

УДК 577.17+577.164.13

НОВЫЕ ФЛЮОРЕСЦЕНТНЫЕ АНАЛОГИ КАЛЛИДИНА И НЕЙРОТЕНЗИНА

Т. Н. АКОПЯН, А. М. АРЗУМАНЯН, А. Г. АГАДЖАНЯН,
А. А. АРУТЮНЯН, А. Х. ХАНАЗАДЯН

Два флуоресцентных производных каллидина и одно производное нейротензина получены с помощью химической модификации нативных пептидов пирридоксаль-5-фосфатом (ПЛФ). Анализ аминокислотного состава полученных аналогов показал, в одном из производных каллидина ϵ -аминогруппа лизинового остатка замещена ПЛФ (ϵ -(P-pxy)-каллидин), тогда как в другом—замещение происходит как по ϵ -, так и по α -концевой аминогруппам пептида (α, ϵ -di-(P-pxy)-каллидин); аналог нейротензина модифицируется по ϵ -аминогруппе лизинового остатка (ϵ -(P-pxy)-нейротензин). Все полученные аналоги обладают сократительной активностью, сопоставимой с активностью нативных пептидов. Под действием плазмы человека они расщепляются быстрее, чем нативные пептиды.

Ключевые слова. нейротензин, каллидин, ПЛФ, флуоресцентные аналоги.

Флуоресцентные производные пептидных гормонов могут быть использованы для изучения лиганд-рецепторных взаимодействий, транспорта гормонов, локализации рецепторов и т. д. Их применение может быть эффективным при условии наличия у них биологической активности, сопоставимой с активностью нативного пептида, высокой флуоресценцией в водных растворах и относительной резистентностью к метаболизму. ПЛФ—коферментная форма витамина B_6 —часто используется для химической модификации белков [1]. Известно, что ПЛФ образует с ϵ -аминогруппой лизинового остатка и N-концевой аминогруппой белков шифроны основания, которые могут быть восстановлены до стабильного вторичного амина с помощью $NaBH_4$ [1]. Такие ПЛФ-производные обычно обладают УФ поглощением в области 300—335 нм и флуоресценцией 400—420 нм.

В настоящей работе сообщается о получении и изучении некоторых свойств ПЛФ-производных каллидина и нейротензина (рис. 1).

Материал и методика. В работе использовали каллидин и нейротензин (Peninsula Laboratories, США). Плазму человека получали из гепаринизированной крови восьми здоровых доноров и хранили при -10° . ϵ -(P-pxy)-каллидин, α, ϵ -di-(P-pxy)-каллидин и ϵ -(P-pxy)-нейротензин получали при смешивании каллидина (4.2×10^{-3} М) и нейротензина (3×10^{-3} М) с 3-кратным избытком ПЛФ в богатом буфере, pH 2.7. Через 10 мин к реакционной смеси постепенно добавляли $NaBH_4$ до утраты желтого цвета. Разделение модифицированных пептидов проводили с помощью электрофореза на бумаге Ватман 3ММ (60 в/см, пиридин-ацетатный буфер, pH 5.5, 40 мин). Контролем служили пробы, содержащие каллидин, нейротензин и ПЛФ, обработанные $NaBH_4$. Положение пептидных аналогов на бумаге определяли по их ярко-голубой флуоресценции в ультрафиолетовом свете. Контрольные полоски бумаги окрашивали нингидриновым реагентом. Пятна, соответствующие модифицированным пептидам, элюировали 0.1 М уксусной кислотой. После сушки полученные пептиды растворяли

фосфатном буфере, pH 7,6, и хранили при -10° . Гомогенность пептидов проверяли с помощью электрофореза на бумаге и формат-ацетатном буфере, pH 1,9. Определение N-концевой аминокислоты и аминокислотного состава пептидов проводили по общему ранее методу [2]. Р-ху-лизин был приготовлен как в [3]. Спектры поглощения модифицированных пептидов снимали в 0,05 М фосфатном буфере, pH 7,6, на спектрофотометре «Спекорд UV» (ГДР). Сократительную активность пептидов измеряли на изолированной кишке морской свинки [1]. Для сравнения биологической активности пептида и аналогов были сняты кривые зависимости доза-эффект. Для определения деградации каллидина, нейротензина и их аналогов пептиды (2×10^{-5} М) инкубировали с плазмой крови человека (40 мкл) при 37° в разное время в 65 мкл 0,05 М фосфатного буфера, pH 7,6. Содержание пептидов определяли до остаточной сократительной активности на изолированной кишке морской свинки.

Результаты и обсуждение. Как каллидин, так и нейротензин, при pH 9,7 образуют с ПДФ шиффовы основания, регистрируемые по длинноволновому сдвигу максимума поглощения хромофора (415 нм). По-

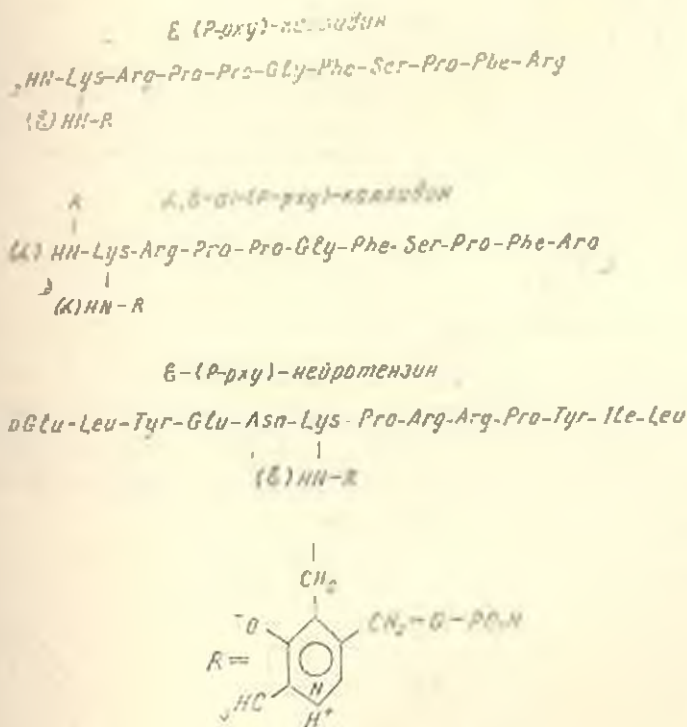


Рис. 1. Структура ε-(P-xy)-каллидина, α,ε-di-(P-xy)-каллидина и ε-(P-xy)-нейротензина.

сле обработки реакционной смеси NaBH_4 электрофорез продуктов реакции выявляет наличие двух новых флуоресцентных пятен для каллидина и одного для нейротензина. При окрашивании нингидрином оказалось, что один из аналогов каллидина является нингидрин-положительным, тогда как второй, как и аналог нейротензина, — нингидрин-отрицательным. Определение аминокислотного состава показало наличие всех составляющих аминокислот в молярном соотношении у всех пептидных производных за исключением лизинового остатка, который

не детектируется ни в нингидрин-положительном пятне, ни в нингидрин-отрицательных пятнах.

Наличие Р-ху-лизина в гидролизатах аналогов нейротензина и каллидина (нингидрин-положительном аналоге) было установлено с помощью синтетического Р-ху-лизина. Из полученных экспериментальных данных следует, что нингидрин-положительный аналог каллидина соответствует пептиду, модифицированному ПЛФ по ϵ -группе лизинового остатка, тогда как нингидрин-отрицательный аналог — по ϵ - и α -концевой аминокетогруппам пептида; в аналоге нейротензина ПЛФ связан с ϵ -аминогруппой (рис. 1). Максимум поглощения для полученных аналогов наблюдается при 330 нм, что характерно для восстановленных оснований Шиффа (рис. 2). Молярный коэффициент экстинкции полу-

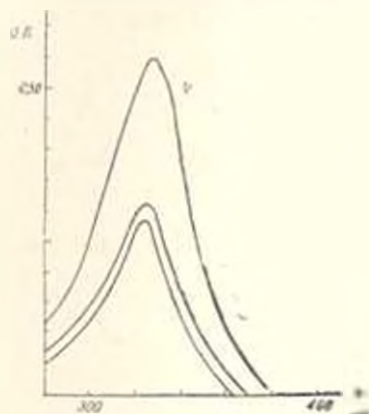


Рис. 2. Спектры поглощения α, ϵ -di-(P-ху)-каллидина (1), ϵ -(P-ху)-каллидина (2) и ϵ -(P-ху)-нейротензина (3) в 0,05 М фосфатном буфере pH 7,6. Концентрация пептидов — 3×10^{-5} М.

ченных аналогов составляет: $\epsilon_{330} = 18\,800 \text{ см}^{-1}$ для α, ϵ -di-(P-ху)-каллидина, $9\,200 \text{ см}^{-1}$ для ϵ -(P-ху)-каллидина и $10\,500 \text{ см}^{-1}$ для ϵ -(P-ху)-нейротензина. Приведенные для аналогов каллидина коэффициенты экстинкции подтверждают наличие двух эквивалентов ПЛФ-остатка в α, ϵ -di-(P-ху)-каллидине.

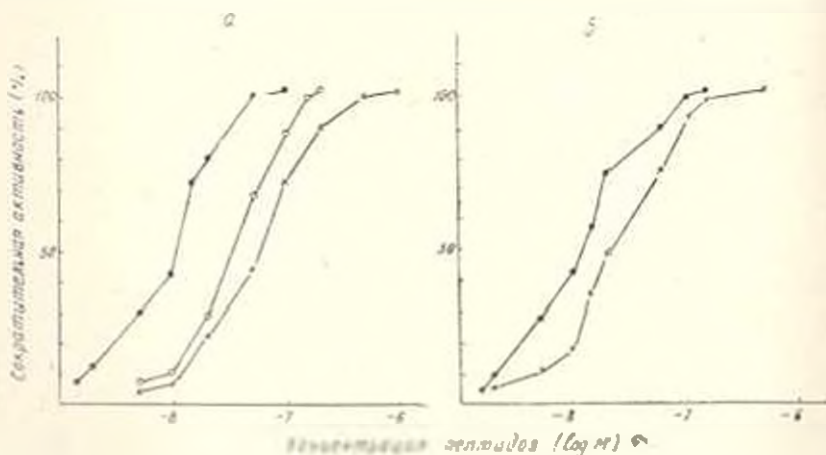


Рис. 3. Кривые зависимости сократительной активности от концентрации пептидов для а) каллидина $\bullet$ 1, ϵ -(P-ху)-каллидина (O), α, ϵ -di-(P-ху)-каллидина (X) и б) нейротензина $\bullet$ 1, ϵ -(P-ху)-нейротензина (X).

Интенсивность флуоресценции ПЛФ-аналогов позволяет обнаружить 0,5 пикомоль α, ϵ -di-(P-ху)-каллидина, 1 пикомоль ϵ -(P-ху)-калли-

лидина и ϵ -(P-pxy)-нейротензина ($v=1$ мл, 0,05 М фосфатный буфер, рН 7,6).

На изолированной кишке морской свинки была измерена сократительная активность полученных аналогов. Все модифицированные пептиды обладают биологической активностью, соизмеримой с активностью нативных пептидов. ЭД₅₀ для каллидина— $1,2 \times 10^{-8}$ М, ϵ -(P-pxy)-каллидина— $3,4 \times 10^{-8}$ М, α , ϵ -di-(P-pxy)-каллидина— 6×10^{-8} М, для нейротензина— $1,3 \times 10^{-8}$ М, ϵ -(P-pxy)-нейротензина— $2,4 \times 10^{-8}$ М (рис. 3).

Полученные ПДФ-производные каллидина и нейротензина метаболически более стабильны, чем нативные пептиды. Как видно из рис. 4, при инкубации пептидов и их аналогов с плазмой крови человека натив-

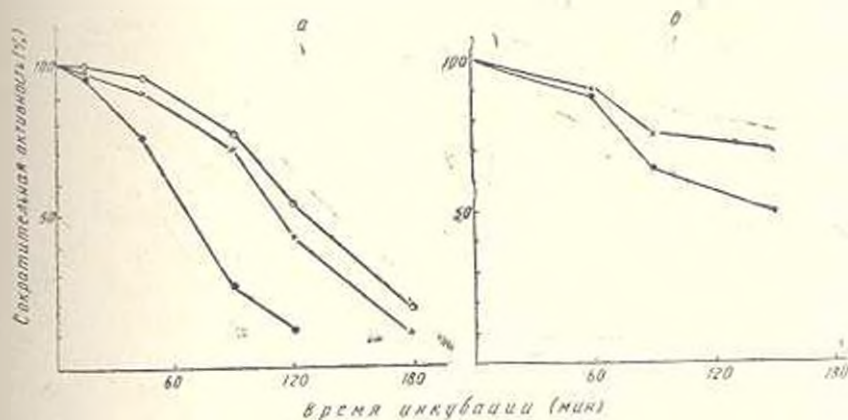


Рис. 4. Расщепление пептидов и их аналогов под действием плазмы человека: а) каллидин (●), ϵ -(P-pxy)-каллидин (○), α , ϵ -di-(P-pxy)-каллидин (X) и б) нейротензин (●), ϵ -(P-pxy)-нейротензин (X). Исходная биологическая активность пептидов (0 время) принята за 100%.

ные пептиды расщепляются быстрее, чем их флуоресцентные производные, что, очевидно, связано с резистентностью аналогов к действию трипсиноподобных ферментов.

Таким образом, изучение свойств аналогов каллидина и нейротензина показывает, что полученные производные удовлетворяют требованиям, предъявляемым к флуоресцентным аналогам гормонов, используемых для исследований лиганд-рецепторных взаимодействий.

Институт экспериментальной биологии
АН Армянской ССР

Поступило 19.XII 1984 г.

ԱՐԽԱՆԻ ԵՎ ՆԵՅՐՈՏԵՆԻՆԻ ԵՈՐ ՀԻՊՈԹԵՆՏԻՎՆԱՅԻՆ ԱՍԽԱՅԱԼՆԵՐԸ

Բ. Ն. ՀԱՅՐԱՅԱՆ, Ս. Ս. ԱՐԶՈՒՄԱՆՅԱՆ, Զ. Գ. ԱՊԱԽՈՒՅԱՆ, Ս. Զ. ՀԱՐՈՒՓԱՐԱՅԱՆ,
Ա. Խ. ԿԱՆՈՇՈՒՅԱՆ

Նախիվ պեպտիդների քիմիական մոդիֆիկացիան պիրիդոլիում-Տ-ֆոսֆատի (ՊԼՏ) օգնությամբ թույլ է ապել ստանալ ֆլուորեսցենտային ածանցյալ-

ներ կալիդինի և մեկ ածանցյալ՝ նեյրոտենսինի համար։ Ստացված ածանցյալների ամինաթթվային կազմի ուսումնասիրությունը ցույց է տալիս, որ կալիդինի մեկ ածանցյալի մեջ ՊԼՖ-ն կապված է ϵ -ամինախմբին, իսկ մյուսի մեջ ինչպես ϵ -, այնպես էլ N-ծայրային ամինախմբին։ Նեյրոտենսինի ածանցյալի մեջ ՊԼՖ-ն միացած է ϵ -ամինախմբին։ Բոլոր ստացված ածանցյալները հարթ միանների նկատմամբ կծկողական ակտիվություն են ցուցաբերում, որը հատուկ է նախիվ պեպտիդներին։ Ածանցյալների կազմի մեջ մտնող ՊԼՖ-ի ֆլուորեսցենցիան թույլ է տալիս որոշել 0,5—1 պիկոմոլ/մլ պեպտիդի բանակությունը։ Եղված կալիդինի և նեյրոտենսինի ածանցյալները մարդու արյան շիճուկի ազդեցության տակ քայքայվում են համեմատաբար ավելի դանդաղ, քան նախիվ պեպտիդները։

NEW FLUORESCENT DERIVATIVES OF KALLIDIN AND NEUROTENSIN

T. N. AKOPYAN, A. M. ARZUMANYAN, H. G. AGHAJANYAN,
A. A. ARUTUNYAN, A. Kh. KHANAZADYAN

Two fluorescent derivatives of kallidin and one—of neurotensin have been prepared by chemical modification of native peptides by pyridoxal-5'-phosphate (PLP). The determination of amino acid composition shows that in one of the derivatives of kallidin ϵ -amino group and in the other δ —as well as N—terminal amino groups have been substituted by PLP. In the derivative of neurotensin δ -amino group has been substituted by PLP. All the obtained derivatives possess spasmogenic activity like native peptides. The fluorescence of PLP residues of derivatives permits to detect 0.5—1 pmol/ml of peptides. The mentioned analogues are degraded by human plasma slower than the native peptides.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Арцунян А. А., Северин Е. С., Варшавский Я. М. Биохимия, 10, 1, 378, 1975.
2. Lollar B., Riordan J. Annual Rev. Biochem., 35, 733, 1959.
3. Severin E., Galeev A., Khurs F., Khomutov R. Biochem. Biophys. Res. Commun. 35, 318, 1969.
4. Webster M., Prada L. Methods in Enzymology, 19, 681, 1970.

«Биолог. ж. Армения», т. XXV/III, № 2, 1965

УДК 547.963.3

АКТИВАЦИЯ ГЛЮКОКОРТИКОНОМ $\text{Ca}^{++}/\text{Mg}^{++}$ -ЗАВИСИМОЙ ЭНДОУКЛЕАЗЫ В КЛЕТКАХ ЛИМФОИДНОЙ ТКАНИ

Р. А. ЗАХАРЯН

Установлено, что в клетках лимфоидной ткани—селезенке, тимусах крысы, лейкоцитах периферической крови человека—активируемый глюкокортиконом фермент, ответственный за межнуклеосомальную деструкцию хроматина, относится к классу