

Биолог. журн. Армении, 1-2 (56), 2004

УДК 612.017.1:612.112.9

## ОПРЕДЕЛЕНИЕ АМИНОКИСЛОТНОГО СОСТАВА И ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ НОВЫХ ПЕПТИДОВ ГИПОТАЛАМУСА

С.Г. ЧАИЛЯН

*Институт биохимии им. Г.Х.Бунятыана ИАН РА, 375014, Ереван*

A line of new peptides was isolated from hypothalamus of cattle and investigated. They were classified by biological activities and their structures by means of PTC-derivatives of amino acids method developed by us. The use of this method permits to determine amino acids and weight concentration of different amino acids in peptides. Sequences of amino acids were determined using method of Edman with future processing on HPLC. The work executed give a chance to discover biological active peptides and to determine direction of their biological functions.

*ВЭЖХ - гипоталамус - фенилтиокарбомил (ФТК)-производные - аминокислотный состав*

Гипоталамус представляет собой центр нейросекреторной деятельности организма. В последние годы из гипоталамуса крупного рогатого скота Галояном и соавторами был выделен ряд биологически активных соединений пептидной природы. Как видно, гипоталамус служит источником неизвестных пептидных гормонов и биорегуляторов. Выделение, идентификация и установление аминокислотной последовательности биологически активных соединений является актуальной проблемой в современной науке.

Развитие метода ВЭЖХ в последние годы позволяет успешно решать эту проблему. Главной задачей настоящей работы стало получение пептидной карты гипоталамуса крупного рогатого скота с последующей идентификацией пептидных соединений, благодаря оригинальному сочетанию методов ВЭЖХ и Эдмана [3] с некоторыми модификациями.

*Материал и методика.* Использовали гипоталамус крупного рогатого скота для получения вторичного порошка бычьего гипоталамуса (ВПБГ) [4], из которого выделяли биоактивные пептиды с помощью ВЭЖХ. Эксперимент проводили на жидкостном хроматографе LDC Analytical, со сканирующим детектором (190-360 нм), Spektromonitor 5000. Детекцию проводили при длине волны 210 нм. Скорость потока 1 мл/мин. Время исследования 60 мин. Элюцию проводили в градиентном режиме. Использовалась колонка DuPont (Zorbax 250x4.6 C<sub>18</sub>). Элюент представлял смесь растворов А и В, где А-ацетонитрил 0.05М р-р ацетата аммония (рН 6.6), В – 0.01%-ный р-р ТФУ. Полученные пептиды в гомогенном виде были подвержены кислотному гидролизу 6N HCl .

Для получения ФТК-производных аминокислот гидролизат обрабатывали (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Sigma, США), после чего полученный раствор подвергали лиофилизации. Компонентами

буфера, применяемого в процессе получения ФТК-производных, являлись пиридин 99% (Sigma, США), триэтиламин 99% (Sigma, США). Фенилизотиоцианат 98% (Fluka, США) являлся необходимым реагентом на завершающем этапе получения ФТК-производных аминокислот, тестирование которых проводили на жидкостном хроматографе LDC Analytical, с использованием насосов Biotronic BT8100, Spectromonitor 5000. Наиболее целесообразным явилось применение колонки Biosfer C18 (250мм x 4,6 мм). Ацетонитрил, 99,9% (Sigma, США), метанол (Sigma, США) употреблялись в качестве элюента. Детекцию проводили при длине волны 254 нм. Хроматограммы обрабатывали с применением программного обеспечения SM5000.

Аминокислотную последовательность определяли по методу Эдмана с шаговой деградацией и дальнейшей обработкой продуктов деградации на ВЭЖХ по разработанной нами методике.

**Результаты и обсуждение.** Нам удалось получить пептидную карту гипоталамуса крупного рогатого скота, состоящую из 25 пептидных соединений [1].

Выделив эти пептиды в гомогенном виде, мы подвергли их кислотному гидролизу и при помощи методики, разработанной в нашей лаборатории, определили их аминокислотный состав [2]. Далее мы попытались провести классифицирование пептидов согласно их аминокислотным весовым концентрациям, которые преобладают в данном соединении. Ярко выраженное преобладание тех или иных аминокислот мы обнаружили для девяти пептидов (рис.) Интересно, что в некоторых случаях по процентному содержанию

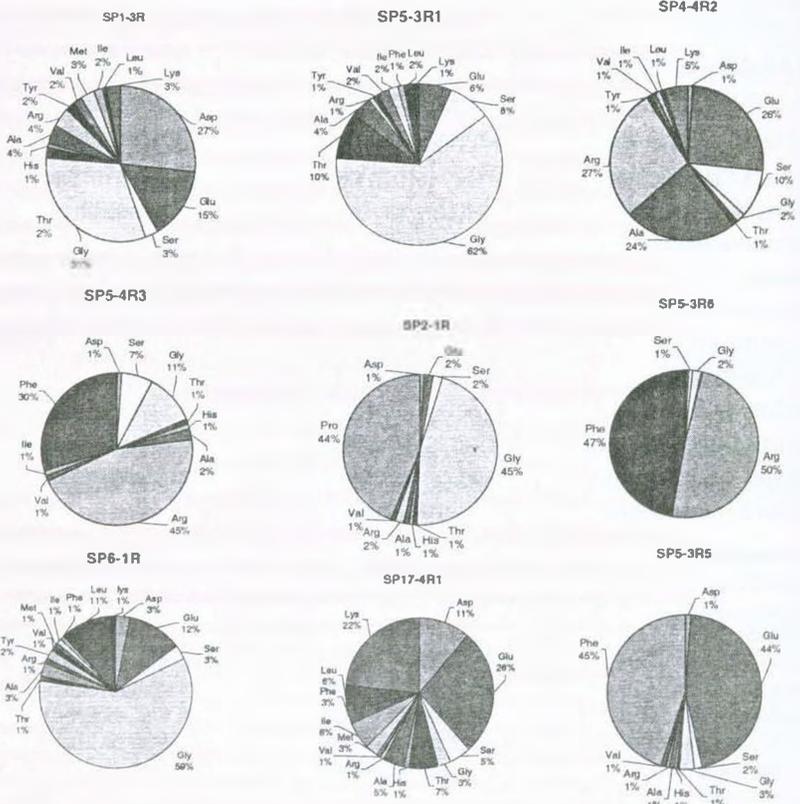


Рис. Аминокислотный состав выделенных пептидов в весовых концентрациях.

аминокислот нам удалось определить структуры пептидов. Так, в SP6-3R6 суммарный процент Arg и Phe составляет 90; в SP2-1R содержание Pro и Glu составляет соответственно 44% и 45%, т.е. SP2-1R и SP6-3R6, по-видимому, являются дипептидами. Также следует отметить, что при изучении одного из полученных пептидов и дальнейшего сиквенирования было выявлено, что этот пептид (SP13-7R2) является иммуномодулятором – тимозином B4. Биологические свойства и взаимосвязь между структурой и гормональной активностью пептидов, а также их аналогов достаточно подробно изучены и освещены в мировой литературе. Один и тот же пептид может иметь плеотропное влияние, в то же время несколько различных пептидов могут выполнять одну и ту же функцию. Последнее указывает на некое структурное сходство различных групп нейропептидов. Сходные биологические эффекты различных по своей химической структуре и происхождению нейропептидов обусловлены, очевидно, действием на идентичные или сходные рецепторные системы, что, по-видимому, определяется наличием в их молекулах сходных структурных элементов, имеющих одинаковые свойства, детерминирующую функцию. К этим свойствам относятся способность молекул к электростатическим взаимодействиям, их гидрофобность, гидрофильность, полярность, пространственная структура и т.д.

Например считают, что Phe как для НГГ, так и для нейропептидов является ключевым звеном при их взаимодействии с рецептором. При изучении выделенных нами пептидов видно, что 16 из 25 пептидов имеют остаток этой ароматической кислоты. Пептиды, не содержащие в составе своих молекул Gly и Glu, ингибируют КА-эргические, в частности ДОФА-эргические механизмы и приводят к выраженному дефициту воспроизведения навыка, как это наблюдается при исследовании ангиотензина или холицистокинина. Как видно из представленного нами рисунка, большинство пептидов содержат Gly и Glu. Аминокислоты с положительным зарядом Arg, Lys, His обеспечивают электростатическое взаимодействие и являются важнейшим элементом в определении структурно-функциональной корреляции в белках.

Имеются данные об иммуноадаьювантных свойствах тирозина. Сравнительно большой процент тирозина содержится в SP4-1R. В зависимости от локализации Pro и Gly наблюдается их антистрессорное влияние. В этой связи представляет интерес пептид SP2-1R. При сравнении первичных структур стимуляторов памяти и иммунного ответа все они содержат остатки аминокислот Arg и Lys. Большой процент содержания Arg и Lys может указывать на их иммуностимулирующее действие. Выполненная нами работа дает возможность выявления новых биологически активных пептидов и направленности их биологической функции.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Галоян А.А., Чацлян С.Г. Нейрохимия, 10, 3-4, 208-211, 1991.
2. Галоян А.А., Чацлян С.Г., Даниелян К.Э., Карамян В.Т. Мед. наука Армении, 42, 3, 3-6, 2002.
3. Edman P. Europ. J. Biochem., 1, 80-91, 1967.
4. Galoyan A.A. DAN Arm. SSR, 34, 4, 155-159, 1962.

Поступила 5.IV.2004