



УДК 577.175.859'14

ИССЛЕДОВАНИЕ ФЕРМЕНТАТИВНОГО ГИДРОЛИЗА
СПЛЕНОПЕНТИНА И ЕГО АНАЛОГОВ
В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКАИсакова О. Л., Сенетов Н. Ф., Форнер К*,
Эрлих А*.*Всероссийский кардиологический научный центр
Академии медицинских наук СССР, Москва;*** Институт физиологически активных соединений Академии наук ГДР, Берлин*

Методом $^1\text{H-NMR}$ -спектроскопии исследована деградация спленопентина и его аналога N -ацетилспленопентина в сыворотке крови человека. Установлены пути деградации этих соединений и проведена оценка времени их жизни в сыворотке крови. Показано, что деградация спленопентина происходит в основном за счет отщепления остатков в N -концевой части молекулы, а N -ацетилспленопентина — за счет гидролиза пептидных связей в C -концевой части молекулы.

Тимопоетин и спленин — пептидные гормоны, участвующие в регуляции иммунного ответа, были впервые выделены соответственно из тимуса [1] и селезенки [2] телят и представляют собой гомологичные полипептиды, состоящие из 49 аминокислотных остатков [2]. Первичные структуры этих гормонов различаются лишь по положениям 34 и 43 (Asp^{34} и Ser^{43} у тимопоетина и Glu^{34} и His^{43} у спленина), в то же время их биологические функции значительно различаются. Так, тимопоетин влияет на нейромышечную передачу [3] и усиливает дифференцировку T -клеток, ингибируя при этом дифференцировку B -клеток [4]. В то же время спленин не влияет на нейромышечную передачу и усиливает дифференцировку как T -, так и B -клеток [5].

Однако для осуществления этих эффектов наличие всех 49 аминокислотных остатков не обязательно. Наиболее короткими синтетическими пептидами, которые воспроизводят биологическую активность нативных гормонов, являются пентапептиды $\text{Arg-Lys-Asp-Val-Tyr}$ и $\text{Arg-Lys-Glu-Val-Tyr}$, отвечающие участку полипептидной цепи 32–36 соответственно тимопоетина и спленина и получившие названия «тимопентин» (TP5) [6] и «спленопентин» (SP5) [5]. Эти соединения сразу привлекли к себе внимание исследователей в качестве возможных лекарственных препаратов с иммуностимулирующим действием. Однако, как известно, низкомолекулярные пептиды очень быстро инактивируются в организме под действием протеолитических ферментов. Этим объясняются особые требования к выбору способа их введения в организм и существенное ограничение возможностей их использования в качестве лекарственных препаратов [7, 8]. Поэтому одной из основных задач исследователей стал поиск синтетических аналогов тимопентина и спленопентина, обладающих тем же спектром биологической активности и большей устойчивостью к энзиматическому расщеплению [9]. Существенную помощь в решении этой проблемы оказывает информация о путях деградации пептидов в различных тканях, которая позволяет установить, какие связи прежде всего следует защитить для создания устойчивых аналогов.

В настоящей работе мы провели исследование деградации в сыворотке крови человека спленопентина и его аналога N -ацетилспленопентина (AcSP5). Следует отметить, что до настоящего времени литературные данные о путях деградации спленопентина в организме и, в частности в сыворотке крови, отсутствуют, в то время как изучению ферментативного

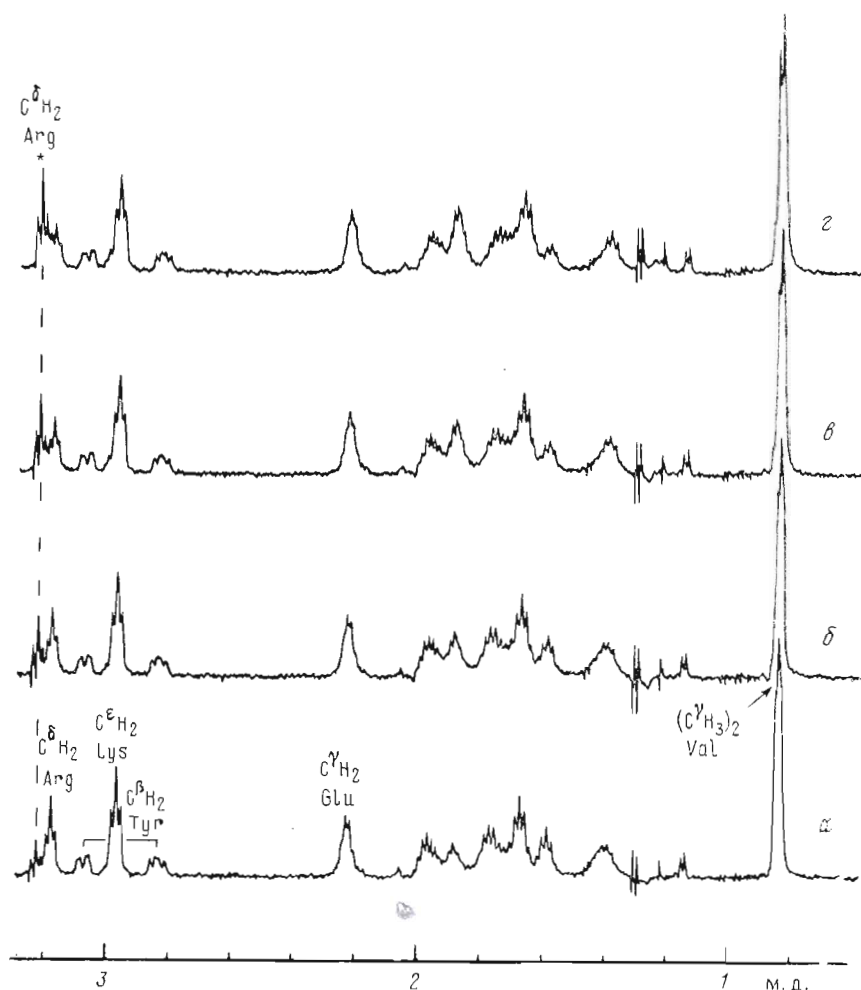


Рис. 1. Дифференциальные спектры спинного эха 1H -ЯМР, зарегистрированные через 2 (а), 5 (б), 8 (в), 11 мин (г) после добавления SP5 в сыворотку крови. Звездочкой обозначен сигнал $C^{\delta}H_2$ свободного аргинина. Условия определения (здесь и далее): 500 МГц, концентрация пептида 0,5 мг/мл, $37^{\circ}C$

гидролиза тимопентина посвящено несколько работ и предложена схема его распада в сыворотке крови [7, 10]. Дегградацию спленопентина и его аналога изучали с помощью метода протонного магнитного резонанса, особенности использования которого для решения подобных задач детально рассмотрены в работах [11–13]. В спектрах, полученных через различные промежутки времени после добавления спленопентина в сыворотку крови и соответствующих начальному этапу дегградации этого пептида (изображена спектральная область, в которой происходящие изменения заметны наиболее явно), наблюдается сигнал при 3,239 м.д., интенсивность которого с течением времени увеличивается (рис. 1). На основании характерных значений химических сдвигов этот сигнал был отнесен нами к $C^{\delta}H_2$ -группе свободного аргинина, что было доказано добавлением аргинина в систему. Появление свободного аргинина в среде инкубации свидетельствует о гидролизе связи Arg-Lys. Сигналов других свободных аминокислот или фрагментов спленопентина, кроме Lys-Glu-Val-Tyr, появляющихся одновременно с сигналами от свободного аргинина, зарегистрировано не было (рис. 1), что позволяет утверждать, что отщепление N-концевого остатка аргинина — основной путь инактивации спленопентина в сыворотке крови.

Следующий этап дегградации — гидролиз связи Lys-Glu во фрагменте

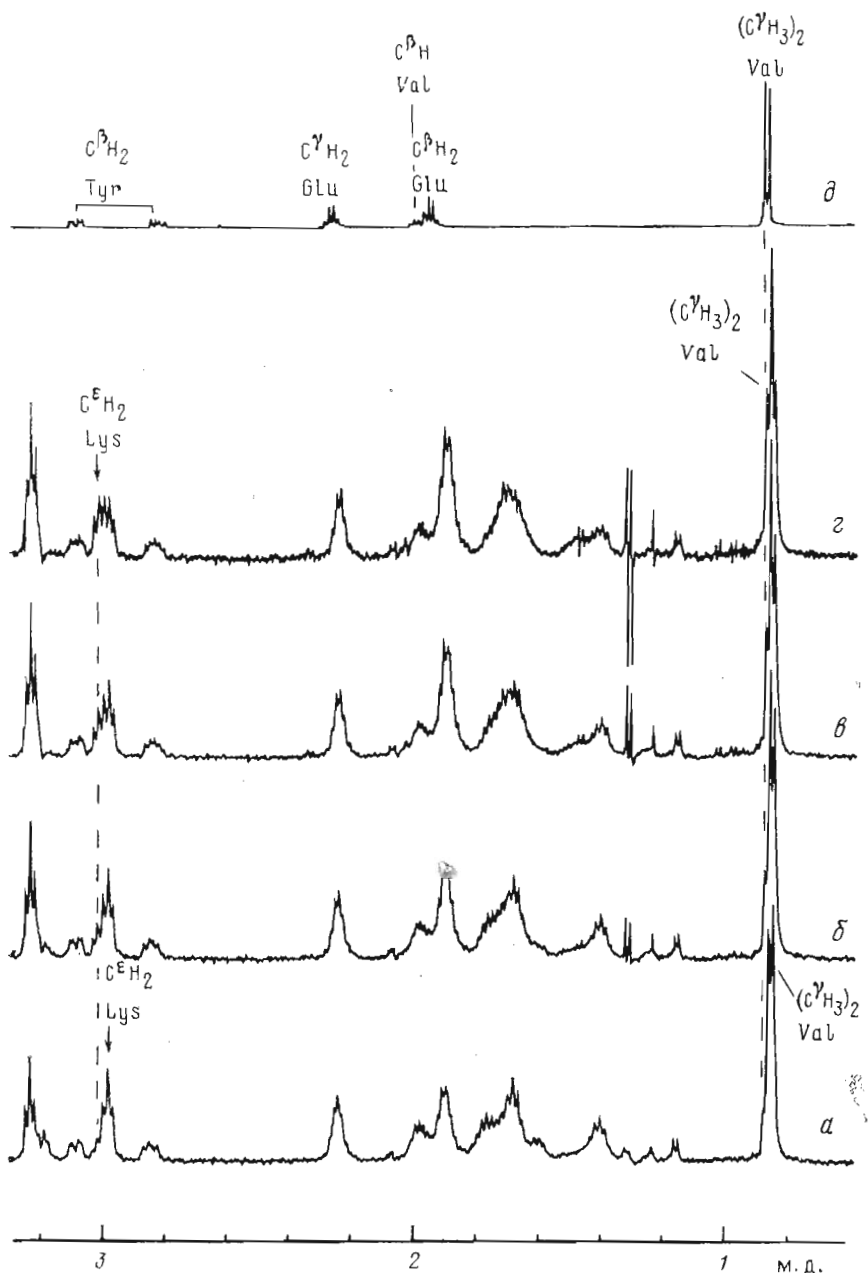


Рис. 2. Дифференциальные спектры спинного эха ^1H -ЯМР, зарегистрированные через 14 (а), 20 (б), 26 (в), 32 мин (г) после добавления SP5 в сыворотку крови (звездочкой обозначен сигнал $\text{C}^\epsilon \text{H}_2$ свободного лизина), и спектр синтетического пептида Glu-Val-Tyr (д)

Lys-Glu-Val-Tyr, что было зарегистрировано по сигналам при 3,023 м. д. от $\text{C}^\epsilon \text{H}_2$ -группы свободного лизина и по сигналам при 0,898 м. д., относящимся к остатку валина в составе пептида Glu-Val-Tyr (рис. 2). Отнесение этих сигналов было доказано добавлением свободного лизина в среду инкубации и путем сравнения со спектром синтетического пептида Glu-Val-Tyr (рис. 2г).

Дальнейшие изменения, происходящие в системе вплоть до полной деградации сывороточного белка до свободных аминокислот, видны из спектров, представленных на рис. 3. Сигналы при 2,347 м. д. были отнесены нами к $\text{C}^\epsilon \text{H}_2$ -группе свободной глутаминовой кислоты, а при 0,905 м. д. — к сигналам

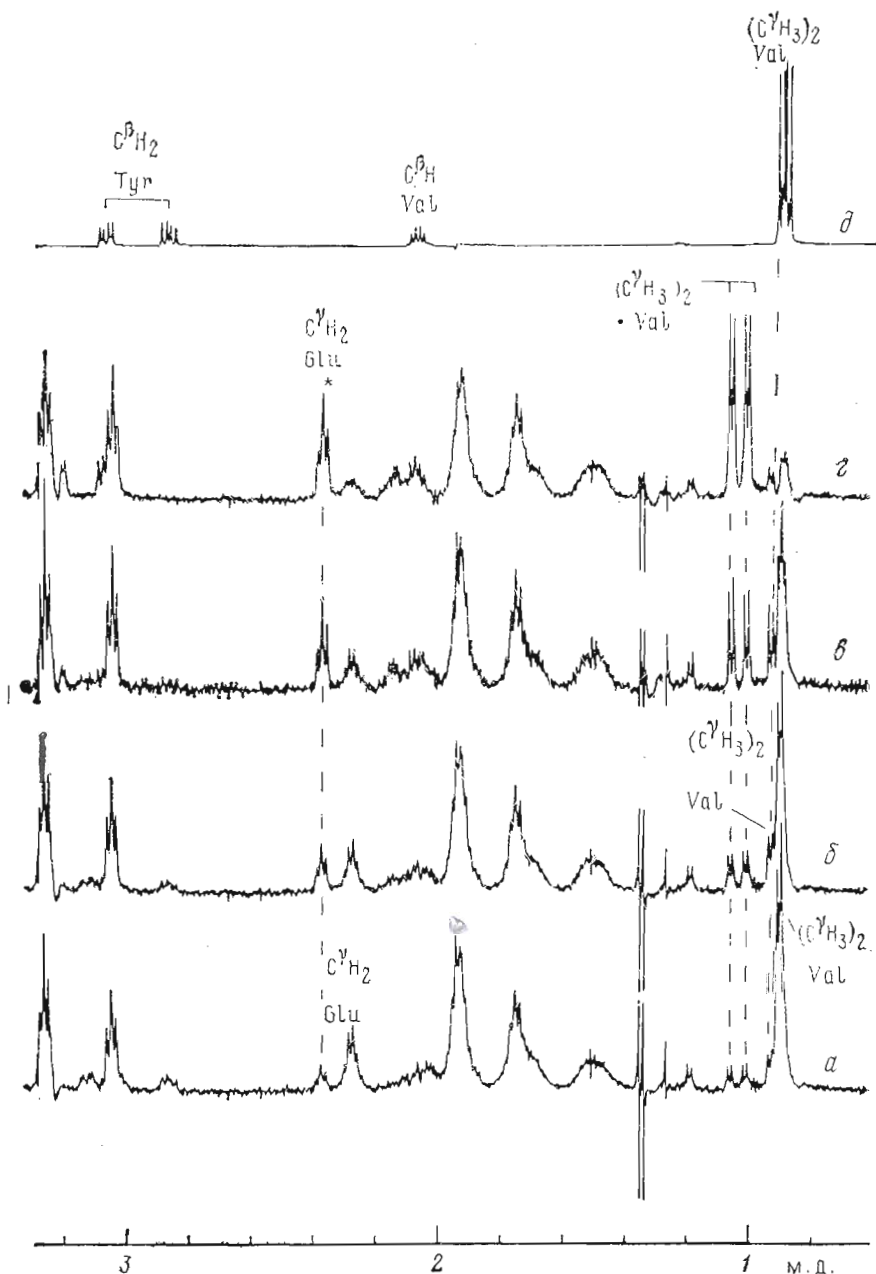


Рис. 3. Дифференциальные спектры спинного эха ^1H -ЯМР, зарегистрированные через 59 (а), 89 (б), 134 (в), 299 мин (г) после добавления SP5 в сыворотку крови (звездочкой обозначен сигнал $\text{C}^{\gamma}\text{H}_2$ свободной глутаминовой кислоты), и спектр синтетического пептида Val-Tyr (д)

лам остатка валина в составе дипептида Val-Tyr. Их появление в спектре, таким образом, свидетельствует о гидролизе связи Glu-Val. При этом скорость появления сигнала при 2,347 м. д. заметно ниже скорости появления свободных Arg и Lys (ср. рис. 3, 2, 1). Следовательно, образовавшийся в результате гидролиза связи Lys-Glu трипептид Glu-Val-Tyr обладает более высокой стабильностью в сыворотке крови по сравнению со спленопептином и des-Arg-спленопептином. Распад дипептида Val-Tyr на свободные аминокислоты Val и Tyr мы регистрировали по сигналам при 1,033 и 0,985 м.д. ($\text{C}^{\gamma}\text{H}_3$ -группы свободного валина) и при 7,195 и 6,899 м. д. (ароматические протоны свободного Tyr). Следует отметить, что вплоть

до образования свободной глутаминовой кислоты в результате последовательного отщепления остатков Arg, Lys, Glu ни дипептида Val-Tyr, ни свободной глутаминовой кислоты в системе зарегистрировано не было.

Таким образом, на основании полученных нами данных можно утверждать, что деградация спленопептина в сыворотке крови происходит путем последовательного отщепления аминокислотных остатков в N-концевой части молекулы.

Для фармакологических исследований наряду с качественным описанием путей деградации пептида большое значение имеют количественные характеристики начальных этапов деградации, приводящих к исчезновению исходного пептида. В нашем случае таким этапом является реакция ферментативного гидролиза связи Arg-Lys. Для определения характеристик этой реакции мы использовали зависимость времени полураспада пептида $t_{1/2}$ от начальной концентрации пептида s_0 (рис. 4). Отказ от традиционных методов анализа ферментативных реакций, основанных на измерении начальных скоростей, при исследованиях методом ЯМР обусловлен как низкой чувствительностью метода, так и тем, что значения первых точек кинетической кривой определяются в ЯМР-экспериментах с наибольшей ошибкой, поскольку из-за неустановившейся температуры в образце в течение первых нескольких минут резонансные линии в спектре могут быть уширены. Аналитическое выражение зависимости $t_{1/2}$ (s_0) может быть получено путем интегрирования классического уравнения Михаэлиса — Ментен. При этом, если в реакции участвует один фермент, время полураспада линейно зависит от начальной концентрации субстрата:

$$t_{1/2} = s_0 / 2V_{\max} + (K_m / V_{\max}) \ln 2$$

и график зависимости $t_{1/2}$ (s_0) представляет собой прямую, тангенс угла наклона которой равен $1/2 V_{\max}$, а отрезок, отсекаемый на оси ординат, равен $K_m / V_{\max} \ln 2$ (K_m — константа Михаэлиса, V_{\max} — максимальная скорость реакции). Зависимость времени полураспада спленопептина от начальной концентрации этого пептида может быть аппроксимирована прямой линией, время жизни спленопептина при концентрациях ниже 10^{-5} М составляет ~ 2 мин, а константа Михаэлиса реакции отщепления аргинина — 0,267 мМ (рис. 4).

Быстрая деградация спленопептина в сыворотке крови, очевидно, обусловлена действием аминопептидаз сыворотки, поэтому представляет интерес изучение путей деградации аналогов спленопептина с блокированной аминокислотной группой. Мы исследовали ферментативный гидролиз N-ацетилспленопептина (AcSP5). В ходе деградации этого пептида (рис. 5) наблюдалось одновременное появление характерных сигналов при 1,033 и 0,985 м. д., относящихся к C^1H_3 -группам свободного валина, и при 7,195 и 6,899 м. д., относящихся к ароматическим протонам свободного тирозина, интенсивность которых с течением времени увеличивалась вплоть до полного исчезновения сигналов от исходного пептида. При этом сигналов от других свободных аминокислот не наблюдалось. Появление в системе валина и тирозина может быть вызвано как последовательным отщеплением остатков этих аминокислот от исходного пептида, так и гидролизом связи Glu-Val с образованием дипептида Val-Tyr, который распадается на свободные аминокислоты. Чтобы выяснить, какой из этих путей в действительности реализуется, необходимо использование специфических ингибиторов карбоксипептидаз. Однако сравнение с литературными данными о путях деградации тимопептина в сыворотке крови человека [10], согласно которым скорость гидролиза связи Val-Tyr тимопептина существенно меньше, чем других связей этого пептида, указывает на то, что более вероятной является деградация AcSP5 за счет гидролиза связи Glu-Val с последующим расщеплением дипептида Val-Tyr на свободные аминокислоты.

Проведенная на основании анализа кривой зависимости $t_{1/2}$ (s_0) оценка времени полураспада N-ацетилспленопептина показала, что эта величина составляет ~ 180 мин, что на два порядка превышает время полураспада в сыворотке крови спленопептина. Столь значительное увеличение времени

Рис. 4. Экспериментальная кривая зависимости времени полураспада спленопептина в сыворотке крови ($t_{1/2}$) от начальной концентрации пептида (s_0)

Рис. 5. Дифференциальные спектры спинного эха ^1H -ЯМР, зарегистрированные через 7 (а), 56 (б), 140 мин (в) после добавления AcSP5 в сыворотку крови. Звездочкой обозначены сигналы C^1H_3 свободного валина, крестом — сигнал Glu в составе Ac-Arg-Lys-Glu. Концентрация AcSP5 0,25 мг/мл

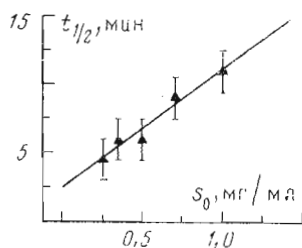


Рис. 4

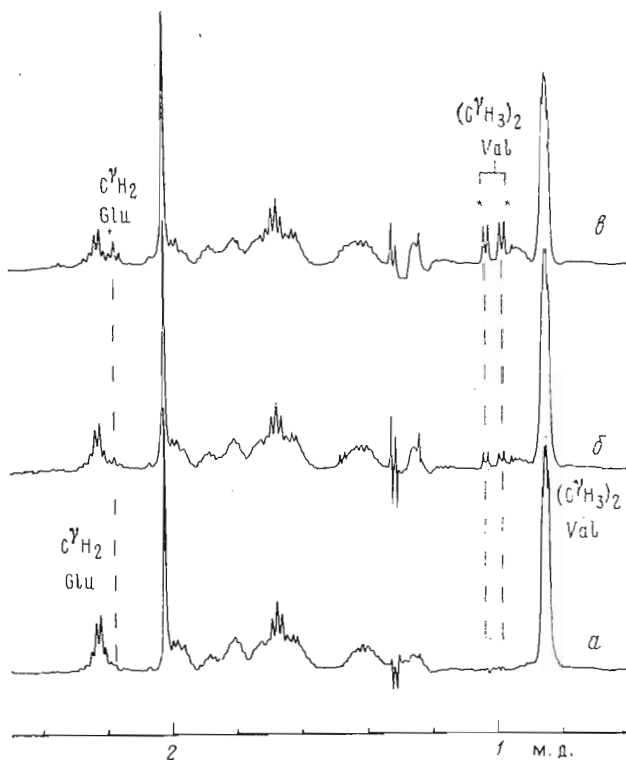


Рис. 5

жизни в сыворотке крови, наблюдаемое при ацетилировании N-концевого остатка спленопептида, весьма неожиданно, поскольку, согласно литературным данным, защита обеих концевых групп тимопептина (аналог Ac-TP5-NH₂) приводит к увеличению времени полураспада с 1 мин лишь до 40 мин. Возможно, высокая стабильность AcSP5 в сыворотке крови обусловлена конформационными особенностями этого пептида.

Полученные данные о ферментативном расщеплении AcSP5 указывают на то, что деградация SP5 за счет гидролиза связей в C-концевой части молекулы, очевидно, также возможна, однако этот процесс происходит существенно медленнее, чем последовательное отщепление остатков в N-концевой части молекулы.

На основании проведенных исследований можно утверждать, что инактивация спленопептина в сыворотке крови человека происходит за счет последовательного отщепления остатков в N-концевой части молекулы, в то же время ацетилирование остатка аргинина SP5 предотвращает гидролиз N-концевой части молекулы и существенно увеличивает время жизни пептида.

Экспериментальная часть

Спектры ^1H -ЯМР получены на спектрометре WM-500 (Bruker, ФРГ) с рабочей частотой 500 МГц при 37° С. Химические сдвиги в спектрах ^1H -ЯМР измерены относительно внутреннего стандарта натриевой соли 2,2-диметил-2-силапентан-5-сульфоната. Отнесение сигналов в спектрах сделано с помощью метода двойного резонанса. Для выделения сигналов от протонов пептида на фоне интенсивных сигналов от белков и липидов сыворотки крови использовали сочетание методики спинного эха Карра — Парселла — Мейбум — Гилла и дифференциальной спектроскопии. Для получения спектров спинного эха использовалась стандартная импульсная последовательность $90^\circ - \tau - (180^\circ - 2\tau)_n - 180^\circ - \tau$ ($\tau = 0,0003$ с, $n = 200$). Из спектров спинного эха, зарегистрированных в ходе деградации пептидов

в сыворотке крови, вычитался соответствующий спектр сыворотки, зарегистрированный до добавления в нее пептида. Сыворотку крови получали согласно [12].

Исследованные нами пептиды были синтезированы классическими методами пептидной химии в растворе путем последовательного наращивания аминокислотной цепи по одной аминокислоте методом смешанных ангидридов карбобензокси- или *трет*-бутилоксикарбониламино кислот. Для карбоксильной функции С-концевого тирозина и боковых функциональных групп использовались защиты бензильного типа. Защитные группы удаляли с помощью ацидолитического расщепления и каталитического гидрогенолиза. Чистота полученных соединений подтверждена спектрами ¹H-ЯМР.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Goldstein G. // Nature. 1974. V. 247. № 1. P. 11-14.
2. Audhya T., Schlesinger D. H., Goldstein G. // Biochemistry. 1981. V. 20. № 21. P. 6195-6200.
3. Basch R. S., Goldstein G. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1974. V. 71. № 6. P. 1474-1478.
4. Scheid M. P., Goldstein G., Boyse E. A. // Exp. Med. 1978. V. 147. № 8. P. 1727-1743.
5. Audhya T., Scheid M. P., Goldstein G. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1984. V. 81. № 9. P. 2847-2849.
6. Goldstein G., Scheid M. P., Boyse E. A., Schlesinger D. H., Van Wauwe J. // Science. 1979. V. 204. № 4399. P. 1309-1310.
7. Audhya T., Goldstein G. // Int. J. Peptide and Protein Res. 1983. V. 22. № 2. P. 187-193.
8. Survey of immunological research/Ed. Sundal E. 1985. V. 4. № 51. Suppl.
9. Heavner G. A., Kroon D. J., Audhya T., Goldstein G. // Peptides. 1986. V. 7. № 6. P. 1015-1019.
10. Tischio J. P., Patrick J. E., Weintraub H. S., Chasin M., Goldstein G. // Int. J. Peptide and Protein Res. 1979. V. 14. № 5. P. 479-484.
11. Vandenberg J. I., King G. F., Kuchel P. W. // Arch. Biochem. and Biophys. 1985. V. 242. № 2. P. 515-522.
12. Исакова О. Л., Сенеров Н. Ф., Беспалова Ж. Д., Бушуге В. Н., Виноградов В. А., Рыuge Э. К., Тугов М. И. // Биоорган. химия. 1986. Т. 12. № 1. С. 106-111.
13. Сенеров Н. Ф., Исакова О. Л., Дейгин В. И., Тугов М. И., Рыuge Э. К. // Докл. АН СССР. 1987. Т. 296. № 2. С. 491-496.

Поступила в редакцию
13.VII.1988

ENZYMATIC HYDROLYSIS OF SPLENOPENTIN AND ITS ANALOGUES IN HUMAN SERUM

ISAKOVA O. L., SEPETOV N. F., FORNER K.*, ERLICH A.*

All-Union Research Centre for Cardiology,
Academy of Medical Sciences of the USSR, Moscow;
* Institute of Drug Research, GDR Academy of Sciences, Berlin

Degradation of immunoactive peptide splenopentin and its analogue N-acetylsplenopentin in human serum has been investigated by ¹H NMR spectroscopy. It is shown that degradation of splenopentin occurs due to hydrolysis of peptide bonds in its N-terminal part, whereas in N-acetylsplenopentin peptide bonds in C-terminal part of the molecule are cleaved. Degradation pathways and life times of these peptides in human serum are established.