 6,8, элюировали 0,02 М фосфатным буфером рН 6,8 (рис. 1а). При рехроматографии на гидроксилпатите в тех же условиях пик активности карбоксикатепсина полностью совпадал с пиком белка. Полученный препарат после электрофореза в акриламидном геле давал одну четкую полосу белка (рис. 2б). Обнаруживаемая в срезах геля активность карбоксикатепсина соответствовала этой полосе. Активность карбоксикатепсина определяли флуориметрически⁽¹¹⁾ по отщеплению гистидил-лейцина от С-концевого трипептида ангиотензина I кбз-фен-гис-лей. Содержание белка определяли по методу Лоури.

Молекулярный вес определяли на колонке (2,2×62 см) сефадекса G-200, уравновешенного 0,05 М трис-НСl-буфером рН 7,4, содержащим 0,1 М КСl⁽¹²⁾. Пик активности карбоксикатепсина выходил из колонки в элюционном объеме 117–120 мл, что соответствовало молекулярному весу 180 000–190 000 (рис. 3). Относительно молекулярного веса «ангиотензин I превращающего фермента» из различных органов данные ряда авторов разноречивы^(13–15).

Изоэлектрическая точка карбоксикатепсина определялась методом изоэлектрического фокусирования в 1% амфолине рН 3–10 и 3–5 в градиенте плотности сахарозы. Пик активности карбоксикатепсина обнаруживался при рН 4,45±0,05. Пик активности «ангиотензин I превращающего фермента» легких телят соответствовал рН 4,68±0,15⁽¹⁴⁾.

Результаты исследования торможения активности карбоксикатепсина пептидными ингибиторами представлены в табл. 2. Специфическими ингибиторами карбоксикатепсина являются пептиды, имеющие остаток пролина во втором положении с карбоксильного конца (табл. 2, № 2, 4–6). Эти пептиды не расщепляются карбоксикатепсином^(5, 6), хотя связывание с активным центром фермента, вероятно, происходит. Очевидно, вследствие этого гептапептид



Рис. 2. Электрофорез карбоксикатепсина в акриламидном геле. Препарат после сефадекса G-200 (а), после гидроксилпатита (б)

Таблица 2

Торможение активности карбоксикатепсина

№№ п.п.	Ингибитор *	Концентрация, М	Торможение активности, %
1	Брадикинин **	1,3·10 ⁻⁶	72
2	Ангиотензин II	5,0·10 ⁻⁵	63
3	В-цепь инсулина	2,5·10 ⁻⁵	32
4	Гли-фен-фен-тир-тре-про-лиз	5,0·10 ⁻⁵	81
5	Гли-про-про	1,9·10 ⁻⁴	65
6	Гли-про-ала	2,0·10 ⁻⁴	54
7	Кбз-гли-про-гли-гли-про-гли-OCH ₃	8,5·10 ⁻⁵	0

* Ингибиторы предварительно инкубировали с ферментом при 37° в течение 15–30 мин., затем добавляли субстрат кбз-фен-гис-лей (концентрация в пробе 0,05 М).

** Так как брадикинин расщепляется карбоксикатепсином, его вносили в пробу одновременно с кбз-фен-гис-лей.

(табл. 2, № 4) Б-цепи инсулина оказывает более сильное тормозящее действие, чем сама Б-цепь (табл. 2, № 3). По всей вероятности, для связывания пептида с ферментом важно присутствие незамещенной С-концевой α -карбоксылной группы; эфир пептида (табл. 2, № 7) не может связаться с ферментом и поэтому не является ингибитором.

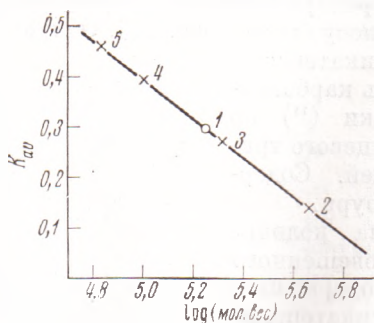


Рис. 3. График определения молекулярного веса карбоксикатепсина (1). В качестве метчиков использовали: 2 — апоферритин (480 000), 3 — γ -глобулин (205 000), 4 — коллагеназу (100 000), 5 — сывороточный альбумин (67 000). Коэффициент разделения K_{av} рассчитывали⁽¹²⁾ из уравнения $K_{av} = (V_e - V_0) / (V_t - V_0)$

Превращение циркулирующего в крови ангиотензина I в ангиотензин II осуществляется, по-видимому, главным образом в легких. При прохождении крови через легкие около 50% ангиотензина I превращается в ангиотензин II⁽¹⁶⁾, в почках 10–20%⁽¹⁶⁾. Эти данные относительны, поскольку во всех органах, кроме легких, наблюдается интенсивное разрушение ангиотензина. Весьма вероятно, что образующийся в почках ангиотензин II действует в основном местно, хотя не исключена возможность, что местное действие ангиотензина II на сосуды почек, через регуляцию выброса ренина в кровь^(3, 17), оказывает таким образом общее воздействие на кровяное давление организма.

Для сравнения карбоксикатепсина почек и легких мы выделили карбоксикатепсин из легких быка по той же схеме. Полученный гомогенный препарат фермента по ряду исследованных свойств (по отношению к ингибиторам, ионам хлора, оптимуму pH, молекулярному весу) не отличался от карбоксикатепсина почек. Надо полагать, что оба фермента идентичны⁽⁹⁾.

Институт биологической и медицинской химии
Академии медицинских наук СССР
Москва

Поступило
1 III 1974

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ J. H. Laraph, L. Baer, H. R. Brunner et al., Am. J. Med., v. 52, 633 (1972). ² Г. А. Яровая, В кн. Химические факторы регуляции активности и биосинтеза ферментов, М., 1969 стр. 275. ³ H. D. Itskowitz, L. A. Hebert, J. C. McGiff, Circul. Res., v. 32, 550 (1973); L. DiSalvo, S. Britton et al., Circul. Res., v. 32, 85 (1973). ⁴ Ю. Е. Елусеева, В. Н. Орехович, ДАН, т. 153, 954 (1963). ⁵ В. Н. Орехович, Ю. Е. Елусеева, Abstr. VI Intern. Congr. Biochem. N. Y., IV—127, 1964, p. 326. ⁶ Ю. Е. Елусеева, В. Н. Орехович и др., Вопр. мед. хим., т. 16, 646 (1970). ⁷ F. E. Dorer, L. T. Skeggs, J. R. Kahn et al., Anal. Biochem., v. 33, 102 (1970). ⁸ E. G. Erdős, H. Y. T. Yang, Life Sci., v. 6, 569 (1967). ⁹ H. Y. T. Yang, E. G. Erdős, Y. Levin, J. Pharmacol. and Exp. Therap., v. 177, 291 (1971). ¹⁰ R. Iqic, E. G. Erdős, H. S. J. Yeh, Suppl. II, Circul. Res., v. 30—31, II—51 (1972). ¹¹ J. Piquilloud, A. Reinharz, M. Roth, Biochim. et biophys. acta, v. 206, 136 (1970). ¹² P. Andrews, In: Methods of biochemical analysis, v. 18, 1970, p. 1. ¹³ H.-J. Lee, J. N. Larue, I. B. Wilson, Arch. Biochem. and Biophys., v. 142, 548 (1971). ¹⁴ R. L. Stevens, E. R. Micalizzi et al., Biochemistry, v. 11, 2999 (1972). ¹⁵ A. Fitz, M. Overturf, J. Biol. Chem., v. 247, 581 (1972). ¹⁶ S. Oparil, C. A. Sanders, E. Haber, Circul. Res., v. 26, 591 (1970). ¹⁷ R. E. Shade, J. O. Davis et al., Am. J. Physiol., v. 224, 926 (1973).