



УДК 577.122.2

ПРОТЕОЛИТИЧЕСКАЯ ДЕГРАДАЦИЯ ГЕМОГЛОБИНА В ЭРИТРОЦИТАХ ПРИВОДИТ К ОБРАЗОВАНИЮ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ПЕПТИДОВ

© 1998 г. А. А. Карелин[#], М. М. Филиппова, О. Н. Яцкин,
Е. Ю. Блищенко, И. В. Назимов, В. Т. Иванов

*Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
117871, Москва, ГСП-7, ул. Миклухо-Маклая, 16/10*

Поступила в редакцию 04.09.97 г. Принята к печати 10.12.97 г.

Исследовано образование биологически активных фрагментов гемоглобина в эритроцитах человека. Установлены структуры 33 пептидов – фрагментов внутриэритроцитарной деградации белков. На основании анализа последовательностей этих пептидов предложена модель постадийного расщепления цепей α - и β -глобинов. Исследованы процессы пептидообразования в бесклеточной системе лизата эритроцитов. Показано участие в протеолизе гемоглобина ферментативного комплекса мембранной фракции клеток. Установлено, что клетки переживающей культуры эритроцитов человека способны экскретировать короткие (5–20 а.о.) пептиды, и определены структуры 36 таких пептидов. Исследована динамика этого процесса, и получены предварительные данные о ее энергезависимости. На основании полученных результатов предложена модель, описывающая функционирование эритроцитов как эндокринной железы.

Ключевые слова: гемоглобин, протеолитические фрагменты; переживающая культура эритроцитов; экскреция.

Результатом ряда работ, посвященных выделению из различных тканей млекопитающих эндогенных пептидов и изучению их биологической активности, явилась идентификация активных олигопептидов, идентичных по аминокислотным последовательностям фрагментам последовательности гемоглобина (см. обзор [1]). Если первоначально идентификацию таких структур относили к артефактам [2] или считали совпадение последовательностей случайностью [3], то по мере накопления экспериментального материала подобными результатами уже стало невозможно пренебрегать в силу большого количества идентифицированных веществ и разнообразных проявлений активности в биохимических и физиологических тестах. К настоящему моменту из различных источников выделено около 200 эндогенных фрагментов гемоглобина, причем около 50 из этих пептидов биологически активны как *in vitro*, так и *in vivo* [4–11].

Проводимые в последнее время работы по исследованию компонентного состава низкомолекулярных фракций экстрактов тканей млекопитающих показали, что основную часть идентифи-

цированных веществ составляют пептиды, соответствующие по структуре фрагментам функциональных белков [1, 10, 12]. Среди них особое место занимают фрагменты гемоглобина, содержание которых в зависимости от источника составляет от 30 до 90% общего количества компонентов экстрактов. Ряд таких фрагментов идентифицирован ранее биологически активными пептидами, причем содержание некоторых из них достигает десятков нмоль/г ткани [10, 12–14].

Таким образом, можно предположить, что роль гемоглобина как источника эндогенных пептидов сравнима по важности с его общеизвестной функцией переносчика кислорода и представляет несомненный интерес.

В то же время процессы образования биологически активных фрагментов этого белка исследованы явно недостаточно. Гемоглобин представляет собой эндоцеллюлярный белок, локализованный в основном в красных клетках крови. Из этого следует, что первым шагом при определении источника эндогенных фрагментов этого белка должно стать исследование внутриэритроцитарных продуктов протеолиза. Проведенный анализ пептидного состава лизата эритроцита человека показал, что внутри красных клеток крови в значимых количествах (до десятков нмоль/мл крови) присутствуют фрагменты гемо-

[#] Автор для переписки.

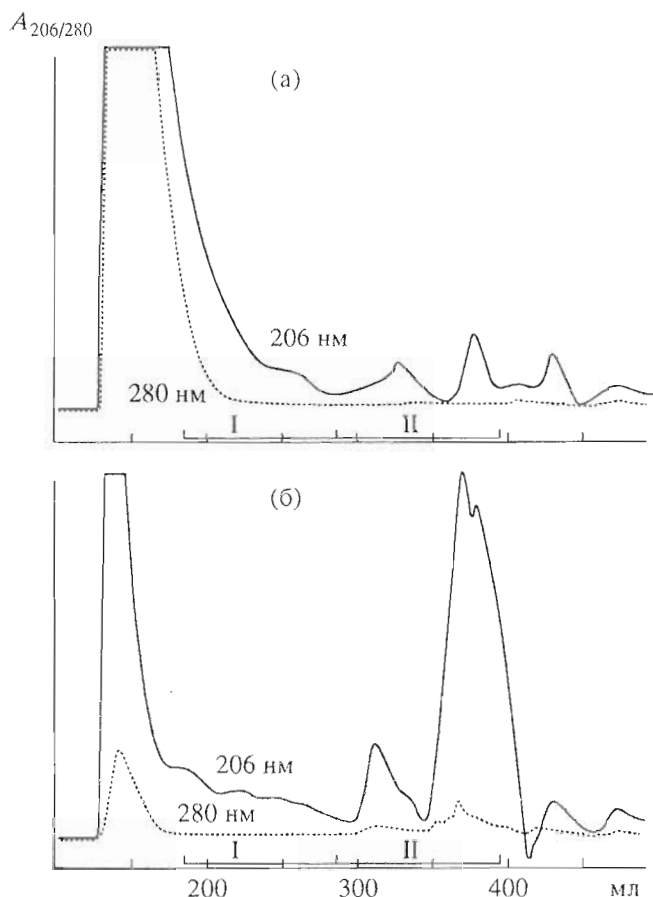


Рис. 1. Эксклюзионная хроматография 0,25 мл гемолизата (а) и 120 мг лиофилизованного препарата супернатанта переживающей культуры эритроцитов (б) на колонке (2,5 × 85 см) с сефадексом G-25 sf, уравновешенной 0,1 М уксусной кислотой. Скорость элюции 60 мл/ч; детекция при 206 и 280 нм. Отмечены отобранные фракции.

глобина, в основном длиной около 30 а.о. [15, 16]. В то же время самый большой из известных биологически активных пептидов, соответствующих фрагментам этого белка, включает лишь 17 а.о. [17]. Следовательно, вопрос о происхождении таких пептидов, выделяемых из экстрактов тканей, остается открытым.

Предметом настоящей работы является исследование возможных путей образования эндогенных биологически активных фрагментов гемоглобина.

Исследование продуктов внутриэритроцитарного протеолиза гемоглобина. В качестве первого шага в изучении путей образования эндогенных фрагментов гемоглобина представляется логичным провести возможно более полный анализ пептидного состава лизата эритроцитов. Исходным материалом для работы послужила периферическая венозная кровь человека, взятая у здоровых доноров в Гематологическом научном цен-

тре РАМН. Условия получения эритроцитов исключали попадание в клеточную массу компонентов плазмы крови и препятствовали гемолизу. Клетки гомогенизировали и центрифугировали; полученный таким образом лизат эритроцитов фракционировали на эксклюзионном сорбенте (рис. 1а), а собранные фракции разделяли ВЭЖХ (рис. 2 а, б).

Главным объектом исследования стала фракция I (рис. 1а), содержащая соединения с молекулярной массой 1,5–5,0 кДа, поскольку ранее было показано, что фракция II ($M < 1,5$ кДа) в основном содержит вещества непептидной природы [15]. Полупрепаративное разделение фракции I показало, что число идентифицируемых веществ составляет 30–40 (рис. 3). Вещества, соответствующие обозначенным на хроматограмме пикам, были выделены в индивидуальном состоянии, и их структура была определена с использованием газофазного секвенатора (табл. 1).

Большинство выделенных пептидов имеет длину цепи свыше 25 а.о. Интересно, что пептиды представлены преимущественно N- и C-концевыми фрагментами α - и β -глобиновых цепей. Ограниченность набора пептидов по числу компонентов указывает на определенную специфичность протеолитической деградации гемоглобина в эритроцитах, а довольно большое количество идентифицированных пептидов позволяет сделать некоторые предположения о главных закономерностях внутриклеточных протеолитических процессов.

Ранее, на основании анализа последовательностей эндогенных фрагментов гемоглобина, выделенных из различных источников, было выдвинуто предположение о постадийном расщеплении исходной молекулы белка [1, 16]. Полученные в настоящей работе результаты подтверждают правильность основных посылок этой гипотезы и позволяют уточнить ряд положений. В частности, факт идентификации пептидов α -(1–49...), α -(34–70) и α -(84–121...) (табл. 1) позволяет локализовать область первичного расщепления цепи α -глобина в участке 70–84. Наличие фрагментов α -(1–49...), α -(1–40...) и α -(1–37...) может свидетельствовать как о диффузной специфичности первичного расщепления исходной последовательности (т.е. равновероятности расщепления по нескольким аминокислотным остаткам во фрагменте -Ala⁷¹-...-Leu⁸³-), так и о наличии карбоксипептидазной активности, приводящей к образованию гомологичной серии укороченных на один остаток пептидов.

Существуют весомые доводы в пользу каждого из этих предположений.

О возможности реализации модели диффузной специфичности первичного расщепления цепей гемоглобина свидетельствуют результаты

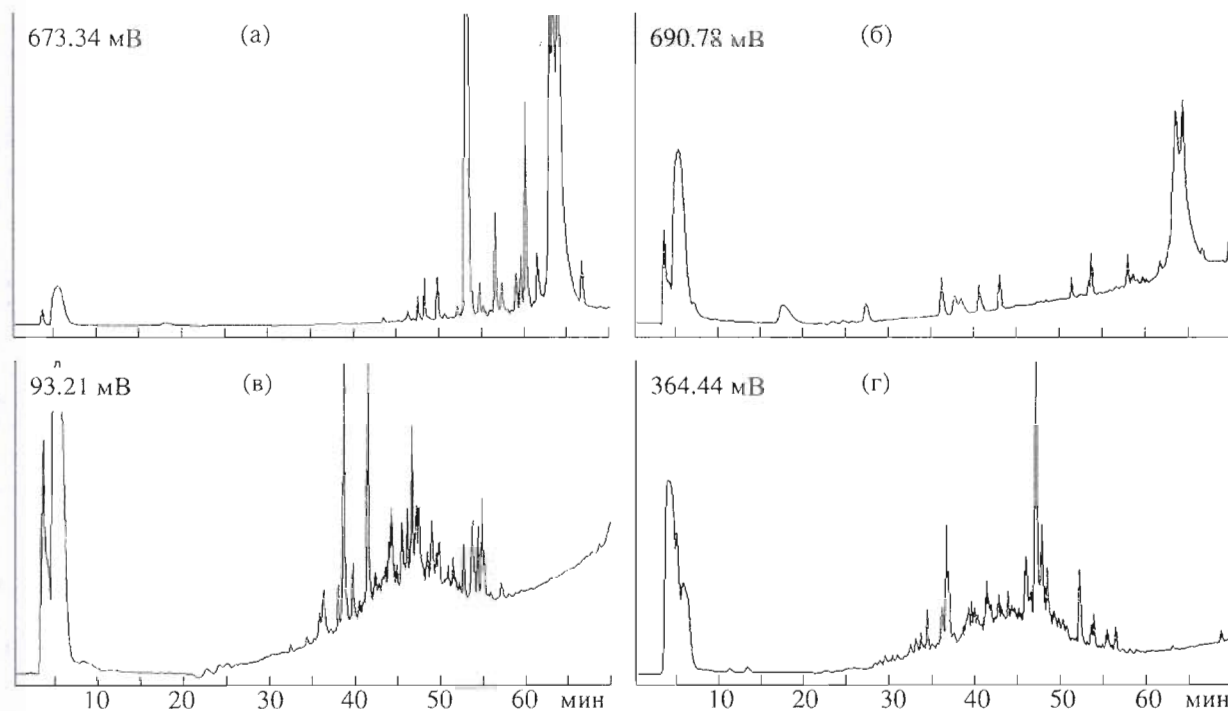


Рис. 2. ВЭЖХ фракций, полученных при эксклюзионной хроматографии лизата эритроцитов (а, б) и супернатанта переживающей культуры эритроцитов человека (в, г) на колонке (4.0 × 250 мм) Nucleosil 120/5 мкм C₈ (Macherey-Nagel, Германия), уравновешенной 0.1% TFA в линейном градиенте концентрации ацетонитрила (0–48% за 65 мин; скорость элюции 0.75 мл/мин). Детекция при 226 нм (шкала 1800 мВ = 2.56 ОЕ₂₂₆). (а) – 1 мг фракции I (рис. 1а); (б) – 1 мг фракции II (рис. 1а); (в) – 1.4 мг фракции I (рис. 1б); (г) – 4.3 мг фракции II (рис. 1б).

исследования продуктов ограниченного протеолиза миоглобина. Было показано, что холомиоглобин (белок, содержащий молекулу гема) сравнительно устойчив к обработке термолизинном, субтилизинном, трипсином и химотрипсином, в то время как апомиоглобин (белок, лишенный гема) расщепляется в аналогичных условиях с образованием протяженных фрагментов белка. При этом основные продукты ограниченного протеолиза с использованием всех перечисленных ферментов вне зависимости от их специфичности получались при расщеплении только одного участка молекулы миоглобина: -His⁸²...-His⁹⁷- [18].

Сравнение пространственных структур апо- и холомиоглобинов показало, что отсутствие гема приводит к деструктуризации α-спирального участка, соответствующего тому фрагменту последовательности миоглобина, который подвергается преимущественному расщеплению при ограниченном протеолизе [19].

Обращает на себя внимание значительное сходство пространственной организации холомиоглобина [19] и обеих цепей гемоглобина [1]. Исходя из этого можно предположить, что в отсутствие гема цепи гемоглобина претерпевают аналогичную пространственную перестройку и становятся доступными для действия протеолитических ферментов различной специфичности.

Это предположение подтверждается теми фактами, что α-спиральные участки цепей гемоглобина (-His⁷⁶...-Asp⁹⁶- для α-цепи и -Ser⁷³...-Val¹⁰⁰- для β-цепи), соответствующие протеолитически доступной области апомиоглобина, в значительной

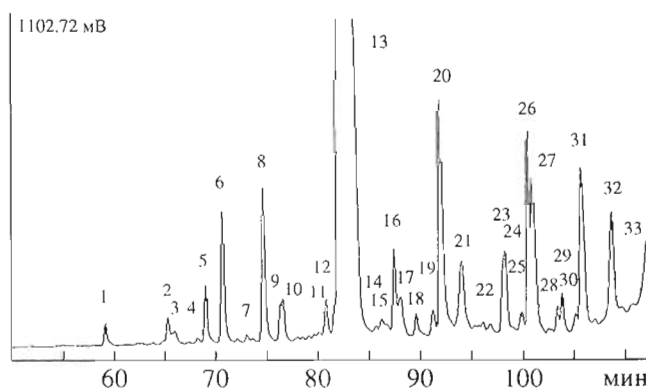


Рис. 3. Фрагмент профиля элюции полупрепаративной ВЭЖХ 53 мг фракции I (рис. 1а) на колонке (10 × 250 мм) Nucleosil 120/7 мкм C₈ (Macherey-Nagel, Германия), уравновешенной 0.1% TFA в линейном градиенте концентрации ацетонитрила (0–48% за 110 мин; скорость элюции 2.5 мл/мин). Детекция при 226 нм (шкала 1800 мВ = 2.56 ОЕ₂₂₆). Данные анализа см. табл. 1.

Таблица 1. Пептиды, выделенные из лизата эритроцитов человека

Пептид*	Аминокислотная последовательность	Белок	Позиция в белке	Содержание, нмоль/мл крови
24	VLSPADKTNVKAAWGKVGANAGEYGAEALERMFSPRTTKTYFRHFDLS...	Гемоглобин, α -цепь	1-49...	3.0-3.5
25	VLSPADKTNVKAAWGKVGANAGEYGAEALERMFSPRTTK...	»	1-40...	0.6-0.8
17	VLSPADKTNVKAAWGKVGANAGEYGAEALERMFSP...	»	1-37...	1.5-1.8
10, 13	VLSPADKTNVKAAWGKVGANAGEYGAEALERMF	»	1-33	60.0-80.0
8	VLSPADKTNVKAAWGKVGANAGEYGAEALERMF	»	1-32	6.0-7.0
5	VLSPADKTNVKAAWGKVGANAGEYGAEALER	»	1-31	1.8-2.2
7	VLSPADKTNVKAAWGKVGANAGEYGAEALE	»	1-30	2.0-2.2
6	VLSPADKTNVKAAWGKVGANAGEYGAEAL	»	1-29	6.0-7.0
2	VLSPADKTNVKAAWGKVGANAGEYG	»	1-25	0.8-1.0
9	LSPADKTNVKAAWGKVGANAGEYGAEALERMF	»	2-32	1.0-1.5
12	SPADKTNVKAAWGKVGANAGEYGAEALERMF	»	3-33	0.8-1.0
22	LSFRTTKTYFRHFDLSHGSAQVKGHGKKVADALTNVAV	»	34-70	0.5-0.8
33	SDLHANKLRVDPVNFKLLSHCLLVTLAAHLPAEFTPAV...	»	84-121...	0.7-1.0
31	LVTAAHLPAEFTPAVHASLDKFLASVSTVLTSKYR	»	106-141	12.0-14.0
19	LVTAAHLPAEFTPAVHASLDKFLASVSTVL	»	106-136	0.8-1.0
30	VTLAAHLPAEFTPAVHASLDKFLASVSTVLTSKYR	»	107-141	0.8-1.0
15	VTLAAHLPAEFTPAVHASLDKFLASVSTVL	»	107-136	0.5-0.8
29	TLLAAHLPAEFTPAVHASLDKFLASVSTVLTSKYR	»	108-141	2.0-2.5
28	LAAHLPAEFTPAVHASLDKFLASVSTVLTSKYR	»	109-141	1.0-1.5
27	AAHLPAEFTPAVHASLDKFLASVSTVLTSKYR	»	110-141	12.0-15.0
1	ASVSTVLTSKYR	»	130-141	2.0-2.5
32	VHLTPBEKSAVTALWGKVNVDVGGGALGRLLVVYPWTQRFFESFGD...	Гемоглобин, β -цепь	1-47...	2.5-3.5
26	VHLTPBEKSAVTALWGKVNVDVGGGALGRLLVVYPWTQRF	»	1-41	4.0-5.0
23	VHLTPBEKSAVTALWGKVNVDVGGGALGRLLV	»	1-33	1.2-1.5
20	VHLTPBEKSAVTALWGKVNVDVGGGALGRLL	»	1-31	10.0-12.0
14	VHLTPBEKSAVTALWGKVNVDVGGGALGR	»	1-30	2.0-3.0
11	VHLTPBEKSAVTALWGKVNVDV	»	1-22	1.5-1.8
4	VHLTPBEKSAVTALWG	»	1-16	0.3-0.5
21	VCVLANNFGKEFTPPVQAAYQKVVAGVANALAHRYNH	»	111-146	3.0-4.0
16	ANNFGKEFTPPVQAAYQKVVAGVANALAHRYNH	»	115-146	13.0-15.0
3	MVDNWRPAQPLKNRQIKASFK	Карбонатдегидратаза II	239-259	1.2-1.5
18	MQIFVKTLTGKTITLEVEPSDTIENVKAKIQD	Убиквитин	1-32	1.2-2.0

* Номера пептидов соответствуют обозначению пиков на рис. 3.

степени совпадают с гипотетическими участками первичного расщепления цепей глобинов (-Ala⁷¹...-Leu⁸³- для α-цепи и -Met⁵⁵...-Leu⁸⁸- для β-цепи), а для цепей обоих глобинов (т.е. молекул белка без гема) показано уменьшение общего количества α-спиральных участков на 15% по сравнению с гемоглобином [20].

Таким образом, вышеприведенные данные позволяют предположить, что первичные стадии внутриэритроцитарной протеолитической деградации гемоглобина могут быть связаны не с пространственно обусловленной доступностью определенных участков последовательности белка к действию протеиназ [1], а с его конформационной перестройкой, сопровождающей отщепление гема. В этом случае эндогенная протеолитическая деградация гемоглобина несет все признаки высокой специфичности.

О наличии менее специфической карбокси-пептидазной активности может свидетельствовать существование фрагментов α-(1-33), α-(1-32), α-(1-30) и α-(1-29) при явно однозначном вторичном расщеплении по пептидным связям между парами гидрофобных остатков Phe³³-Leu³⁴ и Leu¹⁰⁵-Leu¹⁰⁶, приводящем к образованию в очень больших количествах (>10 нмоль/мл крови) фрагментов α-(1-33) и α-(106-141). Низкая представленность фрагментов α-глобина, соответствующих центральной части молекулы, в этом случае может быть объяснена быстрым вторичным расщеплением исходно образовавшихся пептидных фрагментов, а также действием карбокси- и аминоклотидаз. О существовании последних свидетельствует образование фрагментов α-(2-32), α-(3-33) и α-(106-141), α-(107-141), α-(108-141), α-(109-141), α-(110-141). В этом случае, подвергаясь деградации как в С-, так и в N-концевых областях, пептиды, соответствующие центральному участку цепи α-глобина, могут быть представлены большим количеством различных вариантов последовательностей при сравнительно низком (<0.05 нмоль/мл крови) содержании и не детектироваться в условиях эксперимента.

Интересно, что суммарное содержание в эритроцитах фрагментов β-глобина в 5 раз меньше, чем пептидов из α-цепи. Несмотря на то что идентифицированные пептиды перекрывают последовательность β-глобина только на 57%, в то время как для α-глобина эта величина составляет 92%, можно заметить значительное сходство в наборах фрагментов обеих цепей. Можно предположить, что участок первичного расщепления последовательности локализован в ее центральной области. На это указывает существование фрагмента β-(1-47...), а также пептидов β-(42-54...) и β-(89-138...), ранее выделенных из мозжечка человека [21]. Обращает на себя внимание

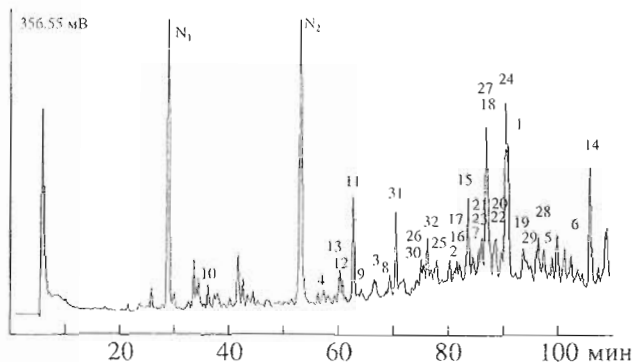


Рис. 4. Полуэпаративная ВЭЖХ 35 мг лиофилизованного супернатанта переживающей культуры эритроцитов человека, полученной после 80 мин инкубации, на колонке (10 × 250 мм) Nucleosil 120/7 мкм С₁₈ (Macherey-Nagel, Германия), уравновешенной 0.1% TFA в системе: изократический режим разделения 0–20 мин и линейный градиент концентрации ацетонитрила (0–48% за 80 мин; скорость элюции 2.5 мл/мин). Детекция при 226 нм (шкала 1800 мВ = 2.56 ОЕ₂₂₆). Данные анализа см. табл. 2. Пики N₁ и N₂ соответствуют веществам, не поддающимся деградации по Эдману.

тот факт, что фрагмент β-(89-138...) весьма схож с пептидом α-(84-121...), в том числе и по способу образования, т.е. за счет расщепления связи Leu-Ser. Для β-глобина можно определить участок первичного расщепления как фрагмент -Met⁵⁵...-Leu⁸⁸-. К вероятным участкам вторичного расщепления в этом случае можно отнести связи Phe⁴¹-Phe⁴² и Leu¹¹⁰-Val¹¹¹, т.е. вторичное расщепление проходит по пептидным связям между гидрофобными остатками, аналогично α-глобину. Более короткие фрагменты могут быть представлены, как и в случае α-цепи, продуктами активности карбокси- и аминоклотидаз.

Таким образом, можно считать доказанным, что протяженные фрагменты гемоглобина образуются внутри эритроцитов с довольно высокой интенсивностью и определенной специфичностью. Вопрос же о путях образования более коротких пептидов, обнаруживаемых в различных тканях и в ряде случаев обладающих биологической активностью, остается открытым. Можно предположить три основных способа формирования таких пептидов: 1) пептиды образуются внутри эритроцитов, а затем выводятся из клетки. В этом случае скорость экскреции должна быть сравнима со скоростью их образования; 2) созревание биологически активных продуктов протеолиза гемоглобина происходит вне эритроцитов. В этом случае из эритроцитов должны экскретироваться длинные фрагменты белка, которые идентифицированы в гемолизате; 3) образование коротких пептидов связано с действием мембрано-ассоциированного ферментативного комплекса

Таблица 2. Пептиды, выделенные из супернатанта перживающей культуры эритроцитов человека

Пептид*	Структура	Позиция в цепях глобинов
1	VLSPADKTNVKA AWGKV	α -(1-17)
2	VLSPADKTNVKA	α -(1-12)
3	VLSPADKTNV	α -(1-10)
4	VLSPADKTN	α -(1-9)
5	AEALER	α -(26-31)
6	FPHFDL	α -(43-48)
7	ALSAL	α -(79-83)
8	SDLHANGLRVDP	α -(84-95)
9	SDLHA	α -(84-88)
10	TSKYR	α -(137-141)
11	VHLTPEEKSAV	β -(1-11)
12	VHLTPEEKSA	β -(1-10)
13	VHLTPEEK	β -(1-8)
14	TALWGKVVNVDEVGGALGRL	β -(12-31)
15	TALWGKVVNV	β -(12-20)
16	TALWGKVN	β -(12-19)
17	TALWGKV	β -(12-18)
18	ALWGKVVNV	β -(13-20)
19	NVDEVGGALGRL	β -(19-31)
20	GGEALGRL	β -(24-31)
21	GGEALGR	β -(24-30)
22	GEALGRL	β -(25-31)
23	GEALGR	β -(25-30)
24	VYPWTQRF	β -(34-41)
25	VYPWTQ	β -(34-39)
26	VYPW	β -(34-37)
27	YPWTQRF	β -(35-41)
28	SDGLAHLDNLKGTF	β -(72-85)
29	SDGLAHLDNLK	β -(72-82)
30	TLSEL	β -(87-91)
31	VVAGVANALAHRYH	β -(133-146)
32	VAGVANALAHRYH	β -(134-146)

* Номера пептидов соответствуют обозначению пиков на рис. 4.

эритроцитов на уже образовавшиеся длинные фрагменты. При этом можно предположить, что формирование таких пептидов происходит в процессе экскреции их из клетки.

Определение того, какая из этих возможностей реализуется с максимальной вероятностью, стало целью дальнейших исследований.

Изучение внутриэритроцитарного протеолиза гемоглобина в модельной бесклеточной системе. Анализ накопления продуктов протеолиза гемоглобина в гемолизате, инкубируемом в условиях, близких к физиологическим, позволяет оценить возможность образования коротких пептидов внутри эритроцитов.

Для этого полученный в стандартных условиях гемолизат разделяли на три равные порции, две из которых инкубировали при 37°C в течение 4 и 7 ч соответственно, а третья служила контрольным образцом. ВЭЖХ фракций I и II, полученных путем эксклюзионной хроматографии приготовленных таким образом препаратов, показала, что в процессе инкубации в гемолизате изменяется содержание пептидных компонентов.

Для фракции I детектируемые изменения компонентного набора связаны с накоплением длинных фрагментов гемоглобина. Следует отметить, что в течение первых 4 ч инкубации происходит значительное увеличение содержания этих пептидов, а затем интенсивность этого процесса заметно снижается. Наблюдаемый процесс формирования длинных фрагментов гемоглобина, по видимому, отражает эндогенные процессы протеолиза белка в клетке, поскольку с течением времени не происходит образования веществ, отсутствующих в контрольном образце.

При ВЭЖХ компонентов фракции II, соответствующих веществам с $M < 1.5$ кДа, было показано, что значительных качественных и количественных изменений веществ, соответствующих основным хроматографическим пикам, не происходит. Тем не менее был детектирован ряд пиков, соответствующих веществам, отсутствующим в контрольных образцах гемолизата. Для веществ, содержание которых в наибольшей степени увеличилось за 7 ч инкубации, были установлены аминокислотные последовательности. Удалось определить структуру шести пептидов: α -(17-18), α -(21-24), α -(52-54), β -(55-56), β -(64-66) и β -(63-67). Интересно, что 4 из 6 идентифицированных фрагментов гемоглобина выщепляются из наименее изученной области молекулы – центральной части последовательностей α - и β -цепей.

Можно предположить, что внутри эритроцитов образование 3-5-членных пептидов сопровождается выщепление более длинных фрагментов из молекулы гемоглобина и является следствием уже упоминавшейся диффузной специфичности расщепления полипептидной цепи белка. В этом случае существование таких пептидов обусловлено первичным протеолизом тех участков глобиновых цепей в центральной области молекулы, расщепление которых проходит равновероятно и, следовательно, может протекать практически одновременно по нескольким пептидным связям,

что и приводит к образованию коротких пептидных последовательностей.

С другой стороны, можно предположить, что эти пептиды являются продуктами неспецифического протеолиза ранее образовавшихся более длинных фрагментов в условиях конкретного эксперимента и, возможно, не имеют эндогенных аналогов. Об этом же свидетельствует и тот факт, что содержание таких коротких пептидов в лизате эритроцитов значительно ниже содержания сравнимых по длине фрагментов гемоглобина, выделенных из других источников [1, 13].

На основании полученных результатов можно предположить, что образование коротких пептидов лишь частично объясняется действием внутриэритроцитарного протеолитического комплекса. Что касается пептидов длиной 5–15 а.о., то в составе гемолизата не найдено ни одного подобного вещества. По-видимому, это может свидетельствовать о том, что образование таких пептидов происходит не непосредственно внутри клеток.

Локализация протеолитического ферментативного комплекса, участвующего в образовании длинных фрагментов гемоглобина. Наблюдаемое постепенное замедление накопления пептидного материала в гемолизате при его инкубации может быть вызвано как инаktivацией ферментативного комплекса эритроцита в условиях конкретного эксперимента, так и медленным осаждением мембранной фракции гемолизата в отсутствие перемешивания, если предположить, что ферментативный комплекс, участвующий в расщеплении гемоглобина, ассоциирован с мембраной эритроцита.

Для выяснения причин наблюдаемого явления было проведено сравнение состава пептидных компонентов, соответствующих фракции I лизата эритроцитов, в процессе инкубации как в присутствии мембранной фракции, так и после ее отделения. Для этого одну порцию гемолизата до инкубации отцентрифугировали до полного осаждения мембранной фракции, после чего инкубировали без перемешивания, в то время как другую инкубировали без предварительного центрифугирования при периодическом встряхивании, препятствующем осаждению мембран. В обоих случаях образцы инкубировали в течение 7 ч в условиях, описанных выше.

Фракционирование полученных после инкубации образцов гемолизата и ВЭЖХ-анализ получаемых путем эксклюзионной хроматографии фракций I были проведены в стандартных условиях. Было показано, что содержание пептидов в гемолизате, инкубированном совместно с мембранной фракцией, значительно выше, чем в образцах гемолизата после осаждения мембран. Наблюдаемое изменение содержания пептидного

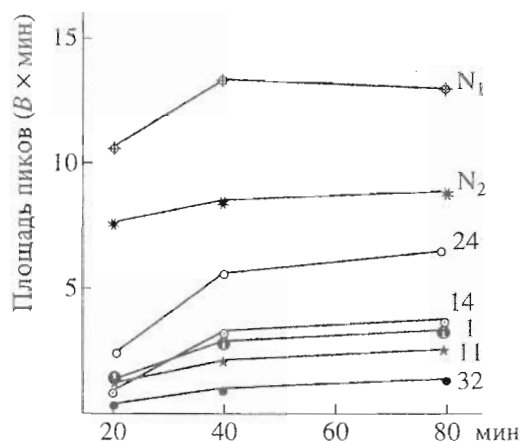


Рис. 5. Динамика экскреции низкомолекулярных компонентов клетками переживающей культуры эритроцитов человека. Анализ содержания веществ в супернатанте осуществляли по изменению площадей пиков при аналитической ВЭЖХ соответствующих образцов [27]. Обозначение веществ соответствует нумерации пиков на рис. 4; последовательности пептидов соответствуют приведенным в табл. 2.

материала указывает на участие в протеолизе гемоглобина ферментативного комплекса мембранной фракции клеток.

Идентификация фрагментов гемоглобина в супернатанте переживающей культуры эритроцитов и установление их структуры. На основании вышеописанных результатов можно предположить, что образование биологически активных фрагментов гемоглобина длиной 5–20 а.о. может быть объяснено либо экскрецией пептидов, образовавшихся внутри эритроцитов, с последующим протеолизом в плазме крови, либо деградацией этих пептидов непосредственно в процессе их экскреции из клетки. С целью проверки этих предположений проведено исследование пептидных компонентов супернатанта переживающей культуры эритроцитов.

Для получения пептидного материала предварительно отмытые клетки инкубировали в изотоническом буфере при 37°C при непрерывном перемешивании в течение 4.5 ч. После инкубации клетки удаляли, а супернатант лиофилизовали.

Для предварительного фракционирования образцов супернатанта были использованы стандартные условия (рис. 1б). Анализ пептидного состава методом ВЭЖХ позволил обнаружить 60–70 пиков, соответствующих различным веществам (рис. 2 б, г). Сравнение суммарного содержания пептидного материала внутри эритроцитов и в супернатанте после 4.5 ч инкубации показало, что количество секретируемого материала составляет 2–5% содержания пептидов внутри эритроцитов [15].

Была проведена полупрепаративная работа компонента супернатанта (рис. 4). В результате установлены аминокислотные последовательности 36 пептидов с максимальной длиной последовательности 20 а.о. (табл. 2). Большинство из них – продукты протеолиза гемоглобина, однако помимо фрагментов этого предшественника идентифицированы 4 пептида, соответствующих фрагментам β -актина, кератина и дифосфатаальдолазы А. Из 32 фрагментов гемоглобина 8 идентичны пептидам, выделенным ранее из экстрактов головного и костного мозга крупного рогатого скота. Еще 15 пептидов отличаются от ранее известных на 1–2 а.о., и их происхождение полностью соответствует принципам формирования эндогенных фрагментов гемоглобина, сформулированным ранее [1]. Таким образом, можно утверждать, что большинство пептидов, экскретируемых переживающей культурой эритроцитов, имеют ранее известные эндогенные аналоги.

В то же время два пептида, α -(84–95) и α -(84–88), образуют новую, ранее неизвестную группу протеолитических продуктов гемоглобина, а пептид β -(87–91) уникален, т.е. не имеет аналогов среди известных фрагментов этого белка. Сложнее обстоит дело с группой пептидов, которую образуют фрагменты β -(12–31), β -(12–20), β -(12–19), β -(12–18) и β -(13–20). В этом случае можно говорить о реализации нового пути группообразования, альтернативного ранее известному, предполагающего образование продуктов расщепления N-концевого фрагмента β -глобина на участке $-(\text{Leu/Ala})^{14}\text{-Trp}^{15}\text{-Gly}^{16}$, – фрагментов β -(1–16), β -(1–14), β -(15–26) и β -(16–31), которые идентифицированы в препаратах головного и костного мозга крупного рогатого скота [1].

Анализ литературных данных свидетельствует о наличии биологической активности у большинства из идентифицированных в супернатанте пептидов. Так, 4 пептидных фрагмента, β -(34–41), β -(34–39), β -(34–37) и β -(35–41), характеризуются наличием опиоидных свойств [22, 23]; фрагмент β -(1–11) является рилизинг-фактором гормона роста [4]; фрагмент α -(137–141), известный как неокиоторфин, обладает широким спектром физиологических эффектов [3]. Для пептидов β -(12–20) и β -(12–19) показана антипролиферативная активность в отношении опухолевых клеток [16]. Можно ожидать, что большая группа пептидов, включающая в себя фрагменты α -(1–17), α -(1–12), α -(1–10) и β -(1–11), β -(1–10), β -(72–85), может обладать гемопоэтической активностью [10].

В образцах супернатанта не были обнаружены пептиды, соответствующие внутриэритроцитарным фрагментам гемоглобина. Условия хроматографического анализа компонентов супернатанта позволяют утверждать, что пептиды, идентифицированные внутри эритроцитов, при-

сутствуют в анализируемом препарате в количествах не более 10 пмоль/мл клеток. Для сравнения: содержание α -(1–33) – одного из пептидов, идентифицированных в гемоллизате, составляет 60–80 нмоль/мл крови (табл. 1). Сопоставление этих величин дает основание утверждать, что фрагменты внутриэритроцитарного протеолиза гемоглобина при инкубации клеток в физиологическом растворе практически из них не выводятся.

Таким образом, можно считать обоснованным предположение о том, что 5–20-членные фрагменты гемоглобина, в том числе и биологически активные, экскретируются эритроцитами или являются продуктами экзоцеллюлярной протеолитической деградации ранее экскретированных молекул.

Изучение динамики экскреции низкомолекулярных компонентов клетками переживающей культуры эритроцитов. При получении препаратов переживающей культуры эритроцитов человека одно из основных условий состояло в предупреждении возможного лизиса клеток при их инкубации. Для эксперимента отбирались образцы эритроцитов, которые не давали видимого окрашивания супернатанта на двух последних стадиях отмывки клеток. Возникновение окрашивания в процессе инкубации служило критерием для исключения конкретного препарата из дальнейшего исследования.

Культивирование эритроцитов в условиях, приближенных к физиологическим, показало, что переживающая культура остается стабильной, т.е. без видимых признаков гемолиза, до 6–8 ч. При использовании ВЭЖХ для анализа динамики накопления экскретируемых эритроцитами веществ было показано, что уже через 20 мин в супернатанте детектируются низкомолекулярные компоненты. Дальнейший анализ показал, что уровень содержания этих соединений в супернатанте резко возрастал в промежутке между 20 и 40 мин инкубации, после чего значительного прироста материала не наблюдалось (рис. 5). Результаты секвенирования подтвердили, что прирост низкомолекулярных компонентов в супернатанте происходит в основном за счет увеличения содержания веществ пептидной природы. В то же время добавление в культуральную среду 3% глюкозы приводило к продолжению интенсивного накопления низкомолекулярных компонентов в супернатанте до 4 ч инкубации, что свидетельствует об энергозависимом характере процесса экскреции. Специфический характер экскреции пептидов подтверждает также тот факт, что изменение содержания материала в процессе инкубации происходит прежде всего за счет увеличения количества исходно детектированных веществ, а не образования новых. Следовательно, появление

пептидов в супернатанте объясняется именно активной экскрецией, а не протеолизом пептидов набором ферментов, ассоциированных с внешней мембраной клеток. Полученные результаты позволяют предположить, что образование пептидов, обнаруживаемых в супернатанте переживающей культуры эритроцитов, происходит непосредственно в процессе экскреции. Аналогичные процессы, по-видимому, должны протекать *in vivo*.

Происхождение эндогенных фрагментов протеолитической деградации гемоглобина. В результате проведенной работы была доказана потенциальная способность эритроцитов выполнять роль железы внутренней секреции, продуцирующей набор биологически активных, т.е. регуляторных, пептидов, демонстрирующих широкий спектр действия: гормонрегулирующий, гормонподобный и тканерегулирующий.

Тем не менее имеется ряд фактов, указывающих на то, что эритроциты не являются единственным источником эндогенных фрагментов гемоглобина. Так, в препаратах мозжечка человека были идентифицированы 3 длинных (заведомо свыше 20 а.о.) пептида, отвечающих фрагментам α -глобина, начинающимся с остатка Phe³³ [21]. Эти пептиды не были детектированы в лизате эритроцитов, а их образование за счет расщепления связи Leu³²-Phe³³ не укладывается в предлагаемую модель постатрийного протеолиза α -глобина в клетке. В условиях наших экспериментов невозможно не идентифицировать в гемолизате пептид, который детектируется в препаратах нервной ткани в количествах 0.05–0.5 нмоль/г, т.е. он должен находиться в эритроцитах в значительно больших количествах. Еще один пептид – β -(1–29) [10] (соответствует фрагменту β -(1–30) гемоглобина человека), выделенный из экстракта мозга крупного рогатого скота и содержащийся в количествах 0.1–1.0 нмоль/г ткани, также не был детектирован в гемолизате.

С другой стороны, при сравнении содержания в ряде биологических источников фрагментов гемоглобина, для которых показана также и внутриэритроцитарная локализация, очевидно несоответствие: так, максимальное содержание пептида α -(1–33) в эритроцитах составляет более 60 нмоль/мл крови; при тотальном скрининге пептидного материала мозга крупного рогатого скота этот пептид вообще не был идентифицирован, в то время как пептиды α -(1–32) и α -(1–30) были найдены в довольно больших количествах (0.1–1.0 нмоль/г ткани) [10], т.е. их содержание сопоставимо с внутриэритроцитарным. Аналогичные соотношения между содержанием в экстракте мозга и в лизате эритроцитов показаны для пептида β -(1–32) [10].

Все эти результаты противоречат возможности исключительно внутриэритроцитарного происхождения длинных фрагментов гемоглобина.

Таким образом, можно предположить, что помимо внутриэритроцитарного протеолиза гемоглобина в организме существуют альтернативные пути образования длинных фрагментов этого белка. При этом последние, по-видимому, не имеют значительных специфических особенностей, т.е. структурные мотивы образующихся пептидов очень близки. Косвенные данные свидетельствуют об отсутствии в плазме крови значимого, т.е. сопоставимого с детектируемым в препаратах тканей, уровня содержания пептидного материала [22]. Из этого вытекает вывод о невозможности объяснить присутствие фрагментов гемоглобина в организме как результат деградации внеклеточного белка (0.01% общего содержания) в плазме крови или остатков белка из утилизируемых, например, в печени, эритроцитов. Также маловероятно и происхождение этих пептидов как продуктов протеолиза гемоглобина, экспрессируемого в других тканях, хотя опубликованы работы, показывающие возможность такого явления [24].

Нам представляется наиболее вероятной возможность образования фрагментов гемоглобина в иммунокомпетентных клетках, например в макрофагах, как результат элиминирования отживающих эритроцитарных клеток. Косвенным подтверждением такого вывода являются результаты работ по исследованию супернатанта переживающей культуры макрофагов [25]. При добавлении в культуральную среду гемоглобина в супернатанте было зафиксировано присутствие опиоидоподобного фрагмента этого белка – VV-геморфина-7, который ранее был идентифицирован во многих биологических препаратах в высоких концентрациях [13], но отсутствует среди пептидов, экскретируемых эритроцитами. В то же время его укороченный аналог – геморфин-7 был обнаружен как в экскретируемом эритроцитами материале, так и в плазме крови человека [22].

На основании вышеприведенных выкладок можно сделать вывод о весьма важной роли гемоглобина как предшественника регуляторных пептидов. Ряд фактов косвенно свидетельствует о существовании нескольких путей образования пептидов из гемоглобина *in vivo*. Можно предположить, что эритроциты обеспечивают в основном постоянный уровень секреции биоактивных пептидов, соответствующий нормальному состоянию организма, в то время как альтернативный источник эндогенных фрагментов гемоглобина выполняет иную регуляторную функцию. В пользу такого предположения говорят зафиксированные факты резкого увеличения (в десятки раз) содержания этих пептидов при некоторых

патологиях (например, содержание LVV-гемоглобина-7 в ликворе при спинномозговых травмах достигает 300 пмоль/мл при норме 3.5 пмоль/мл [26]).

В заключение можно сказать, что роль гемоглобина как одного из основных источников новой группы регуляторных пептидов — биологически активных протеолитических фрагментов функциональных белков [1] — делает этот белок одним из интереснейших объектов дальнейших исследований.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Получение биологического материала. Венозная донорская кровь была получена в Гематологическом научном центре РАМН. Образцы крови (20–25 мл) помещали в пробирки с цитратом (конечная концентрация 0.25%). Клетки отделяли от плазмы центрифугированием при 1000 об/мин (15 мин, 0°C). Осадок 4 раза промывали 0.9% NaCl с последующим центрифугированием в тех же условиях. Лизат эритроцитов получали согласно [16]. Получение супернатанта переживающей культуры эритроцитов описано в работе [1].

Хроматографический анализ и полупрепаративная наработка компонентов. Условия хроматографического разделения даны в подписях к рис. 1–4. Диапазон молекулярных масс веществ, содержащихся во фракциях I и II, определяли по объемам элюции пептидного стандарта (*M* 1.5 кДа) и диглицина (*M* 120 Да).

Аминокислотная последовательность выделенных пептидов была определена с помощью газофазного секвенатора Applied Biosystems 447A (США).

Содержание пептидов в биологическом материале определяли по данным секвенирования и методом нормализации площадей пиков, получаемых в результате хроматографии, с использованием программы МультиХромСпектр (Ampersend, Россия).

Изучение внутриэритроцитарного протеолиза гемоглобина в модельной бесклеточной системе. По 3 мл полученного гомогената эритроцитов [16] инкубировали 4 и 7 ч при 37°C. После инкубации образцы замораживали и хранили при –70°C. Контрольный образец был заморожен без инкубации. Условия эксклюзионной хроматографии приведены в подписи к рис. 1, ВЭЖХ с использованием колонки Диасорб 130/7 мкм C_{16} (4.0 × 250 мм) — в подписи к рис. 2.

Определение локализации ферментативного комплекса, участвующего в образовании длинных фрагментов гемоглобина. 1.5 мл гомогената эритроцитов [16] инкубировали 7 ч при 37°C при периодическом встряхивании с интервалами 15 мин. Другой образец гомогената центрифугиро-

вали при 11000 об/мин в течение 20 мин, а затем инкубировали 7 ч при 37°C. Условия эксклюзионной хроматографии приведены в подписи к рис. 1, ВЭЖХ с использованием колонки Диасорб 130/7 мкм C_{16} (4.0 × 250 мм) — в подписи к рис. 2.

Изучение динамики экскреции низкомолекулярных компонентов клетками переживающей культуры эритроцитов. Анализ содержания пептидных компонентов в супернатанте переживающей культуры эритроцитов при изучении динамики экскреции проводили как описано в работе [27].

Исследования экскреции пептидов переживающей культурой эритроцитов человека осуществляли при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 97-0449197).

Авторы выражают глубокую благодарность И.А. Белянчиковой (ИБХ РАН) за неоценимую помощь при установлении аминокислотных последовательностей пептидов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ivanov V.T., Karelin A.A., Philippova M.M., Nazimov I.V., Pletnev V.Z. // Biopolymers. Peptide Science. 1997. V. 43. P. 171–188.
2. Chang R.C.C., Huang W.-Y., Redding T.W., Arimura A., Coy D.H., Schally A.V. // Biochim. Biophys. Acta. 1980. V. 685. P. 266–273.
3. Takagi H., Shiomi H., Fukui K., Hayashi K., Kiso Y., Kitagawa K. // Life Sci. 1982. V. 31. P. 1733–1736.
4. Schally A.V., Baba Y., Nair R.M.G. // J. Biol. Chem. 1971. V. 246. P. 6647–6650.
5. Schally A.V., Huang W.Y., Redding T.W., Coy D.H., Chihara K., Chang R.C.C., Raymond V., Labrie F. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1978. V. 82. P. 582–588.
6. Фомина Л.А., Гурьянов С.А., Назимов И.В., Яновский О.Г., Захарова Л.А., Михайлова А.А., Петров Р.В. // Докл. АН СССР. 1991. Т. 319. С. 755–757.
7. Зиганшин Р.Х., Свиряев В.И., Васьковский Б.В., Михалева И.И., Иванов В.Т., Кокос Ю.М., Алексеев А.Е., Корыстова А.Ф., Сухова Г.С., Емельянова Т.Г., Усенко А.Б. // Биооргани. химия. 1994. Т. 20. С. 899–918.
8. Glamsta E.-L., Marchlund A., Hellman U., Wernstedt C., Terenius L., Nyberg F. // Regul. Pept. 1991. V. 34. С. 169–179.
9. Galoyan A.A. // Biopolymers. Peptides Sciences. 1997. V. 43. P. 133–137.
10. Иванов В.Т., Карелин А.А., Михалева И.И., Васьковский Б.В., Свиряев В.И., Назимов И.В. // Биооргани. химия. 1992. Т. 18. С. 1271–1311.
11. Erchegyi J., Kastin A.J., Zadina J.E., Qiu X.-D. // Int. J. Pept. Protein Res. 1992. V. 39. P. 477–484.
12. Karelin A.A., Philippova M.M., Karelina E.V., Strizhkov B.N., Grishina G.A., Nazimov I.V., Ivanov V.T. // J. Pept. Sci. 1997. In press.

13. Karelina A.A., Philippova M.M., Karelina E.V., Ivanov V.T. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1994. V. 202. P. 410–415.
14. Blishchenko E.Yu., Mernenko O.A., Yatskin O.N., Ziganshin R.H., Philippova M.M., Karelina A.A., Ivanov V.T. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1996. V. 224. P. 721–727.
15. Karelina A.A., Philippova M.M., Ivanov V.T. // *Peptides*. 1995. V. 16. P. 693–697.
16. Ivanov V.T., Karelina A.A., Blishchenko E. Yu., Philippova M.M., Nazimov I.V. // *Pure Appl. Chem.* 1997. In press.
17. Vaskovsky B.V., Kishenevsky R.N., Mikhaleva I.I., Ivanov V.T., Khavinson V.Kh., Morozov V.G., Mikhailtsov A.N., Anisimov V.N. // *Chemistry of Peptides and Proteins* / Eds D. Brandenburg, V. Ivanov, W. Voelter. Aachen: Verlag Mainz, 1993. P. 309–317.
18. Fontana A., Zamboni M., Polverino de Lauro P., De Filippis V., Clementi A., Scaramella E. // *J. Mol. Biol.* 1997. V. 266. P. 223–230.
19. Yang A.-S., Honig B. // *J. Mol. Biol.* 1994. V. 237. P. 602–614.
20. Fabry T.L., Simo C., Javaherian K. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1968. V. 160. P. 118–122.
21. Slemmon J.R., Hughes C.M., Cambell G.A., Flood D.G. // *J. Neurosci.* 1994. V. 14. P. 2225–2235.
22. Glamsta E.-L., Marclund A., Lantz I., Nyberg F. // *Regul. Pept.* 1991. V. 34. P. 9–18.
23. Zadina J.E., Paul D., Gergen K.A., Ge L.-J., Hackler L., Kastin A.J. // *Neurosci. Lett.* 1996. V. 215. P. 65–69.
24. Ohyagi Ya., Yamada T., Goto I. // *Brain Res.* 1994. V. 635. P. 323–327.
25. Dagouassat N., Garreau I., Sannier F., Zhao Q., Piot J.M. // *FEBS Lett.* 1996. V. 382. P. 37–42.
26. Glamsta E.-L., Meyerson B., Silberring J., Terenius L., Nyberg F. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1992. V. 184. P. 1060–1066.
27. Blishchenko E.Yu., Mernenko O.A., Yatskin O.N., Ziganshin R.H., Philippova M.M., Karelina A.A., Ivanov V.T. // *FEBS Lett.* 1997. V. 414. P. 125–128.

Proteolytic Degradation of Hemoglobin in Erythrocytes Yields Biologically Active Peptides

A. A. Karelina, M. M. Filipova, O. N. Yatskin, E. Yu. Blishchenko, I. V. Nazimov, and V. T. Ivanov

*Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,
ul. Miklukho-Maklaya 16/10, GSP-7 Moscow, 117871 Russia*

The formation of biologically active hemoglobin fragments in human erythrocytes was studied. The structures of 33 peptide products of intraerythrocytic hemoglobin cleavage were determined. Based on an analysis of these sequences, a model of the stepwise degradation of the hemoglobin α - and β -chains was suggested. The processes of peptide formation in a cell-free erythrocyte lysate system were studied. The involvement of an enzymatic complex of the cell membrane fraction was demonstrated. It was found that the cells of a surviving human erythrocyte culture secrete short (of 5–20 amino acid residues) peptides, and the structures of 36 peptides were determined. The dynamics of peptide secretion was investigated, and preliminary data on the energy-dependence of this process were obtained. Based on the experimental results, a model describing erythrocytes as an endocrine gland was suggested.

Key words: hemoglobin, proteolytic enzymes, erythrocyte surviving culture, secretion