

Выделение и идентификация аргинин-фенилаланин дипептида из гипоталамуса человека

А.А.Галоян, С.Г.Чаилян, В.Т.Карамян

Институт биохимии им. Г.Х. Бунятыана НАН РА

375044, Ереван, ул. Паруйра Севака, 5/1

Ключевые слова: гипоталамус, нейрогормон С, С-модулины, фосфодиэстеразы циклических нуклеотидов, дипептид Arg-Phe, ВЭЖХ

В 1989г. нам удалось открыть кальцийнезависимые активаторы фосфодиэстеразы (ФДЭ) циклических нуклеотидов [1]. В составе препарата кардиотропного нейрогормона С, выделенного из гипоталамуса быка, обнаружены три термостабильных активатора высокоочищенной ФДЭ мозга быка (С-I, С-II, С-III). Установлена их способность стимулировать ФДЭ мозга в 6–10 раз в отсутствие ионов кальция. Кинетический анализ стимулирующего действия выявил их высокое сродство к ферменту, кажущаяся константа диссоциации комплекса активатор – фермент составила 10 нг/мл.

Активаторы были очищены до гомогенного состояния с помощью обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ОФ ВЭЖХ) и гель-фильтрации. Эти активаторы были названы нами С-модулинами, так как они, по всей вероятности, являются регуляторами кардиотропного действия нейрогормона С.

В 1990г. мы приступили к изучению первичной структуры С-модулинов и биохимических механизмов их влияния на ферментативную активность [2]. Нам удалось показать, что С-III фракция содержит белок, который является мощным активатором Ca^{2+} -кальмодулин (Ca^{2+} -CaM) активируемого цАМФ ФДЭ мозга без участия Ca^{2+} и кальмодулина. Масс-спектральным анализом и микросеквенированием нам удалось открыть первичную структуру этого белка, являющегося тимозином β_4 (1-39) AcS¹DKPDMAELEKFDKSKLKKTTETQEKNLPSKETJEQEK³⁹ (Т β_4) [2]. Учитывая, что этот белок активирует Ca^{2+} -CaM-зависимые ферменты (цАМФ ФДЭ, киназа легких цепей миозина) в концентрации 10^{-9} - 10^{-12} М, можно считать, что Т β_4 (1-39) является первичным активатором Ca^{2+} -CaM-зависимых ферментов, так как для активирования кальмодулина необходимо наличие 10^{-5} М кальция. Эти данные, открывают большие перспективы в познании регуляторных механизмов Ca^{2+} -CaM-зависимых ферментов.

Гидролиз цАМФ усиливается при добавлении С-I, С-II и С-III [3]. Однако С-модулин-I проявляет макси-

мально активирующее свойство в отношении цАМФ ФДЭ мозга. Обнаруженные эффекты не зависели от присутствия ионов кальция и кальмодулина. Эти опыты нами были проведены в присутствии ЭГТА. Кинетический анализ активирования цАМФ ФДЭ в присутствии С-модулина-I показал, что действие С-I и кальмодулина (с ионами Ca^{2+}) на фермент одинаковы. На основании кинетических данных по координатам Hill мы заметили, что С-I обладает высоким сродством к ферменту (Kd С-I –CaM комплекса равен 10 нг/мл).

При дополнительном рефракционировании С-I А.А. Галояну удалось в лаборатории иммунологии Л. Лее очистить и масс-спектральным анализом определить как индивидуальность этого пептида, так и молекулярный вес. Этот пептид в свободном виде находится в гипоталамусе крупного рогатого скота (КРС). Методом микросеквенирования была определена его первичная структура: аргинин-фенилаланин (Arg-Phe) [4].

Цель данной работы состоит в определении наличия дипептида Arg-Phe, ранее выделенного из гипоталамуса КРС, в гипоталамусе человека.

Использовались 11 гипоталамусов людей, внезапно умерших от острой сердечной недостаточности. В эпикризах отсутствовали неврологические болезни и задержанное коматозное состояние до смерти. Шесть гипоталамусов обрабатывались через 6 ч, а пять – через 12 ч. после смерти. С момента смерти до взятия материала все трупы хранились при температуре 5°C.

Хроматографические эксперименты проводились на двухкомпонентной системе ВЭЖХ Biotronik BT-8100 (ФРГ). Система была оснащена инжектором Rheodyne с использованием петли для образца объемом 50 мкл и детектором с полным сканированием в диапазоне 190–360 нм (Spectromonitor 5000). Для предупреждения образования пузырьков в системе все растворы предварительно дегазировали гелием. Для регистрации результатов хроматографии использовали систему хранения, поиска и математической обработки данных SM5000.

Эксперименты по ЯМР спектроскопии проводились в Центре исследования строения молекулы НАН РА (ЦИСМ НАН РА) на ЯМР-спектрометре Mercury-300, Varian.

Получение вторичного порошка гипоталамуса человека

Для получения так называемого вторичного порошка (смесь биоактивных соединений пептидной природы) гипоталамуса человека (шесть гипоталамусов, взятые через 6 ч. после смерти) мы руководствовались методом выделения низкомолекулярных биологически активных соединений из гипоталамуса КРС, разработанным А.А.Галояном [2]. Оптимизируя последнюю стадию получения вторичного порошка

гипоталамуса с целью освобождения от высокомолекулярных соединений, мы использовали технологию разделения на мембранных фильтрах.

Получение пептидной карты гипоталамуса человека

Навески вторичного порошка гипоталамуса человека (30 мг) растворяли в 600 мкл дистиллированной воды. Полученный раствор (р-р I, 30 мкл) вводили в хроматограф. Для получения пептидной карты гипоталамуса человека методом ОФ ВЭЖХ подбирали оптимальные хроматографические условия [6], которые дали возможность получить высокоэффективное разделение пептидных соединений гипоталамуса человека (рис.1).

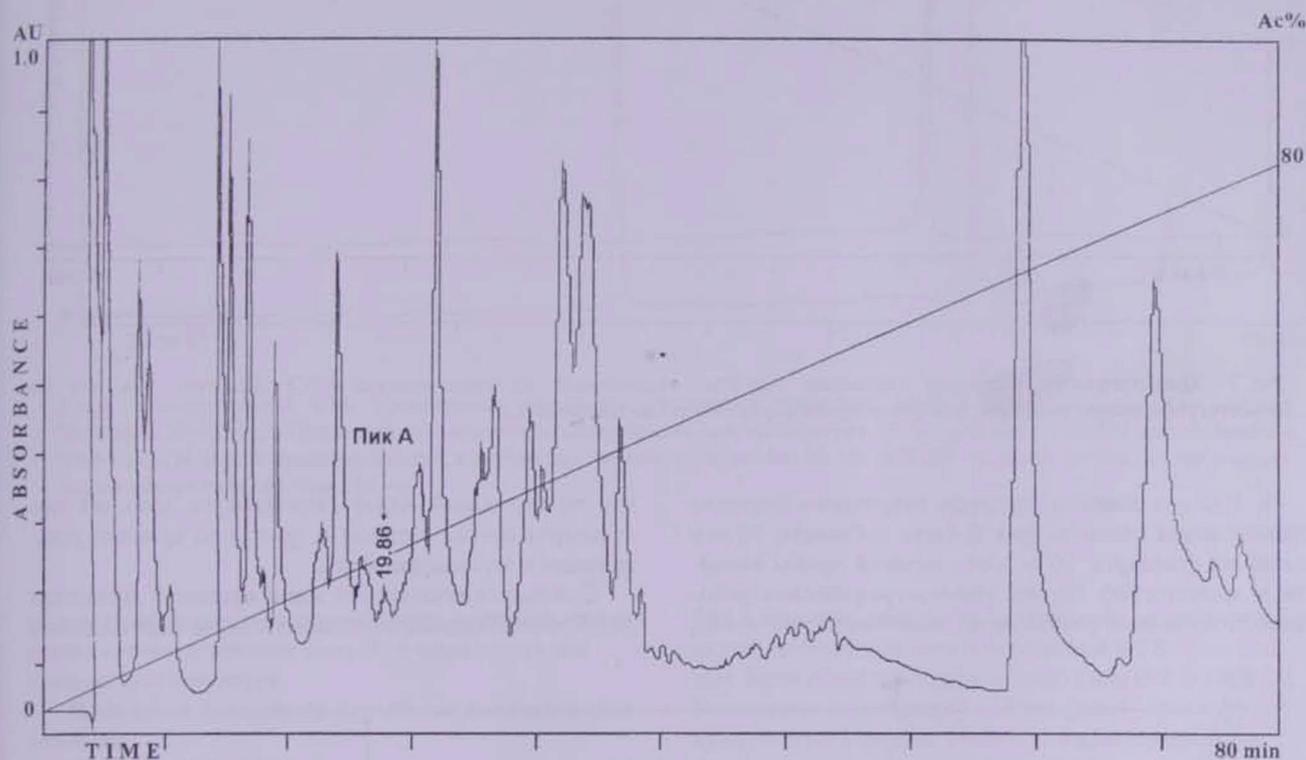


Рис. 1. Пептидная карта гипоталамуса человека. Тандемная система обращенно-фазовых колонок "Biosphere Si-100 C₈" и "Biosphere Si-300 C₁₈"; элюенты – ацетонитрил/0,1% раствор ТФУ; линейный градиент со скоростью потока 1 мл/мин; длительность эксперимента – 80 мин; детекция осуществлялась при 210 нм.

Хроматографическая идентификация дипептида Arg-Phe

Для хроматографической идентификации дипептида Arg-Phe на пептидной карте гипоталамуса человека был использован метод калиброванного стандарта, широко распространенный в хроматографиче-

ской практике. В качестве стандарта был использован дипептид Arg-Phe, выделенный в индивидуальном виде из гипоталамуса КРС. Время элюирования дипептида (стандарт) 19.86 мин при тех же хроматографических условиях (рис.2).

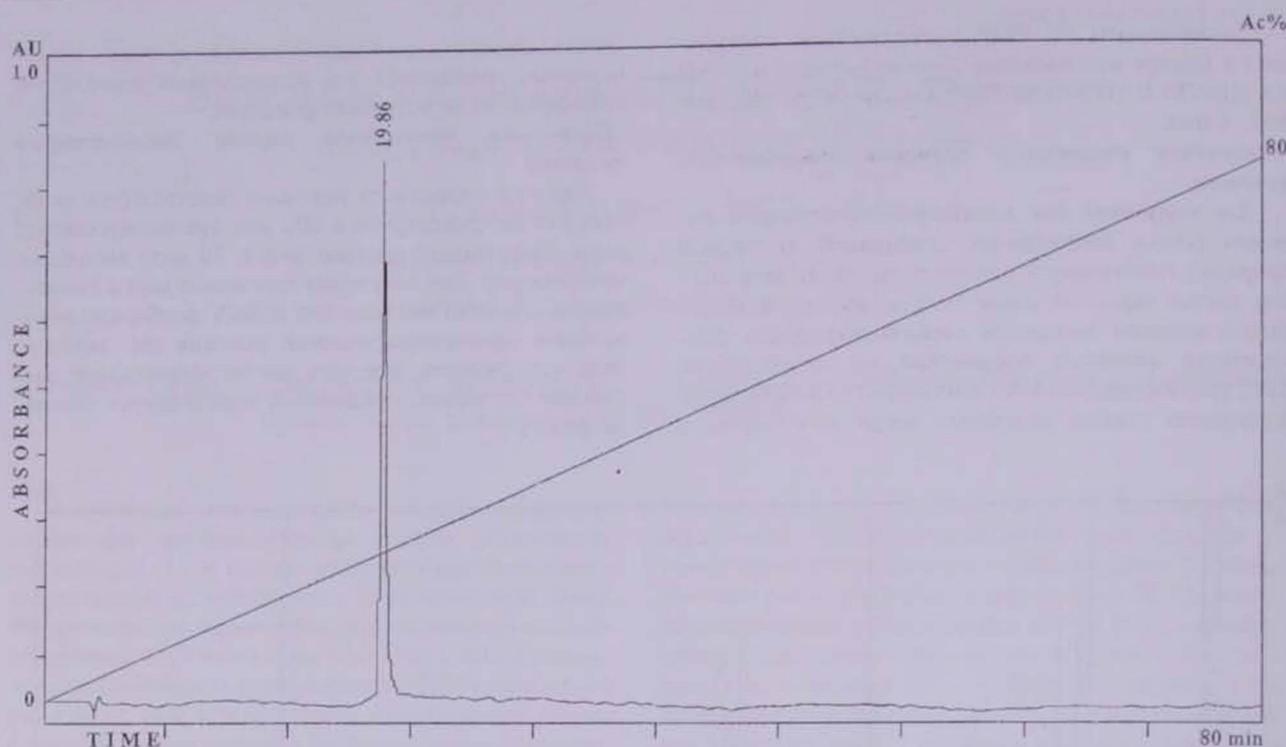


Рис.2. Хроматограмма стандарта (дипептид Arg-Phe, выделенный из гипоталамуса КРС). Получен при тех же хроматографических условиях, что и пептидная карта гипоталамуса человека.

К 200 мкл водного раствора вторичного порошка гипоталамуса человека (р-р I) было добавлено 10 мкл раствора стандарта. 30 мкл полученной пробы вводили в хроматограф (те же хроматографические условия). Полученные результаты свидетельствуют о том,

что на пептидной карте гипоталамуса человека пик стандарта совпал с пиком А (рис.1) по времени удерживания и по сканированию.

С целью окончательной идентификации дипептида Arg-Phe необходимо в индивидуальном виде выделить

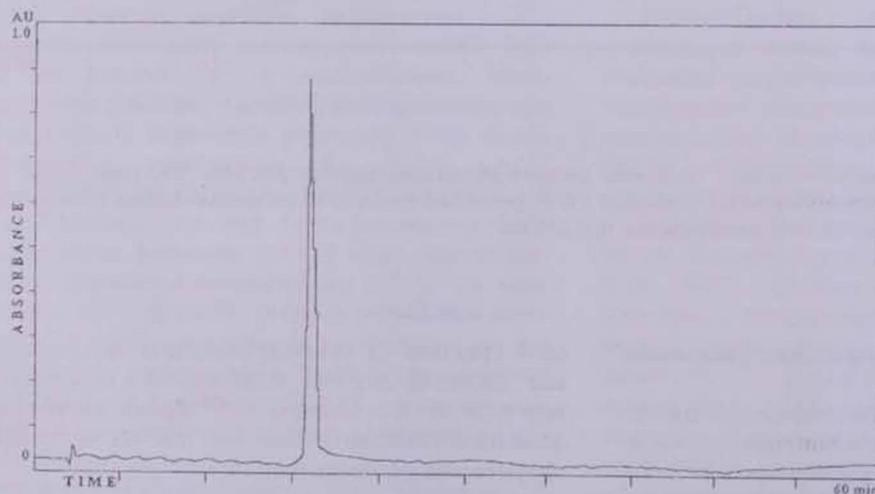


Рис. 3 Рехроматограмма пика А. Обращенно-фазовая колонка "Biosphere Si-300 C₁₈". Применялось изократическое элюирование. Элюенты - ацетонитрил/ 0,1% раствор ТФУ (30/70); скорость потока - 1 мл/ мин, детекция осуществлялась при 210 нм.

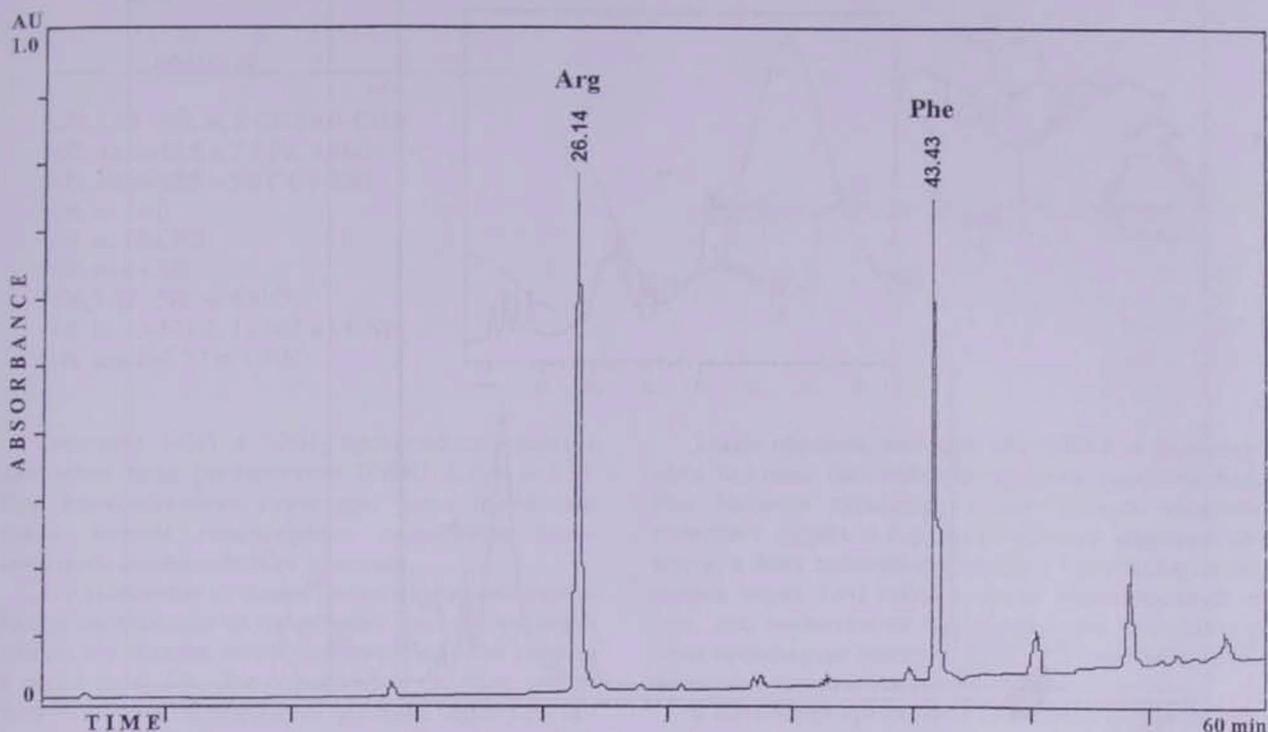


Рис.4. Хроматограмма ФТК производных продуктов кислотного гидролиза пика А. Обращенно-фазовая колонка "Biosphere Si-100 C₁₈". Применялось градиентное элюирование при температуре 55⁰ С. Элюенты – 0.05М ацетат аммония (рН6.6)/ 0.1М ацетат аммония в смеси ацетонитрил : метанол : вода (44: 10: 46; рН7.25); скорость потока – 1 мл/мин; детекция осуществлялась при 254 нм.

из вторичного порошка гипоталамуса человека соединение, соответствующее пику А, и определить его химическую структуру.

Выделение дипептида Arg-Phe из гипоталамуса человека

Методом ОФ ВЭЖХ из вторичного порошка гипоталамуса человека было выделено соединение, соответствующее пику А на пептидной карте гипоталамуса человека.

Рехроматография, представленная на рис.3, свидетельствует о гомогенности выделенного пика.

С целью определения аминокислотного состава выделенного вещества была использована методика определения аминокислот в виде фенилтиокарбамильных (ФТК) производных методом ОФ ВЭЖХ, разработанным С.Г.Чалянном и сотрудниками [7]. Для выполнения работы выделенное вещество было подвергнуто кислотному гидролизу (110⁰ С; 5.6N раствор HCl,

24ч.). Продукты кислотного гидролиза модифицировались изотиоцианатом. Полученные ФТК производные были идентифицированы методом ОФ ВЭЖХ [7]. Результаты проведенной работы (рис.4) свидетельствуют, что выделенное вещество является дипептидом, в состав которого входят две аминокислоты – фенилаланин (Phe) и аргинин (Arg) с количественным соотношением 1:1.

Для определения аминокислотной последовательности выделенного дипептида был использован метод ЯМР спектроскопии. Работа выполнялась на ЯМР-спектрометре Mercury-300 Varian (300.077 MHz). Результаты исследования подтвердили, что выделенное вещество является дипептидом, где С концевая аминокислота – фенилаланин (рис.5).

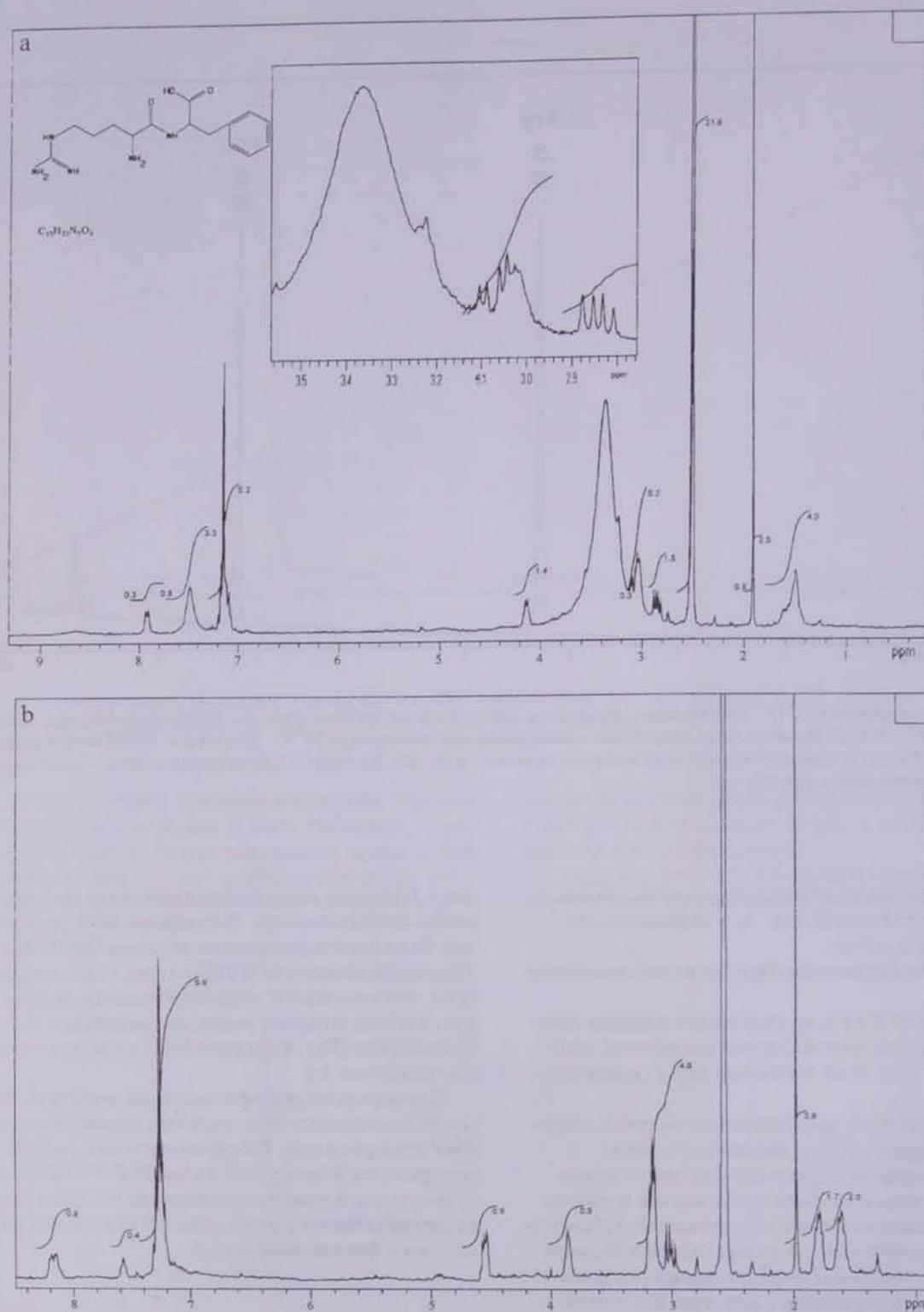
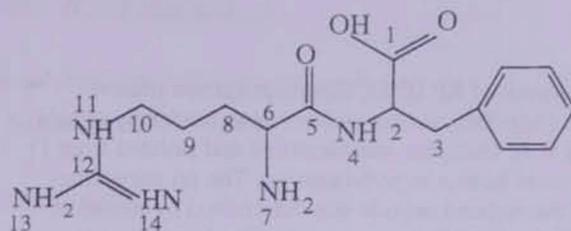


Рис.5. ЯМР спектр выделенного вещества (пик А). Растворитель: а) DMSO d_6 ; б) DMSO d_6 + CF_3COOD ; температура $30.0^\circ C$.

Параметры спектров ЯМР ^1H приведены ниже, хим.сдвиги δ , м.д.:

DMSO d_6

1.39, 1.65 (4H, м, 8-CH₂ и 9-CH₂)
 (1H, дд, J=13.5 и 7.3 Гц, 3-Ha)
 (1H, дд, J=13.5 и 5.0 Гц, 3-Hб)
 (1H, м, 2-H)
 (2H, м, 10-CH₂)
 (1H, м, 6-CH)
 7.06, 7.22 (5H, м, C₆H₅)
 (4H, ш, 13-NH-2, 11-NH и 14-NH)
 (1H, шд, J=7.7 Гц, 4-NH)



Синглеты 1-ОН и 7-NH₂ проявляются вместе с синглетом воды растворителя DMSO d_6 при $\delta=3.35$. При отожествлении структуры были применены также методы гомоядерного подавления спин-спинового взаимодействия протонов.

Для выяснения аутолитических изменений дипептида в зависимости от временного фактора мы определили его наличие не только через 6ч. после смерти, а также через 12ч. Для определения наличия дипептида Arg-Phe в гипоталамусе человека через 12ч. после смерти были использованы пять гипоталамусов человека. Исследования проводились по вышеописанному методу. В результате исследования подтвердилось, что через 12ч., так же как и через 6ч. после смерти, в гипоталамусе человека можно идентифицировать дипептид Arg-Phe с незначительным количественным изменением (поглощение – AU 0.125 – через 6ч., AU 0.118 – через 12ч. после смерти) методом ОФ ВЭЖХ.

Таким образом, методом ОФ ВЭЖХ в гипоталамусе человека был идентифицирован дипептид Arg-Phe. Наличие дипептида в гипоталамусе человека позволяет судить о его эволюционной консервативности, а факт наличия дипептида в гипоталамусе человека через 12ч. после смерти свидетельствует о том, что несмотря на аутолитические процессы, в этом промежутке времени дипептид Arg-Phe практически не подвергается изменениям.

В настоящее время нами изучаются физиологические функции этого дипептида, а также молекулярные механизмы его влияния и, в частности, влияние на активность Ca²⁺-CaM - зависимых ферментов без участия Ca²⁺ и кальмодулина.

Выражаем благодарность зав. лабораторией ЯМР спектроскопии ЦИСМ НАН РА Г.А. Паносяну за помощь, оказанную при проведении ЯМР исследования.

Поступила 23.12.02

Մարդու հիպոթալամուսից արգինին-ֆենիլալանին երկպեպտիդի անջատումը եւ նույնականացումը

Ա.Ա.Գալոյան, Ս.Գ.Զախյան, Վ.Տ.Քարամյան

ՇՖ ԲԷՀՔ մեթոդով 11 մարդկանց հիպոթալամուսում (ՀԹ) նույնականացվել և անջատվել է, նախկինում Ա.Ա. Գալոյանի կողմից խոշոր եղջերավոր անասունների ՀԹ-ից անջատված, արգինին-ֆենիլալանին երկպեպտիդը: Անջատված պեպտիդի առաջնային կառուցվածքը որոշվել է ՇՖ ԲԷՀՔ և ՄՄՌ սպեկտրաչափական մեթոդներով: Երկպեպտիդը նույնականացվել է ինչպես 6 (վեց մարդկանց

ՀԹ) այնպես էլ 12 ժամ (հինգ մարդկանց ՀԹ) մահից հետո, առանց զգալի քանակական ճարտարաբանների: Ստացված արդյունքները թույլ են տալիս դատելու երկպեպտիդի էվոլյուցիոն կայունության մասին կաթնասունների մոտ և նրա որոշակի կայունության մասին աուտոլիտիկ պրոցեսների ժամանակ մահվանից հետո շուրջ 12 ժամվա ընթացքում:

Isolation and identification of arginin-phenyl alanine dipeptide in human hypothalamus

A.A.Galoyan, S.G.Chailyan, V.T.Karamyan

By means of RP HPLC dipeptide agrinin-phenyl alanine (Arg-Phe), earlier isolated from bovine hypothalamus by A.A. Galoyan, was identified and isolated from 11 postmortem human hypothalamuses. The primary structure of the isolated peptide was determined by means of RP HPLC and NMR spectroscopy. The dipeptide was identified in 6 (six postmortem cases), as well as 12 hours

(five cases) after death without any significant quantitative differences.

This fact allows to make a conclusion about evolutionary conservation of dipeptide Arg-Phe in mammals and about its definite stability during autolysis for over 12 hours after death.

Литература

1. *Галоян А.А., Бобрускин И.Д., Гурвиц Б.Я., Абрамян Г.Э.* Нейрохимия, 1989, т. 8, 1, с. 78.
2. *Galoyan A.A., Gurvits B.Ya., Shuvalova L.A., Davis M.Y., Shively J.E., Lee T.D.* Neurochem. Res., 1992, 17, 8, p. 773.
3. *Galoyan A.A.* Biochemistry of Novel Cardioactive Hormones and Immunomodulators of the Functional System Neurosecretory Hypothalamus-Endocrine Heart. Moscow, 1997.
4. *Галоян А.А.* ДНАН РА, 1991, т. 92, 4, с. 173.
5. *Галоян А.А.* ДАН АрмССР, 1962, т. 34, 3, с. 117.
6. *Галоян А.А., Чаилян С.Г., Даниелян К.Э., и др.* Мед. наука Армении, 2002, 42, 3, с. 3.
7. *Galoyan A.A., Chailyan S.G., Danielyan K.E., Karamyan V.T., Muradyan E.B.* Determination of Phenylthiocarbamid Derivatives of Amino Acids by Means of RP HPLC. In: 3rd I.P.S.F. Scientific Symposium, October 1-5, 2002, Yerevan, Armenia.