



УДК 577.112.088.3 : 577.112.5

© 1993 С. А. Гурьянов, Л. А. Фомина, А. А. Михайлова

## ВЫДЕЛЕНИЕ И ОПРЕДЕЛЕНИЕ СТРУКТУРЫ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ПЕПТИДОВ КОСТНО-МОЗГОВОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

*Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина  
и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва*

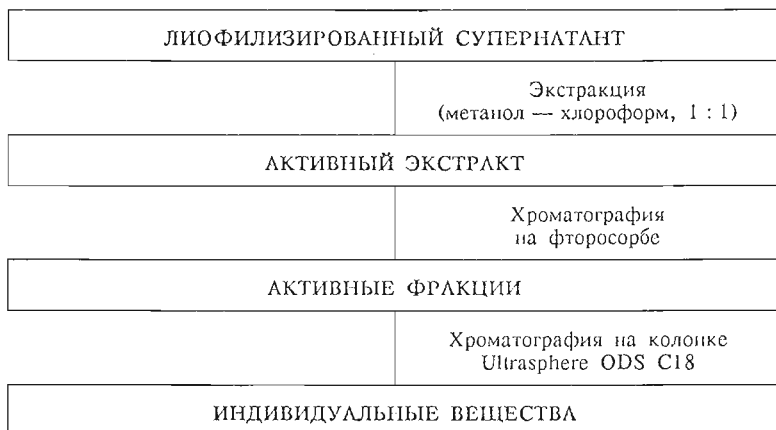
Из супернатанта культуры клеток костного мозга свиней выделены два гексапептида, влияющих на болевую чувствительность, и определена их первичная структура: Leu-Val-Val-Tyr-Pro-Trp и Phe-Leu-Gly-Phe-Pro-Thr. Синтез пептидов проведен твердофазным методом. По физико-химическим свойствам и биологической активности синтетические пептиды идентичны выделенным.

Известно, что клетки костного мозга продуцируют ряд гуморальных медиаторов, обладающих широким спектром биологических активностей. Показано, что низкомолекулярные факторы костно-мозгового происхождения (миелопептиды) проявляют иммунорегуляторную [2, 3], дифференцировочную [4, 5] и нейротропную активности [6]. Выделение таких биорегуляторов в индивидуальном состоянии и изучение их строения исключительно важно как для выяснения молекулярных механизмов функционирования иммунной и кровяной систем, так и для создания лекарственных препаратов эндогенной природы направленного действия. Данная работа посвящена выделению и изучению строения миелопептидов, влияющих на болевую чувствительность.

В качестве исходного материала в работе использовали супернатант 18-часовой культуры клеток костного мозга свиней в бессывороточной среде 199, содержащей гентамицин. Активные соединения из супернатанта выделяли в соответствии со схемой. На первой стадии очистки проводили экстракцию лиофилизованного супернатанта смесью хлороформ — метанол (1 : 1). Это позволило освободиться от высокомолекулярных соединений и многих компонентов среды. Определение биологической активности полученного экстракта показало, что он обладает всеми видами активности, присущими исходному супернатанту. Дальнейшее разделение активного материала осуществляли методом обращенно-фазовой хроматографии низкого давления. В качестве носителя использовали макропористое стекло с диаметром частиц 0,1 мкм и диаметром пор 2000 Å, модифицированное перфторированным полимером (фторосорб), который ранее успешно применялся для выделения белков, нуклеиновых кислот и пептидов [7, 8]. Вещества элюировали в градиенте концентрации ацетонитрила в 0,1% водной трифторуксусной кислоте. В связи с крайне низким содержанием целевых продуктов в разделяемой смеси и наличием большого количества неактивных примесей оптические методы детекции на этой стадии разделения оказались непригодными, поэтому контроль

В работе использовались сокращения, рекомендованные IUPAC—IUB [1]; MP — миелопептиды, HEPES — 4-(2-оксипропил)пиперазин-1-этансульфоновая кислота, Pth — фенилтиогидантоин, TFA — трифторуксусная кислота.

Общая схема выделения биологически активных  
веществ из супернатанта культуры клеток  
костного мозга



за ходом разделения осуществляли биологическими методами. Для выявления активных соединений было проведено тотальное тестирование 23 полученных фракций на наличие в них биологических активностей (таблица).

По данным биологического тестирования, одной из наиболее интересных была фракция 11, так как проявляла два типа активности: иммунорегуляторную и нейротропную. Дальнейшее исследование фракции и выделение активных соединений проводили методом высокоэффективной обращенно-фазовой хроматографии на колонке Ultrasphere ODS C18 (рисунок). Тестирование полученных при этом фракций на иммуностимулирующую и нейротропную активности показало, что пик 1 содержит вещество, проявляющее иммуностимулирующую активность, а пик 2 отвечает веществу, влияющему на болевую чувствительность. Эти вещества были выделены в тех же условиях и подвергнуты секвенированию на газофазном секвенаторе. По данным аминокислотного анализа, вещество с иммуностимулирующей активностью является пептидом, однако попытки его секвенирования к успеху не привели, что, по-видимому, объясняется блокированием его N-концевой аминокислотной группы. Для определения структуры этого соединения требуется наработка больших количеств исходного материала. Секвенирование вещества пика 2, проявляющего нейротропную активность, показало наличие в нем двух пептидов. По результатам их выделения и данным высоковольтного капиллярного электрофореза, эти пептиды имеют близкие физико-химические свойства. Из-за крайне низкого содержания биологически активных веществ в супернатанте клеток костного мозга эти пептиды доступны в ограниченных количествах, поэтому их аминокислотные последовательности определяли без разделения смеси на отдельные компоненты. Секвенирование проводили на автоматическом секвенаторе, идентифицируя отщепляющиеся аминокислоты в виде их PTh-производных. После 7-го цикла деградации наблюдались лишь следовые количества фенилтиогидантоинов аминокислот. Секвенирование показало наличие в смеси двух гидрофобных гексапептидов следующего строения: Leu-Val-Val-Tyr-Pro-Trp (I) и Phe-Leu-Gly-Phe-Pro-Thr (II).

Для подтверждения структуры и изучения корреляции биологических свойств с конформационным поведением выделенных пептидов был проведен их синтез. Синтез пептидов (I) и (II) осуществляли твердофазным методом. Идентичность структуры синтезированных пептидов выделенным подтверждалась данными <sup>1</sup>H-ЯМР-спектроскопии. Поведение синтетических пептидов при высокоэффективной хроматографии на колонках с обращенной фазой C18 было подобно природным.

Влияние синтезированных пептидов на болевую чувствительность в тесте «горячей пластины» не отличалось от активности соответствующих выделенных

Представлены результаты пяти экспериментов

Активность	Фракция **									
	1	2	4	8	9	10	11	14	15	21
Иммунорегуляторная, Кстим. АОК	—	—	—	1,58	2,40	2,15	1,90	1,80	1,97	1,60
Дифференцировочная, % к контролю	60	42	—	—	—	—	—	58	26	—
Болевая чувствительность, изменение латентного периода, % к контролю	—	—	179	—	—	144	151	—	—	—

\* См. «Экспериментальную часть».

\*\* Фракции 3, 5, 6, 7, 12, 13, 16—20, 22, 23 неактивны.

соединений. Так, смесь пептидов из фракции 11 повышала порог болевой чувствительности мышей на 20% по сравнению с контрольной группой. Смесь синтетических пептидов также проявляла гипоальгетический эффект, повышая порог болевой чувствительности на ~18%.

Поиск гомологий полученных структур по банку данных известных белковых последовательностей [9] показал, что пептид (I) соответствует фрагменту 31—36  $\beta$ -цепи, а пептид (2) — фрагменту 33—38  $\alpha$ -цепи гемоглобина свиньи. Эти последовательности являются высококонсервативными фрагментами гемоглобинов позвоночных.

Известно несколько фрагментов гемоглобина, обладающих анальгетической активностью. К ним относятся геморфин-4 [10], неокиоторфин [11], а также валорфин [12] — фрагменты  $\beta$ -цепи гемоглобина. Выделенные нами пептиды дополняют этот ряд. Данные пептиды присутствовали в различных партиях супернатанта культуры клеток костного мозга, полученных при его наработке в течение длительного периода времени, хотя их содержание, так же как и содержание других выделяемых из супернатанта активных соединений, варьирует в достаточно широких пределах. Выделенные пептиды могут быть продуктами метаболизма клеток костного мозга, а также образовываться из гемоглобина эритроцитов вследствие его протеолитического расщепления в процессе инкубации клеток костного мозга. Анализ пространственной структуры молекулы гемоглобина показал, что выделенные пептиды локализованы на экспонированных участках цепей гемоглобина, однако трудно представить, что такой специфический протеолиз может быть вызван действием протеиназ, присутствующих в супернатанте культуры клеток костного мозга. Поэтому, несмотря на выявленное подобие пептидов (I) и (II) фрагментам цепей гемоглобина, вопрос об их происхождении остается открытым и требует дальнейшего изучения.

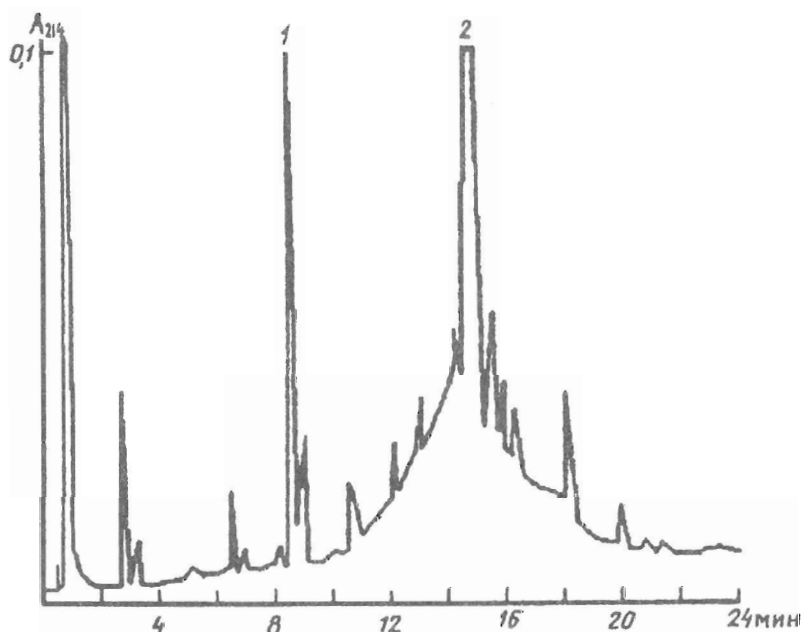
### Экспериментальная часть

В работе использовали ацетонитрил и трифторуксусную кислоту фирмы Fluka (Швейцария).

**Получение супернатанта.** Клетки костного мозга свиньи культивировали 18 ч при 37° С в среде 199, содержащей 10 мМ НЕРЕС, 2 мМ *L*-глутамин и 50 мкг/мл гентамицина. После инкубирования супернатант центрифугировали при 9000 об/мин и лиофилизовали.

**Экстракция.** 600 г лиофилизованного супернатанта суспендировали в 4 л смеси метанол — хлороформ (1 : 1) и выдерживали 24 ч при 8° С. Осадок отфильтровывали, промывали на фильтре смесью метанол — хлороформ (1 : 1) и объединенные фильтраты упаривали. Получили 220 мг сухого остатка.

**Хроматография на фторосорбе.** Полученный остаток растворяли в 10 мл



Профиль элюции фракции 11 на колонке (0,2×15 см) Ultrasphere ODS C<sub>18</sub> в градиенте концентрации ацетонитрила (0—60%, 25 мин) в 0,1% трифторуксусной кислоте. Скорость элюции 1 мл/мин. Отмечены активные подфракции, проявляющие иммуностимулирующую (1) и анальгетическую (2) активность

воды, центрифугировали и наносили на колонку (2,5×35 см) с фторосорбom, уравновешенным буфером А (0,1% TFA). Колонку промывали 50 мин буфером А, далее 150 мин вели элюцию в градиенте концентрации ацетонитрила (0—50%) в буфере А. Скорость элюции 2 мл/мин. Отбор фракций начинали через 15 мин после начала элюции градиентом. Объем отбираемых фракций 25 мл. Фракции лиофилизовали и анализировали на биологическую активность.

**Обращенно-фазовая ВЭЖХ.** Фракцию 11 (0,1 мг) хроматографировали на колонке (0,2×15 см) Ultrasphere ODS C<sub>18</sub> (Beckman, США), наносили на колонку и элюировали градиентом ацетонитрила (0—60%) в 0,1% TFA. Скорость элюции 1 мл/мин. Детектирование вели на проточном спектрофотометре Spectroflow 757 (Kratos, США) при длине волны 214 нм. Получили 1,5 нмоль активного вещества (пик 2, рис. 1).

**Определение аминокислотной последовательности пептидов** проводили на газофазном секвенаторе (модель 477А фирмы Applied Biosystem (США)), соединенном с автоматическим анализатором фенилтиогидантоинов аминокислот (модель 120А той же фирмы). На стеклянный фильтр реактора секвенатора наносили 25 мкл водного раствора, содержащего 3 мкг полибрена, высушивали фильтр в токе аргона, проводили три цикла отщепления для очистки фильтра от фона аминокислот, наносили раствор 100 пкмоль пептида в 25% TFA (3×30 мкл), высушивая каждую аликвоту в токе аргона. Проводили 10 циклов анализа, используя стандартные программы отщепления, разделения, идентификации фенилтиогидантоинов аминокислот.

Высоковольтный капиллярный электрофорез проводили на приборе Applied Biosystem 270А (США).

Аминокислотный анализ кислотного гидролизата образца осуществляли по стандартной методике [13].

Пептиды (I) и (II) синтезировали твердофазным методом на смоле Меррифила на приборе Biosearch 9600 (США) в режиме с:FDI PCDI.p96.

Имуностимулирующую активность выделенных соединений определяли в модели *in vitro* по стимуляции антителообразования ( $K_{\text{стим. АОК}}$  равна отношению

числа антителообразующих клеток в эксперименте к контролю) в культуре клеток лимфоузлов мышей на пике вторичного иммунного ответа на корпускулярный (эритроциты барана) антиген [14].

Влияние фракций и выделенных пептидов на порог болевой чувствительности определяли методом «горячей пластины» [15].

Дифференцировочную активность фракций оценивали по их способности вызывать терминальную дифференцировку лейкозных клеток линии HL-60, регистрируя изменение соотношения синтеза ДНК и белка по включению [<sup>3</sup>H]тимидина и [<sup>14</sup>C]лизина соответственно [4].

Авторы благодарят О. Г. Яновского и Е. А. Кириллину за проведение биологических испытаний и И. В. Назимова за определение аминокислотной последовательности пептидов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. IUPAC—IUB Commission on Biochemical Nomenclature // *J. Biol. Chem.* 1972. V. 247. P. 977—983.
2. Petrov R. V., Mikhailova A. A., Stepanenko R. N., Zakharova L. A. // *Cell Immunol.* 1975. V. 17. P. 342—346.
3. Petrov R. V., Mikhailova A. A., Sergeev Yu. O., Sorokin S. V. // *Immunology and Immunopharmacol.* 1987. V. 3. P. 88—93.
4. Стрелков Л. А., Михайлова А. А. // *Иммунология.* 1989. Т. 6. С. 42—45.
5. Стрелков Л. А., Степаненко Р. Н., Иванушкин Е. Ф., Михайлова А. А. // *Иммунология.* 1989. Т. 1. С. 74—77.
6. Zakharova L. A., Belevskaya R. I., Yanovskii O. G. // *Biomed. Sci.* 1990. V. 1. P. 139—143.
7. Сабуров В. В., Муйдинов М. Р., Гурьянов С. А., Катаев А. Д., Туркин С. И. // *Журн. физ. химии.* 1991. Т. 65. С. 2692—2697.
8. Saburov V. V., Vener T. I., Gilyarevsky S. D., Ivanov S. V. // *Abstracts 14-th International Congress on Biochemistry, Prague.* 1988. V. 1. P. 235.
9. Protein Identification Resource (PIR), Release 25.0, June 1990 (USA).
10. Brantl V., Cramsch Ch., Lottspeich F., Mertz R., Jacger K. H., Herz A. // *Eur. J. Pharmacol.* 1986. V. 125. P. 309—310.
11. Zhu Y. X., Usi K. L., Chen Z. G. // *FEBS Lett.* 1986. V. 208. P. 253—257.
12. Erchezyi J., Kastin A. J., Zadina J. E., Qiu X.-D. // *Int. J. Peptide and Protein Res.* 1992. P. 477—484.
13. Moore S., Stein W. H. // *Meth. Enzymol.* 1963. V. 8. P. 819—831.
14. Jerne N. K., Nordin A. A. // *Science.* 1983. V. 140. P. 405.
15. Anker S. U. // *Eur. J. Pharmacol.* 1974. V. 27. P. 1—4.

Поступила в редакцию  
23.III.1993

S. A. Gur'yanov, L. A. Fonina, A. A. Mikhailova

### ISOLATION AND PRIMARY STRUCTURE OF PEPTIDES OF THE BONE MARROW ORIGIN

M. M. Shemyakin and Yu. A. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry,  
Russian Academy of Sciences, Moscow

Two hexapeptides affecting pain sensitivity were isolated from the bone marrow cells supernatant, shown to have primary structure Leu-Val-Val-Tyr-Pro-Trp and Phe-Leu-Gly-Phe-Pro-Thr, and synthesized by the solid phase method. In physicochemical and biological properties the synthetic peptides were identical to the peptides isolated.