

УДК 577.175.52+577.175.73+577.175.82/8

ВЫДЕЛЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА КАРДИОАКТИВНОГО ТРИПТИЧЕСКОГО ФРАГМЕНТА БЕЛКА-НОСИТЕЛЯ НЕЙРОГОРМОНА «С».

СРАПИОНЯН Р. М., СААКЯН С. А., СААКЯН Ф. М., ГАЛОЯН А. А.

Из трипсинового гидролизата кардиоактивного гликопротеина—носителя нейрогомона «С», используя ионообменную хроматографию, гель-фильтрацию через глици-намидированный сефадекс G-10, бумажную хроматографию и жидкостную хроматографию высокого давления, удалось выделить гликопептид, сохранивший нативную коронарорасширяющую активность. Указанный гликопептид является эффективным ингибитором фосфодиэстеразы сАМР мозга и структурно близким, по данным масс-спектрального анализа, нейрогомону «С» соединением. Наличие углеводного компонента в нем подтвердилось качественной реакцией Шифф-перодной кислоты. Соотношение глюкозаминов и галактозаминов приблизительно равно 2,5. Среди аминокислотных остатков преобладают серин, глицин и аспарагин.

Можно полагать, что в состав гликопептида входит гетеросахаридная цепь, состоящая из глюкозы, глюкозамина и галактозамина.

В настоящее время в литературе накоплен большой фактический материал о предшествующих формах гормонов как продуктах прямой трансляции в их биосинтезе и трансформации в клетках путем протеолиза в гормоны, секретируемые железами в кровь [1—5]. При различных функциональных состояниях ЦНС крупные молекулы, подвергаясь гидролизу пептидазами, образуют новые эндогенные биоактивные соединения.

В качестве примера можно указать на гликопептид [6, 7], выделенный нами из триптического гидролизата кардиоактивного гликопротеина—носителя нейрогомона «С», описанного ранее [8, 9]. Указанный гликопептид представляет несомненный интерес, поскольку не только обладает эффективной способностью расширять коронарные сосуды, но и вызывает значительное ингибирование фосфодиэстеразы сАМР мозга и принимает участие в регуляции активности фосфорил-азы в различных органах у крыс [10]. Кроме того, как показали результаты масс-спектрального анализа, гликопептид является соединением [7], структурно близким нейрогомону «С», который ранее был обнаружен в нативной форме в составе низкомолекулярных соединений укусуно-кислого экстракта гипоталамической части мозга [11].

Исходя из вышесказанного, было целесообразно дальнейшее изучение этого соединения вести в сравнительном аспекте. Некоторые итоги этих исследований изложены в настоящем сообщении.

В работе были использованы следующие реактивы: трипсин, дважды перекристаллизованный, фирмы «Wortington» (США), диметилформамид фирмы «Merck» (ФРГ), додецилсульфат натрия, какодиловая кислота и водорастворимый карбодимид фирмы «Farak», глицинамид фирмы «Diskinson and Co.» (США), сефадексы G-100, G-50, G-25, G-10 фирмы «Pharmacia» (Швеция), диэтиламиноэтилцеллюлоза фирмы «Whatman» (Англия), амфолины «ЛКВ» (Швеция).

Гель-фильтрацию белков проводили на колонке с сефадексом G-100, размерами 2×50 см, а для разделения триптических фрагментов использовали G-25, G-10 и глицинамидированный сефадекс G-10. Фракции собирали на коллекторе типа SF-62 (ЧССР) со скоростью от 10 до 60 мл/ч. В качестве элюирующего буфера применяли борно-боратный буфер (рН 8) и бидистиллированную воду, которые подавались микронасосом типа 6017 (ЧССР). В качестве маркера использовали 0,01%-ный раствор голубого декстрана. Глицинамидированную обработку сефадекса G-10 вели по методу Greig и соавт. [12] с некоторыми модификациями [13].

Ионообменную хроматографию проводили на анионите ДЭАЭ-целлюлозе, уравновешенной 0,005 М натрий-фосфатным буфером, рН 6,5. Применяли линейную градиентную элюцию по соответствующей схеме, где значительный градиент концентрации соли сочетался с небольшим понижением рН буфера от 6,5 до 5. Скорость элюции составляла 20 мл/ч.

Диск-электрофорез на ПААГ проводили в системе гелей по Мауреру [14] по методу Davies [15]. Продолжительность фореа составляла обычно 3 ч при силе тока в 4 мА на трубку. Окрашивание гелей проводили 0,5%-ным раствором амидочерного 10 В в течение 30 мин.

Идентификацию гликопротеинов осуществляли по методу Zacharius и соавт. [16] с некоторыми изменениями. Полиакриламидные гели обрабатывали 10%-ным ТХУ в течение 30 мин, отмывали несколько раз дистиллированной водой; окисляли углеводы 1%-ным KIO_4 в 3%-ной CH_3COOH в течение 30 мин при 0° . Далее промывали 30 мин под струей воды и оставляли на ночь в 7%-ном растворе CH_3COOH . Отмытые гели окрашивали реактивом Шиффа (0,5 М $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_5$ в 1н. HCl) в течение 1 ч в темноте при 20° . Затем 3—4 раза промывали 1%-ным раствором Na-м-бисульфита в 0,1н. HCl (по 10 мин). По появлению окрашенных в малиновый цвет зон судили о наличии гликопротеидов.

Содержание белка определяли по методу Lowry и соавт. [17]. Определение оптической плотности растворов производили через 1 ч после приливания реактива Фолина на фотоколориметре типа Н-57 при 525 нм.

Изоэлектрофокусирование проводили на приборе фирмы «ЛКВ» в колонке объемом 110 мл при температуре 4° . Испытуемые образцы перемывали в 3%-ный раствор амфолинов с интервалами рН 5—7 при сту-

пенчатом изменении напряжения. Продолжительность фокусирования составляла 48 ч, конечное напряжение—500 В, сила тока—0,8 мА.

Ферментативный гидролиз трипсином и химотрипсином проводили в аммонийбикарбонатном буфере, рН 8, в течение 18 ч; пепсином—в буферной смеси растворов муравьиной и уксусной кислот, рН 2. Соотношение фермент—субстрат поддерживали 1:80.

Нисходящую хроматографию на бумаге FN-11 осуществляли в системе растворителей бутанол—уксусная кислота—вода (4:1:5).

Биологическое тестирование проводили *in situ* на кошках под уретановым наркозом по методу Morawitz, Zahn [18].

Аминокислотный анализ проводили на автоматическом анализаторе фирмы «Liquiment» (ФРГ). Гидролиз испытуемых образцов вели в 5,7 н. HCl в запаянных ампулах при 110° в течение 24 ч. Использовали ионообменную смолу ДС-6А «Durrum» в колонке размерами 0,45×35 см. Анализ проводили в ступенчатом градиенте Na-цитратного буфера: 0,2 М, рН 3,25; 4,25; 1,1 М, рН 7,9. Скорость элюции—20 мл/ч. Эта часть работы выполнена в лаборатории химии белка Института биорганической химии АН СССР.

Углеводный анализ метилированного, ацетилированного и силлированного производных гидролизованного в 4 н. HCl образца проводили в капиллярной колонке хроматографа размерами 0,5×0,5 мм×45 см, с фазой SE—30. Газ-носитель—гелий 0,5 мл/мин. Температурный режим—140—220°, градиент—1—2° в мин, детектор—пламенно-ионизационный. В качестве стандарта использован маннитол.

Аминосахара определяли на анализаторе «Liquiment Labatron» (ФРГ), на колонке размерами 0,4×10,5 см со смолой ДС-6А (США) в 0,35 М Na-цитратном буфере, рН 5,28, скорость элюции—20 мл/ч. Детекция с помощью О-фталевого альдегида в 0,4 н. растворе боратного буфера, скорость—10 мл/ч.

Результаты и обсуждение

Выделение и очистка. Электрофоретически гомогенный коронаро-расширяющий белок-гормональный комплекс, условно обозначенный нами как БНС, изолировали из гипоталамусов крупного рогатого скота по схеме (рис. 1), описанной ранее [9]. После диссоциации низкомолекулярных соединений в результате диализа белка против 0,1 н. раствора уксусной кислоты в течение 48 ч при постоянном встряхивании его денатурировали кипячением, либо инкубировали с 6 М мочевиной. Затем белковый раствор охлаждали до 37° и добавляли к нему трипсин, разведенный в аммоний-бикарбонатном буфере. Фермент-субстратное соотношение равнялось 1:80. Ферментативную реакцию приостанавливали после 18-часовой инкубации, и продукты триптического гидролизата дифференцировали гель-фильтрацией через сефадекс G-25. Дальнейшую очистку активного фрагмента производили с помощью бумажной хроматографии, повторной фильтрации через глицинамидированный сефадекс G-10 (рис. 2).

При гель-фильтрации продуктов триптического гидролиза БНС выявлялось 5 фракций, пики которых отмечены в диапазоне 238—278 нм (рис. 3). При биологическом тестировании полученных фракций коронарорасширяющая активность была обнаружена в III пике, элюируясь с колонки в третьем объеме элюента (300—320 мл). Фракция была условно обозначена как ТфБНС (триптический фрагмент белка-носителя нейрого르몬а «С»). После хроматографии указанной фракции на бумаге элюат зоны, соответствующей R_f 0,15, где была обнаружена коронарорасширяющая активность, подвергали гель-фильтрации, используя сефадекс G-10. Материал пика, соответствующего IV-му объему элюента, представлял собой гликопептид с кардиотропной активностью.

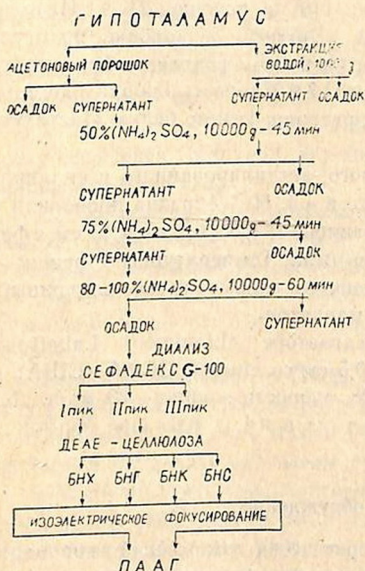


Рис. 1. Схема выделения и очистки кардиоактивных белков из гипоталамусов крупного рогатого скота

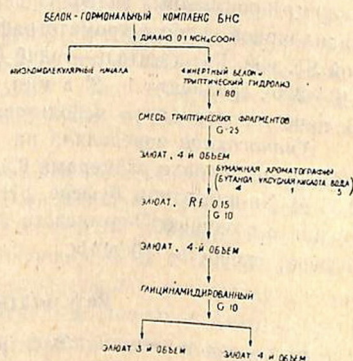


Рис. 2. Схема выделения и очистки кардиоактивного триптического фрагмента белка-носителя нейрого르몬а «С» (БНС)

Поскольку в процессе работы была обнаружена исключительная адсорбирующая способность этого соединения, было целесообразно использовать на последнем этапе очистки колонку с сефадексом G-10, обработанную глицинамидированием [13]. Эффективность применяемого способа была очевидной; как показали результаты исследований, этим методом не только удалось получить гомогенный препарат ТфБНС в адекватном количестве, но и отдиссоциировать это вещество на две активные формы, обозначенные по порядку элюирования из колонки как ТфБНС₃ и ТфБНС₄ (рис. 4). Они отличались друг от друга про-

филем элюции и спектральной характеристикой, выявляя, однако, одинаковую способность расширять коронарные сосуды. Действие этих соединений характеризуется достаточно длительным латентным периодом (рис. 5): коронарорасширяющий эффект начинался лишь через 20—30 мин после введения препарата, достигая своего максимума на 80-й мин. При этом отмечалось плавное динамичное нарастание коронарорасширяющего эффекта на фоне некоторого падения кровяного давления и сильного увеличения объемной емкости крови, оттекающей из венозных сосудов сердца, приблизительно на 250—300% по сравнению с нормой. Аналогичным воздействием обладает кардиоактивный нейrogормон «С», выделенный из состава низкомолекулярных соединений гипоталамуса крупного рогатого скота.

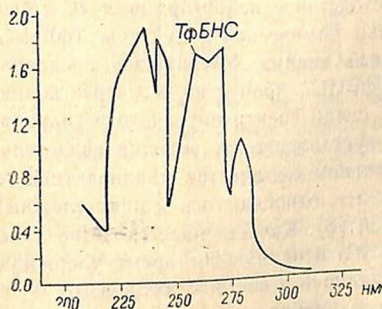


Рис. 3. Профиль элюции продуктов триптического гидролизата БНС при гель-фильтрации через сефадекс G-25; на оси абсцисс—измерение в диапазоне волн 200—350 нм, на оси ординат—оптическая плотность

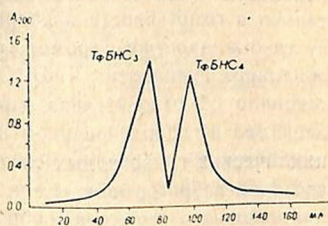


Рис. 4. Профиль элюции ТфБНС через глицинамидированный сефадекс G-10, колонка размерами 1×50 см. Скорость элюции—10 мл/час. На оси абсцисс—объем элюента, на оси ординат—поглощение при 200 нм

Дальнейшие работы были проведены с ТфБНС₄, так как он проявлял большое сходство с нейrogормоном «С» по способности ингибировать ФДЭ сАМР и активировать фосфоорилазу в различных органах [10]. Структурные особенности, выявленные на основании масс-спектрального анализа этих соединений, сделали правомочным предположение о сходстве их строения [6]. Можно полагать, что дальнейшая деструкция этого фрагмента с сохранением активного региона даст возможность выявить его структурную гомологию с нейrogормоном «С».

Аналогия ТфБНС₄ с нейrogормоном «С» выявлена и в резистентности по отношению к денатурирующим агентам, температурным и ферментативным воздействиям, растворимости в воде (рН 5,5) и различных кислых растворителях (рН 2—4), проникновению через полупроницаемую мембрану, характерной слабой нингидрин-положительной реакции. Одной из уникальных особенностей ТфБНС₄, так же, как и нейrogормона «С», является его высокая стабильность к действию

щелочей, кислот и высокой температуры (до 105°). При всех описанных условиях они сохраняют биологическую активность приблизительно на 80%.

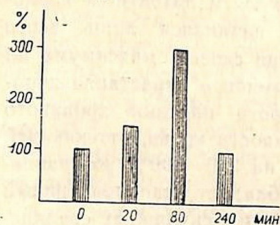


Рис. 5. Изменение объемной емкости крови за единицу времени при внутривенном введении кошкам элюата ТфБНС. Наркоз—уретан с хлоралозой. На оси абсцисс—время в мин, на оси ординат—объемная емкость крови в %

Выше уже говорилось о том, что ответ на вопрос, действительно ли изучаемая фракция проявляет сходство с нейрогормоном «С», был получен после попытки расшифровки химической структуры ТфБНС₄, используя хромато-масс-спектральный анализ. Убедившись предварительно в гомогенности препарата ТфБНС₄, пропустив его через колонку газо-жидкостного хроматографа, сняли спектр нативного и гидролизованного препаратов ТфБНС₄. Сопоставление их величин свидетельствовало об относительно максимальном количестве кардиоактивного вещества в гидролизованном препарате, относящегося к ряду сложных циклических гликозидных соединений [6]. Качественное сходство масс-спектров нейрогормона «С» и ТфБНС₄ и одинаковое время удерживания основного вещества говорят о наличии в составе белкового носителя нейрогормон «С»-подобного соединения.

Одновременно можно было думать и о структурной гетерогенности ТфБНС₄. Для проверки этого предположения было определено наличие углеводов в образце ТфБНС₄ после электрофореза в 7,5%-ном ПААГ методом периодная кислота—реактив Шиффа [16]. Были получены воспроизводимые данные, демонстрирующие наличие одной, окрашенной в малиновый цвет, зоны, что свидетельствовало о наличии углеводного компонента. С целью выяснения его состава был проведен химический анализ на автоматическом аминокислотном анализаторе, включающий раздельное определение аминокислот, гексозаминов и нейтральных сахаров.

Известно, что за последнее время количественный метод определения гексозаминов претерпел значительную эволюцию. Были преодолены трудности, связанные с определением и идентификацией этих соединений, прежде всего с сокращением продолжительности анализа от 900 до 150 мин [19] и повышением чувствительности от 250 до 1 нмоль исследуемого образца [20].

Настоящий анализ проведен со стандартной смесью, состоящей из 1,5 нмоль гексозаминов (рис. 6, нижний снимок) и гидролизата ТфБНС₄, где образец был взят в количестве 0,030 мг. При этих условиях достигнуто отделение глюкозаминов и галактозаминов за 140 и 157 мин соответственно; соотношение их было равным приблизительно

2,5. Кроме того, в регионе между фенилаланином и лизином, а также гистидином и аргинином обнаруживаются два минорных пика (на рисунке отмечены стрелками), не совпадающие с аминокислотами и взятыми в качестве стандарта гексозами. Учитывая время выхода с колонки, можно предположить, что они являются дисахаридами.

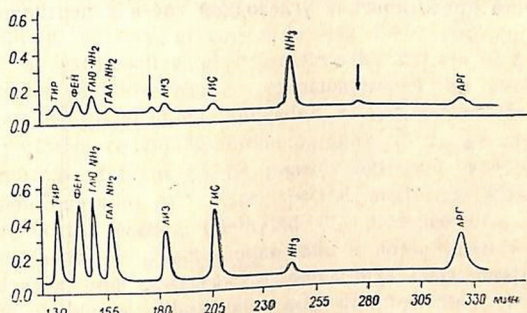


Рис. 6. Кривая анализа аминокислот, гексозаминов стандартной смеси (нижний снимок) и ТфБНС₄ (верхний снимок) после предварительного гидролиза 4 н. НСІ в течение 4 ч

Результаты общего углеводного анализа ТфБНС₄ продемонстрировали наличие глюкозы, выходящей двумя пиками, соответствующим её α - и β -формам (рис. 7).

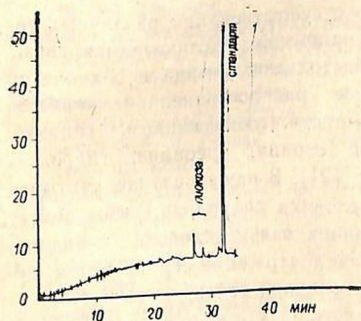


Рис. 7. Кривая общего углеводного анализа ТфБНС₄. На оси абсцисс— время выхода глюкозы, на оси ординат—содержание сахара в имоль

На рис. 8 приведена кривая аминокислотного анализа того же образца ТфБНС₄, но уже подвергнутого гидролизу 6 н. НСІ в течение 24 ч. Увеличение продолжительности времени гидролиза и концентрации НСІ приводило к появлению целого ряда аминокислотных остатков, выходящих из колонки между глицином и лизином: аспарагина, серина, аланина, валина, изолейцина, лейцина. Среди них отмечалось преобладающее содержание таких полярных аминокислот, как серин, глицин, аспарагин.

Резюмируя вышеприведенные данные, можно прийти к выводу о наличии в составе ТфБНС₄ гетеросахаридной цепи, состоящей из глю-

козы, глюкозамина и галактозамина. В настоящее время трудно однозначно оценить функциональную значимость углеводной части ТфБНС₄, но можно, по крайней мере, утверждать, что она своей гидрофобностью, электрическими свойствами делает ТфБНС₄ более стойким к различным воздействиям (щелочным и температурным), сохраняя его биологическую активность. Пока мы не располагаем точными сведениями относительно места присоединения углеводной части к пептидной.

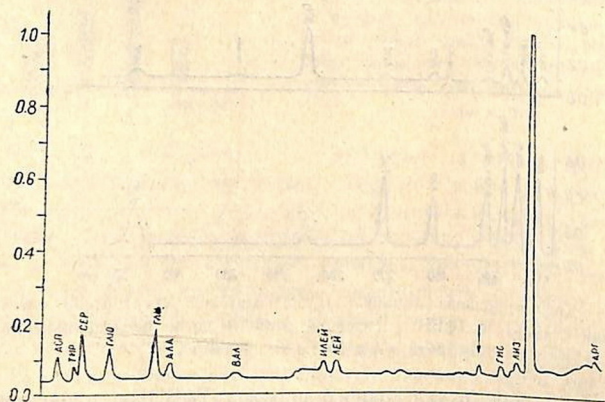


Рис. 8. Кривая аминокислотного анализа ТфБНС₄ после предварительного гидролиза 6 н. HCl в течение 24 ч

Из литературных данных известно о существовании различных типов углеводно-пептидной связи, как, например: N-гликозидная связь, осуществляемая между углеводом N-ацетилглюкозамина и N-концевой амидной группой аспарагина; не менее распространенной является также O-гликозидная связь между N-ацетилглюкозамином, галактозой, ксилозой и гидроксильной группой серина, треонина, гидроксипролина, гидроксипролина и ряда других [21]. В нашем случае, учитывая стабильность ТфБНС₄ при жестких условиях гидролиза, что может свидетельствовать о возможности наличия связи углевода с гидроксильной группой оксипролина и высокое содержание серина в нем, более вероятным кажется наличие O-гликозидной связи.

Другой нерешенной проблемой является место нахождения ТфБНС₄ в белке-предшественнике. Является ли он терминальным концом или же служит пептидно-дисульфидным мостиком, пока не выяснено. Возможно, что ТфБНС₄—место опознавания предшествующей биоактивной молекулы, в которой функциональная часть ковалентно присоединена к адресованному соединению. Дальнейшие исследования внесут определенную ясность относительно типа связи углевода с пептидом и его полифункциональной роли.

ISOLATION AND CHARACTERISTICS OF CARDIOACTIVE TRYPTIC FRAGMENT OF NEUROHORMONE "C" PROTEIN-CARRIER

SRAPIONYAN R. M., SAAKYAN S. A., SAAKYAN F. M., GALOYAN A. A.

Institute of Biochemistry, Arm. SSR Academy of Sciences, Yerevan

A coronary dilatory glycopeptide has been purified from trypsin hydrolyzate of cardioactive glycoprotein—the carrier of neurohormone "C"—by means of ion-exchange chromatography on DEAE-cellulose, gel filtration on glycineamide Sephadex G-100, paper chromatography and high performance liquid chromatography. This glycopeptide is an effective inhibitor of brain cAMP phosphodiesterase and is structurally related to neurohormone "C" (mass-spectral analysis). Staining by the periodic acid-Schiff reaction confirmed the presence of a carbohydrate moiety; glucosamine to galactosamine ratio is approximately 2.5; serine glycine and asparagine residues are prevailing. Data obtained point to the presence of glucose, glucosamine and galactosamine containing heterosaccharide moiety in this coronary dilatory glycopeptide.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Bernstein Y., Armstrong Y. Mc. D., Padde D. M., Miskoni L. Biochem. Biophys. Res. Commun., 42, 2—7, 1971.
2. Gospodarowicz D., Bialicki H., Greenberg G. J. Biol. Chem., 253, 3736—3749, 1978.
3. Hamilton Y. W., Niall H. D., Kentman H. T., Potts J. T., Cohn D. V. Fed. Proc. 32, 269—278, 1973.
4. Walter R., Schleisinger D. H., Schwarts I. R., Capra Y. D. Biochem. Biophys. Res. Commun., 44, 1270—1274, 1971.
5. Gruber K. A., Morris M. Endocrine Res. Commun., 45—59, 1980.
6. Срапионян Р. М., Джамбазян Т. А., Галоян А. А. Вопросы биохимии мозга, Ереван, Изд-во АН АрмССР, 6, с. 157—160, 1970.
7. Срапионян Р. М., Саакян С. А., Медведев Ф. А., Галоян А. А. ДАН АрмССР, 70, 182—186, 1980.
8. Галоян А. А. ДАН АрмССР, 38, 305—307, 1964.
9. Срапионян Р. М., Саакян С. А., Галоян А. А. Вопросы биохимии мозга, Ереван, Изд-во АН АрмССР, 11, с. 97—104, 1976.
10. Срапионян Р. М., Саакян С. А., Абелян Ж. Г., Галоян А. А. Нейрохимия, 1, 36—43, 1982.
11. Галоян А. А. ДАН АрмССР, 34, 109—111, 1962.
12. Chen M., Creig S., Stoner I. Biochemistry, 11, 3559—3563, 1972.
13. Галоян А. А., Срапионян Р. М., Карапетян Р. О., Саакян С. А. ДАН АрмССР, 67, 176—179, 1978.
14. Маурер Г. Диск-электрофорез, М., Мир, с. 248, 1971.
15. Davies B. J., Ornstein L. Disk Electrophoretic reprinted by Distillation. Product. Ind. N. Y., 1962.
16. Zacharius R., Zell T. Anal. Biochem., 30, 148—152, 1969.
17. Lowry O. H., Rosenbrough N. Y., Farr A. L. J. Biol. Chem., 193, 265, 1951.
18. Morawitz P. L., Zahn A. Deutsch. Arch. Klin. Med., 116, 364, 1914.
19. Cheng P. W., Boat T. F. Anal. Biochem., 85, 271—282, 1978.
20. Ford J. D., Baner J. R. Copyright by Acad. Press, 538—550, 1978.
21. Sharon N., Lis H. Chem. Eng. News, 59, 21—44, 1981.

Институт биохимии АН АрмССР, Ереван

Поступила 20. IX 1982

271