

## ВЫДЕЛЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА НЕКОТОРЫХ ГИПОТАЛАМИЧЕСКИХ ПЕПТИДОВ

А. А. АРУТЮНЯН, В. Т. ГАЛФАЯН, Т. Н. АКОПЯН, Д. К. ДЕМИРЧЯН,  
 Р. О. ҚАРАПЕТЯН, А. А. ГАЛЮЯН

Методами гель-фильтрации, ионообменной хроматографии, хроматографии на бумаге и высоковольтного электрофореза из гипоталамуса крупного рогатого скота выделен ряд пептидных соединений. Показано, что в основном получены короткие 5—6-членные пептиды. Изучена неполная первичная структура трех пептидов.

Гипоталамус является важным нейросекреторным участком мозга, продуцирующим ряд гормонов и физиологически активных соединений пептидной природы. В настоящее время установлена первичная структура ряда рилизинг гормонов [1, 2], вещества Р [3], нейротензина [4], энкефалинов [5], ряда ди- и трипептидов [6].

Выделение и очистка гипоталамических гормонов осуществляется при помощи чувствительных специфических физиологических тестов. В последние годы в связи с появлением новых высокочувствительных реагентов детекции пептидов имеется возможность с помощью химических тестов выделять их весьма малые количества. Разработаны также методы препаративного выделения, которые позволяют извлекать пептиды, содержащиеся в тканях в очень низких концентрациях.

В настоящее время имеется много экспериментальных данных, свидетельствующих о том, что гипоталамические гормоны не только транспортируют информацию из гипоталамуса в аденогипофиз, но и могут оказывать прямое органотропное действие, минуя аденогипофиз. Впервые это доказано Галюяном и сотр. [7] при воздействии соматостатина на поджелудочную железу. Свидетельством этого является также наличие нейрогормонов, регулирующих сердечную деятельность [8]. По данным Гиймена [9], соматостатин ингибирует секрецию инсулина и глюкагона, согласно другим данным, рилизинг гормоны влияют на метаболизм висцеральных органов [10].

Нашей целью было выделение, очистка и установление структуры гипоталамических пептидов.

*Материал и методика.* В работе использовали препараты: ДНС-С1 фирмы «Sigma» (США), флуорескамин фирмы «Roche» (Австрия), о-фальдиальдегид фирмы «Merck» (США), дипептид Гли-Гли фирмы «Реанал» (Венгрия), тонкослойные пластины силикагеля «Силуфол» (Чехословакия), полиамидные пленки фирмы «Shleicher Shull» (ФРГ), карбоксипептидаза А фирмы «Sigma» (США), очищенная по методу, описанному в работе Гирса [11]. Измерение интенсивности флуоресценции проводили на спектрофлуориметре «Farrand» (США).

**Выделение пептидов.** 600 г гипоталамической ткани крупного рогатого скота гомогенизировали в 2 л 1% раствора уксусной кислоты при помощи стеклянного гомогенизатора в течение 5 мин при 4°. Гомогенат центрифугировали 30 мин при 10000 г, надосадочную жидкость собирали и сушили лиофильно. Полученный порошок растворяли в 100 мл 1% раствора уксусной кислоты, центрифугировали 30 мин при 10000 г, к надосадочной жидкости добавляли 2 объема этанола, оставляли на ночь при 4°, снова центрифугировали, после чего к надосадочной жидкости добавляли 5-кратный объем хлороформа. После расслоения водную фазу собирали и сушили лиофильно.

На первом этапе для разделения пептидов мы использовали ионообменную хроматографию на колонке. 1,5 г лиофилизованного порошка растворяли в 20 мл воды, рН раствора доводили до 3,5 добавлением ледяной уксусной кислоты и наносили на колонку катионообменного сефадекса SP-C-25 (3,5×100 см), уравновешенную 0,1 М ацетатпиридининовым буфером рН 3,5. Элюцию проводили последовательно градиентами буферов:

0,1 М ацетатпиридининовый буфер рН 3,5—0,3 М ацетатпиридининовый буфер рН 3,5.

0,3 М ацетатпиридининовый буфер рН 3,5—0,3 М ацетатпиридининовый буфер рН 5,2.

0,3 М ацетатпиридининовый буфер рН 5,2—2,0 М ацетатпиридининовый буфер рН 5,2.

На колонку подавали по 2 л каждого из градиентов. Элюцию проводили со скоростью 70 мл/час. В элюатах определяли нингидринположительные вещества до и после щелочного гидролиза по методу, описанному в работе Мура [12].

Элюат колонки был разделен на 15 зон, каждая из которых была высушена на роторном испарителе. Для полного удаления пиридинацетатной соли сухой остаток повторно растворяли в воде и сушили. Дальнейшее разделение полученных зон велось на колонке сефадекса Г-10 (2×40 см). Элюцию проводили 0,01 М муравьиной кислотой. Элюат собирали в три фракции: 1—40—70, 2—70—100 и 3—100—150 мл. Таким образом, было получено 45 частично очищенных фракций. Далее, каждую из 45 фракций подвергали хроматографии в системе растворителей *n*-бутанол-уксусная кислота-вода 4:1:5 (верхняя фаза). Краевые полоски хроматограмм окрашивали нингидрином, после чего ставили реакцию хлорирования [13] для выявления пептидной связи. Вещества, давшие положительную реакцию с хлором элюировали с бумаги 0,1 М муравьиной кислотой и сушили лиофильно. Дальнейшую очистку пептидов проводили методом высоковольтного электрофореза на бумаге, в 0,8 М ацетатпиридининовом буфере рН 3,5 при 70 в/см в течение часа. Выявление пептидных зон проводили хлорированием. После элюции пептидов с хроматограмм их гомогенность проверяли тонкослойной хроматографией на силикагеле в системе растворителей *n*-бутанол-уксусная кислота-вода 5:2:13. Окрашивание пятен проводили флуорескаминоом [14] и реакцией с хлором. При необходимости пептиды доочищали хроматографией на бумаге в системе растворителей *n*-бутанол-уксусная кислота-вода 3:3:1.

Для установления суммарного заряда пептидов проводили высоковольтный электрофорез на бумаге при рН 6,5 (1,5 М пиридинацетатный буфер) при 70 в/см в течение часа. Для оценки количества аминокислотных остатков и полного доказательства пептидной природы веществ определяли возрастание количества аминогрупп при помощи *o*-фталальдегида после щелочного гидролиза [15]. Щелочной гидролиз  $\sim 10^{-9}$  моля вещества проводили 2 М NaOH при 90° в течение двух часов. N-концевую аминокислоту и аминокислотный состав пептидов определяли дансильным методом [16], с использованием полиамидных пленок. С-концевую последовательность аминокислот в пептидах определяли при помощи карбоксипептидазы А. Для этого  $\sim 10^{-9}$  моля пептида растворяли в 5 мкл фосфатного буфера, рН 7,6, добавляли 1 мкг карбоксипептидазы А в 1 мкл воды и инкубировали при 37°. Из инкубационной смеси через 5, 20 и 60 мин отбирали аликвоты по 1 мкл, сушили и проводили определение отщепившихся С-концевых аминокислот дансильным методом.

**Результаты и обсуждение.** В табл. 1 приведены физико-химические характеристики выделенных пептидов. В таблицу внесены результаты только для тех, давших положительную реакцию с хлором веществ, в ко-

Таблица 1

Некоторые физико-химические характеристики выделенных пептидов  
 Столбцы: 1—код пептида; 2—заряд пептида по данным электрофореза, рН 6,5; 3—  
 кратное возрастание количества аминокрупп после щелочного гидролиза; 4—коли-  
 чество выделенного пептида наномоль; 5—реакция с нингидрином

1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
3	0			—	41	0			—
4	—	3	500	+	42	—			—
5	—	10	500	+	43	0			—
6	+	10	500	+	44	—			—
7	+	20	100	+	45	—			—
8	0	10	200	+	46	—			—
10	0	2	50	+	47	0	5	100	+
11	0			—	48	0	2	50	+
12	0	5	500	+	49	—	3	500	+
13	+	3	100	+	51	0	10	50	+
14	0			—	52	+	2	50	+
15	+	3	500	+	53	0			—
16	+	5	100	+	54	0			—
17	+	5	100	+	55	0			—
18	0			—	56	+	10	50	+
20	+	20	50	+	57	—			—
21	+	10	100	+	58	—			—
22	+	3	100	+	59	—			—
23	+	3	100	+	60	—			—
24	0	5	100	+	61	—			—
25	+	8	50	+	62	0	2	100	+
26	+	3	100	+	64	—			—
28	—			—	65	—			—
29	—	10	100	+	67	—	2	50	+
31	—	3	100	+	69	0	2	100	+
32	—	10	500	+	70	0			—
34	—	2	50	+	71	—	2	50	+
36	0			—	72	—	6	200	+

торых наблюдается возрастание количества аминокрупп после щелочно-го гидролиза. Очевидно, что эти два критерия являются необходимыми условиями для доказательства пептидной природы вещества, и наше утверждение о том, что представленные соединения являются пептидами, базируется в основном на этих двух аргументах. В табл. 1 (столбец 2), приведены результаты определения заряда пептидов по данным электрофореза при рН 6,5. Имеются пептиды с положительным, отрицательным, а также нейтральным зарядами. В столбце 5 представлены результаты реакции пептидов с нингидрином. 23 из 56 пептидов не окрашиваются нингидрином, что свидетельствует об отсутствии свободных аминокрупп в этих соединениях. В столбце 3 приведены результаты определения возрастания количества аминокрупп после щелочного гидролиза с целью выявления пептидов среди выделенных соединений, а также для оценки количества аминокислотных остатков в пептидах. Данные приведены только для нингидринположительных соединений, поскольку нингидринотрицательные пептиды не реагируют с о-фталальдегидом, несмотря на то, что после щелочного гидролиза обнаруживаются свободные аминокруппы. Данные этих определений являются ориентировочными, поскольку в качестве стандарта мы использовали дипептид глицил-

глицин, который не может быть строгим для других пептидов. По тем же соображениям, данные столбца 4, в котором представлены результаты определения количества пептидов (по реакции нативного пептида с о-фталальдегидом) также являются ориентировочными. Из этих результатов видно, что в основном выделены короткие, 3—5-членные пептиды. Количество разных пептидов варьирует и не превышает 500 нм.

Некоторые из выделенных пептидов, полученных в сравнительно большом количестве, были отобраны нами для полного доказательства их пептидной природы и изучения структуры. Были изучены пептиды 4, 12 и 31.

В табл. 2 представлены данные о неполной первичной последовательности этих пептидов. В пептидах 4 и 31 в N-концевом положении идентифицирован остаток глутаминовой кислоты. Наши попытки опре-

Т а б л и ц а 2

Неполная первичная структура гипоталамических пептидов

Код пептида	Заряд	Структура
4	—	Глу- (Сер, Гли <sub>0-1</sub> )-Мет-Гли <sub>1-2</sub>
12	0	Гли-Асп-(Сер, Тре, Мет)-Гли-Асп
31	—	Глу-(Сер, Мет)-Гли

делить N-концевую последовательность этих пептидов методом ДНС Эдмана [17] не были успешными: не происходило отщепления N-концевой глутаминовой кислоты. Объяснением этого может быть то, что пептидная связь образована по  $\gamma$ -карбоксылному остатку глутаминовой кислоты, не исключено также, что за глутаминовой кислотой расположено неидентифицируемое дансылным методом соединение. Инкубация пептида 4 с карбоксипептидазой А приводит к высвобождению аминокислот глицина и метионина. В первую очередь, в инкубационной смеси обнаруживаются аминокислоты глицин и только потом метионин. Поскольку в пептиде имеются 2 остатка глицина (данные аминокислотного состава), то нельзя точно определить количество глициновых остатков на С-конце пептида: один или два (такое определение возможно только при наличии данных о константах скорости гидролиза глицина и метионина карбоксипептидазой А). В пептиде 31 на С-конце мы идентифицировали глициновый остаток. В пептиде 12 при изучении N-концевой последовательности выявляются последовательно глутаминовая и аспарагиновая кислоты. На С-конце идентифицирована последовательность глицин—аспарагин. Поскольку пептид имеет нейтральный заряд, то можно заключить, что остатки глутаминовой и аспарагиновой кислот амидированы.

В настоящее время мы изучаем возможную физиологическую роль выделенных пептидов путем определения их органотропного действия.

Институт биохимии

АН АрмССР

Поступило 2.XI 1977 г.

ՀԻՊՈՒԹԱԼԱՄՈՒՍԻ ՈՐՈՇ ՊԵՊՏԻԴՆԵՐԻ ԱՆՋԱՏՈՒՄԸ  
ԵՎ ԲՆՈՒԹԱԳՐՈՒՄԸ

Ա. Հ. ՀԱՐՈՒԹՅՈՒՆՅԱՆ, Վ. Բ. ԳԱԼՅԱՅԱՆ, Բ. Ն. ՀԱԿՈԲՅԱՆ,  
Ջ. Կ. ԴԵՄԻՐՉՅԱՆ, Ռ. Հ. ԿՈՐԱՊԵՏՅԱՆ, Ա. Ա. ԴԱԼՈՅԱՆ

Գելֆիլտրացիայի, իոնոփոխանակիչ խրոմատոգրաֆիայի և էլեկտրաֆորեզի եղանակներով խոշոր եղջերախոր անատոմների հիպոթալամոսից անջատվել են մի շարք պեպտիդային միացություններ: Հաջողվել է անջատել միատարր պեպտիդներ (3—5 ամինաթթուներից բաղկացած) և ուսումնասիրել վերջիններիս քիմիական կառուցվածքի մի քանի կողմերը:

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF SOME  
HYPOTHALAMIC PEPTIDES

A. K. HARUTUNIAN, V. T. GALFAIAN, T. N. HAKOPYAN,  
J. A. DEMIRCHIAN, R. H. KARAPETIAN, A. A. GALOYAN

With the help of gel filtration, ion exchange chromatography, paper chromatography and high voltage electrophoresis a number of peptide compounds has been isolated from the cattle hypothalamus.

It is shown that in the main 3—5 member short peptides are obtained. Non-full, primary structure for three peptides has been studied.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Schally A. V., Arlmura A., Kastin A. J. Science, 779, 341, 1973.
2. Guillemin R. dv. in Metabolic Disorders, 5, 1, 1971.
3. Chang C. D. and Leeman S. E. J. Biol. Chemistry, 245, 4784, 1970.
4. Carraway R. and Leeman S. E. J. Biol. Chemistry, 250, 1907, 1945.
5. Ling N., Burgus R. and Guillemin R. Proc. Nat. Acad. Sci., 73, 3942, 1976.
6. Pisano J. et al. J. Biol. Chemistry, 236, 2, 1961.
7. Галоян А. А., Алексанян Р. А. Биологический журнал Армении, 27, 6, 1974.
8. Галоян А. А. ДАН АрмССР, 34, 109, 1962.
9. Gerich J., Guillemin R. et al. Diabetes, 23, 11, 876, 1974.
10. Галоян А. А., Карапетян Р. О. ДАН АрмССР, 59, 3, 1974.
11. Hirs C. H. W., Moore S., Stein W. H. J. Biol. Chemistry, 235, 633, 1960.
12. Moore S., Stein W. H. J. Biol. Chemistry, 211, 907, 1954.
13. Rydon H. N. and Smith P. W. G. Nature, 169, 922, 1952.
14. Vandekerchove J. and Montagu M. V. Eur. J. Biochemistry, 44, 279, 1974.
15. Акопян Т. Н., Арутюнян А. А., Оганесян А. И., Галоян А. А. Биологический журнал Армении, 30, 11, 1977.
16. Арутюнян А. А., Северин Е. С. и Варшавский Я. М. Биохимия, 40, 878, 1975.
17. Gray W. R. and Hurtle B. S. Biochem. J. 89, 379, 1963.