



УДК 577.112.088.3

МИЕЛОПЕПТИДЫ: ВЫДЕЛЕНИЕ И СТРУКТУРА

© 1998 г. Л. А. Фокина[#], С. А. Гурьянов, М. А. Ефремов, О. В. Смирнова

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

Поступила в редакцию 29.09.97 г. Принята к печати 15.01.98 г.

Предложен новый метод выделения малых количеств биологически активных пептидов из супернатанта культуры клеток костного мозга. Методом твердофазной экстракции и обращенно-фазовой ВЭЖХ из супернатанта выделены четыре новых пептида, обладающих иммуностимулирующей и дифференцировочной активностью, и определена их первичная структура: Leu-Val-Cys-Tyr-Pro-Gln, Phe-Arg-Pro-Arg-Ile-Met-Thr-Pro, Val-Val-Tyr-Pro-Asp, Val-Asp-Pro-Pro.

Ключевые слова: миелопептиды; выделение; первичная структура; костный мозг.

Известно, что клетки костного мозга, одного из центральных органов иммунной системы, вырабатывают костномозговые медиаторы пептидной природы, названные миелопептидами (МП) [1, 2]. Изучение биологической активности смеси МП в различных экспериментальных моделях показало, что эти соединения обладают широким спектром биологической активности: стимулируют антителообразование, оказывают иммунокорректирующий эффект [3], влияют на процессы гемопоэза, пролиферации и дифференцировки клеток [4], а также проявляют нейротропную активность [5].

На основе эндогенной смеси МП был создан иммунокорректирующий препарат "Миелопид", успешно применяющийся в клинической и ветеринарной практике для профилактики и коррекции иммунологических нарушений и лечения некоторых форм лейкоза [6, 7], однако вопрос о химической структуре отдельных пептидов и механизмах их иммуностимулирующих эффектов остался открытым. В связи с этим целью данной работы было выделение и изучение отдельных компонентов, входящих в состав смеси миелопептидов.

В качестве исходного материала для выделения миелопептидов использовали супернатант кратковременной культуры клеток костного мозга свиньи. Клетки культивировали в многокомпонентной среде 199, содержащей неорганические соли (~10.2 г/л), аминокислоты (~1.3 г/л),

нуклеиновые основания, углеводы, витамины и другие соединения. Выбор данной среды был обусловлен необходимостью создания для весьма лабильных популяций клеток костного мозга условий, максимально приближенных к физиологическим, однако наличие в супернатанте большого числа соединений различной химической природы в количествах, на порядки превышающих содержание в нем МП, существенно затрудняло выделение индивидуальных пептидов. Обычно используемые для этих целей методы (гель-хроматография, ультрафильтрация и др.) оказались неприемлемыми из-за крайне низкого содержания МП в супернатанте, поэтому требовалась разработка новых методических подходов, позволяющих выделять ничтожно малые количества индивидуальных МП из большого объема супернатанта с минимальными потерями.

Выбор биологических тест-систем для контроля за ходом выделения МП определялся основными типами активностей, выявленными ранее для смеси МП [3–5]: антителостимулирующей и дифференцировочной. Первую оценивали по способности исследуемых соединений стимулировать антителообразование *in vitro* в популяции зрелых антителообразующих клеток [8], дифференцировочный эффект – по влиянию выделяемых МП на терминальную дифференцировку лейкозных клеток линии HL-60 [4]. Активными считались фракции, проявляющие дозозависимый, статистически достоверный биологический эффект.

На первых этапах работы для выделения МП использовалась схема (а), описанная в работе [9], позволившая выделить и установить строение двух пептидов (МП-1 – с иммунокорректирующей и МП-2 – с противоопухолевой активностью). Исследование остальных активных фракций, полу-

Сокращения: МП – миелопептиды, офВЭЖХ – обращенно-фазовая ВЭЖХ.

[#]Автор для переписки (тел.: 330-72-56, e-mail: stas@ibch.siobc.ras.ru).

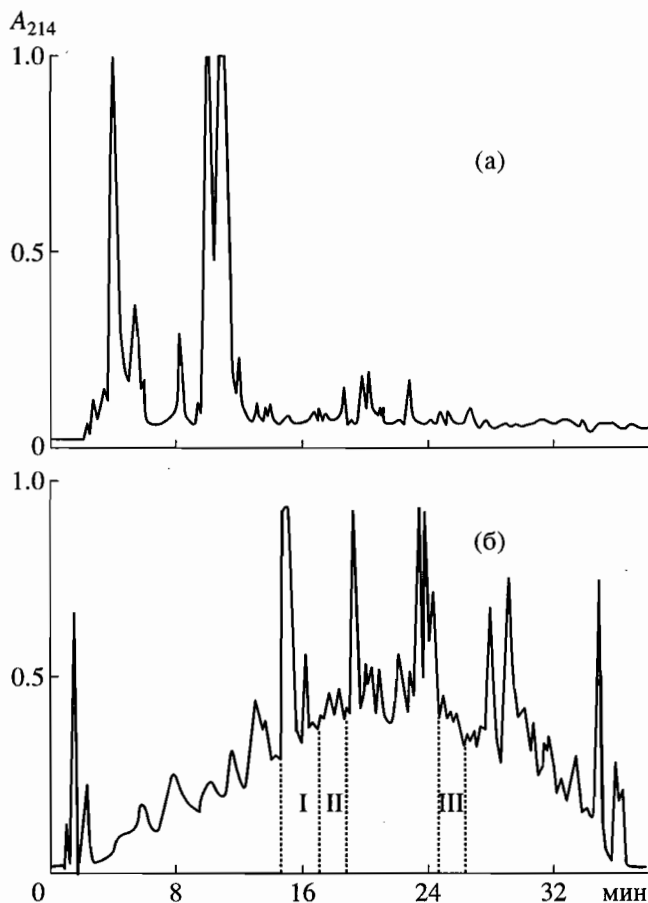


Рис. 1. Профили элюции компонентов среды 199 (а) и смеси миелопептидов (фракция после выделения на фторосорбе) (б) на колонке (10 × 250 мм) Ultrasphere ODS C18 в градиенте концентрации ацетонитрила (0–100%, 32 мин) в 0.1% TFA. Скорость элюции 5.5 мл/мин. Отмечены отбираемые фракции.

ченных в работе [9], показало, что, хотя эти фракции и содержат материал пептидной природы, количество отдельных пептидов в них крайне низко и поэтому попытки выделить индивидуальные МП методом офВЭЖХ к успеху не привели.

Оценка количественного содержания пептидов в активных фракциях, полученных из супернатанта различных партий (5 партий по 25 л каждая) показала, что количество отдельных МП во фракциях меняется от партии к партии в достаточно широких пределах (от 10 до 50 пмоль). Из сказанного видно, что получение необходимых для структурных исследований количеств индивидуальных МП требует переработки большого объема исходного супернатанта (не менее 300 л).

В связи с этим использованная нами ранее [9] схема выделения была неприемлема из-за сложности лиофилизации больших объемов растворов, содержащих высокие концентрации неорганических солей. Связанное с лиофилизацией не-

однократное замораживание – размораживание супернатанта приводило к значительному снижению биологической активности составляющих его веществ. Поэтому нами была разработана новая схема выделения костномозговых пептидов (схема б), в основу которой был положен метод твердофазной экстракции. В соответствии с этой схемой исходный супернатант непосредственно после культивирования клеток пропускать через колонку с сорбентом, обратимо связывающим пептиды и не сорбирующим неорганические соли и многие другие компоненты среды.

В качестве такого сорбента был выбран фторосорб, использование которого ранее в качестве сорбента для фракционирования смеси МП после лиофилизации супернатанта позволило выделить два индивидуальных пептида и установить их строение [9]. Чтобы упростить контроль оптическими методами за ходом выделения МП, клетки культивировали в специально приготовленной среде 199, не содержащей краситель феноловый красный. Серия модельных экспериментов позволила определить оптимальное соотношение фторосорб – супернатант и подобрать условия для раздельной элюции смеси МП и компонентов среды (см. “Экспер. часть”). С помощью офВЭЖХ было установлено, что промывание фторосорба 0.1% TFA позволяет отделить компоненты среды 199, а дальнейшая элюция 80% раствором ацетонитрила в 0.1% TFA приводит к получению смеси МП (рис. 1).

Данные хроматографического анализа компонентов среды 199 (рис. 1а) и полученной смеси МП (рис. 1б) свидетельствуют о том, что выделенная таким образом смесь МП практически не содержит компонентов культуральной среды. Белки, липиды и другие жирорастворимые соединения, прочно сорбированные на фторосорбе, удалялись с колонки лишь при регенерации сорбента.

Таким образом, разработанная нами новая схема выделения привела к существенному упрощению процесса и сокращению времени выделения МП. Описанная схема позволила всего за одну стадию сконцентрировать супернатант, отделить компоненты среды и получить биологически активный материал, который, по данным аналитической офВЭЖХ, пригоден для дальнейшего разделения на колонках с обращенной фазой.

Фракционирование полученной после твердофазной экстракции смеси МП проводили на полупрепаративной колонке (10 × 250 мм) Ultrasphere ODS C18 в линейном градиенте концентрации ацетонитрила (0–100%) в 0,1% TFA (рис. 1б). Отбирали как отдельные пики, так и группы пиков. Все отобранные фракции тестировали на наличие в них иммуностимулирующей и дифференцировочной активности. Фракции I и III с иммуностиму-

лирующей активностью и фракция II с дифференцировочной, по данным N-концевого аминокислотного анализа, содержали достаточные для дальнейшего разделения количества пептидов (>200 пмоль). Выделение пептидов из этих фракций и их очистку проводили методом аналитической офВЭЖХ.

Фракцию I разделяли на колонке Ultrasphere ODS C18 в градиенте концентрации ацетонитрила в 0.1% водной TFA (рис. 2). В результате из нее были выделены два вещества, обладающие иммуностимулирующей активностью. Секвенирование полученных соединений показало, что они являются пептидами с аминокислотными последовательностями Val-Val-Tyr-Pro-Asp (МП-5) и Val-Asp-Pro-Pro (МП-6).

Условия хроматографирования фракции I оказались неэффективными для деления фракций II и III, поэтому для них были подобраны другие колонки и элюирующие системы. Разделение фракции II, проявлявшей дифференцировочную активность, осуществляли на колонке Zorbax ODS C18 в градиенте концентрации ацетонитрила в 0.1% ортофосфорной кислоте (рис.3). Секвенирование соединения, выделенного из данной фракции, позволило идентифицировать его как октапептид Phe-Arg-Pro-Arg-Ile-Met-Thr-Pro (МП-4).

Для разделения фракции III была использована колонка Sераgon SGX C18, на которой в изократическом режиме было выделено вещество, проявляющее иммуностимулирующую активность (рис.4). По данным секвенирования, выделенное соединение – гексапептид Leu-Val-Cys-Tyr-Pro-Gln (МП-3).

Таким образом, из супернатанта культуры клеток костного мозга нами были выделены 6 новых биологически активных пептидов:

Phe-Leu-Gly-Phe-Pro-Thr	МП-1
Leu-Val-Val-Tyr-Pro-Trp	МП-2
Leu-Val-Cys-Tyr-Pro-Gln	МП-3
Phe-Arg-Pro-Arg-Ile-Met-Thr-Pro	МП-4
Val-Val-Tyr-Pro-Asp	МП-5
Val-Asp-Pro-Pro	МП-6

Поиск в банке данных известных белковых последовательностей [10] показал, что аминокислотные последовательности пептидов МП-1 и МП-2 отвечают консервативным фрагментам α-(33-38) и β-(31-36) цепей гемоглобина соответственно, пептиды МП-3 – МП-6 не имеют идентичных последовательностей в банке данных и, по-видимому, являются фрагментами неизвестных ранее белков-предшественников. Фрагменты гемоглобина, соответствующие последовательностям пептидов МП-1 и МП-2, не ограничены пара-

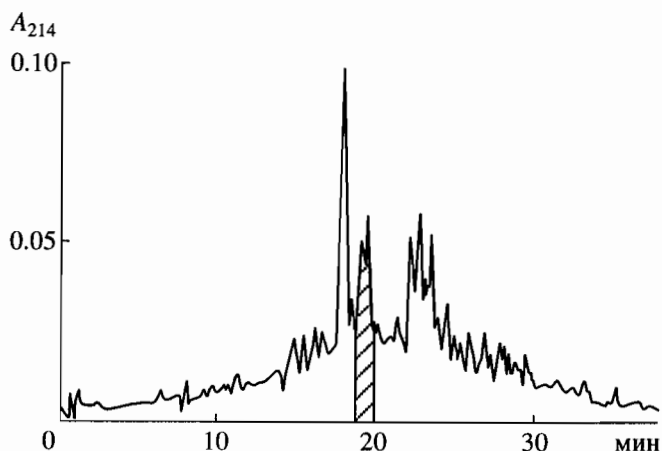


Рис. 2. Профиль элюции фракции I рис.1 на колонке (4.6 × 250 мм) Ultrasphere C18 в линейном градиенте концентрации ацетонитрила (0 – 50%, 30 мин) в 0.1% TFA. Скорость элюции 1.2 мл/мин. Отмечена отбираемая активная фракция.



Схема. Выделение миелопептидов из супернатанта культуры клеток костного мозга по схеме, описанной в работе [9] (а), и с использованием твердофазной экстракции на фторосорбе (б).

ми основных аминокислот в белковой цепи, что отмечено ранее для белков-предшественников, например проопиомеланокортина, поэтому они не могут быть продуктами обычного процессинга. Можно предположить, что данные пептиды являются либо продуктами протеолиза неизвестного ранее белка-предшественника, либо продуктами специфического расщепления гемоглобина. О возможной роли гемоглобина как белка-предшественника для целого ряда биологически активных пептидов, выделенных из гомогената костного и головного мозга различных животных, свидетельствуют и данные работ В.Т.Иванова и сотр. [11].

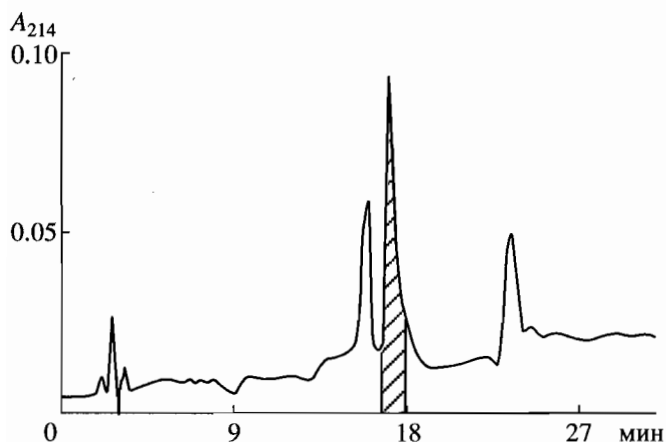


Рис. 3. Профиль элюции фракции II рис.1 на колонке (4.6 × 250 мм) Zorbax C18 в линейном градиенте концентрации ацетонитрила (10–50%, 30 мин) в 0.1% фосфорной кислоте. Скорость элюции 1.2 мл/мин. Отмечена отбираемая активная фракция.

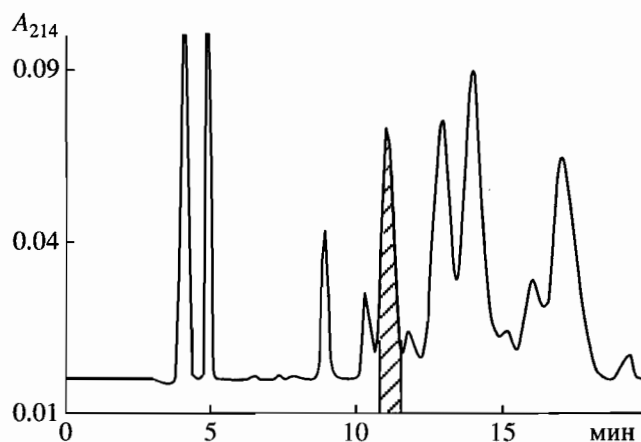


Рис. 4. Профиль элюции фракции III рис.1 на колонке (4.0 × 250 мм) Separon SGX C18 в 40% изопропиловом спирте в 0.1% TFA. Скорость элюции 0.5 мл/мин. Отмечена отбираемая активная фракция.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали ацетонитрил и трифторуксусную кислоту фирмы Fluka (Швейцария), среду 199 производства Минмедбиопрот РФ, фторсорб производства АОО БиоХимМак (Москва). Воду очищали с помощью системы "Milli-Q" (Millipore, США). Все использованные реактивы были марки ос.ч.

Получение супернатанта. Клетки костного мозга свиньи культивировали 18 ч при 37°C в среде 199, содержащей 10 мМ NEPES (Serva, Германия), 2 мМ L-глутамин (Gibco Grand, Исландия) и 50 мкг/мл гентамицина (Serva, Германия). После инкубирования клетки отделяли центрифугированием при 9000 об/мин.

Твердофазная экстракция. Супернатант в объеме 5 л пропускали через стеклянную колонку с фторсорбом (объем сорбента 230 см³), уравновешенным водой, со скоростью 4 мл/мин при 8°C. Далее колонку последовательно промывали 400 мл 0.1% TFA (для удаления компонентов культуральной среды 199) и 700 мл 80% водного раствора ацетонитрила в 0.1% TFA (для элюции смеси МП). Водный раствор ацетонитрила упаривали, остаток лиофилизировали. Из 100 л супернатанта получали 700 мг целевого продукта.

Обращенно-фазовую ВЭЖХ проводили на хроматографической системе Beckman Gold (модель 126 фирмы Beckman, США). Детектирование вели на проточном спектрофотометре Beckman Gold (модель 166 Beckman, США) при длине волны 214 нм.

Аминокислотные последовательности пептидов определяли 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 мг полибрена, высушивали фильтр в токе аргона и проводили три цикла отщепления для очистки фильтра от фона аминокислот. Далее наносили раствор 100 пмоль пептида в 25% TFA (3 × 30 мкл), высушивая каждую аликвоту в токе аргона. Проводили 10 циклов анализа, используя прилагаемые к прибору стандартные программы отщепления, разделения и идентификации фенилтиогидантоинов аминокислот.

Иммуностимулирующую активность определяли в модели *in vitro* по стимуляции антителообразования в культуре клеток лимфоузлов мышей на пике вторичного иммунного ответа на корпускулярный (эритроциты барана) антиген [8].

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

Авторы выражают благодарность Ю.Ф.Леоновой за определение последовательностей пептидов, Е.А.Кирилиной за определение иммуностимулирующей активности и Л.А.Стрелкову за определение дифференцировочной активности.

Работа проводилась при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 96-04-48701).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Petrov R.V., Mikhailova A.A., Zakharova L.A., Sergeev Yu.O., Novikov V.I. // Ann. Immunol. (Inst. Pasteur). 1980. V. 131D. P. 161–171.

2. Petrov R.V., Mikhailova A.A., Sergeev Yu.O., Sorokin S.V. // Immunol. Immunopharmacol. 1987. V. 3. P. 88–93.
3. Mikhailova A.A., Sorokin S.V., Komponiec N.A. // Ann. Isy. Supper. Sanita. 1991. V. 27. P. 57–61.
4. Стрелков Л.А., Михайлова А.А. // Иммунология. 1989. Т. 6. С. 42–45.
5. Petrov R.V., Mikhailova A.A., Zakharova L.A. // Ann. N. Y. Acad. Sci. 1987. V. 496. P. 271–277.
6. Богомолов Н.С., Авакумов В.В., Степаненко Р.Н., Сорокина В.И., Потехина А.Д., Власенко Р.Ю., Жукодина О.А., Молдокулов О.А. // Иммунология. 1991. Т. 1. С. 55–58.
7. Степаненко Р.Н., Скалко Е.И., Кузнецов Б.А., Борисова А.М., Глазко А.Н. // Иммунология. 1989. Т. 5. С. 45–49.
8. Jerne N.K., Nordin A.A. // Science. 1983. V. 140. P. 405.
9. Гурьянов С.А., Фомина Л.А., Михайлова А.А. // Биоорганич. химия. 1993. Т. 9. С. 786–790.
10. Protein Identification Resource (PIR). 1995.
11. Филиппова М.А., Карелин А.А., Иванов В.Т. // Биоорганич. химия. 1997. Т. 23. С. 388–409.

Myelo peptides: Isolation and Structure

L. A. Fonina[#], S. A. Gur'yanov, M. A. Efremov, and O. V. Smirnova

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

A new method was developed for the isolation of biologically active peptides present in small quantities in supernatants of bone marrow cell cultures. Four new peptides, which exhibited immunostimulating and differentiating activities, were isolated from the supernatant using solid phase extraction and reversed-phase HPLC. For these peptides, the following primary structures were elucidated: Leu-Val-Cys-Tyr-Pro-Gln, Phe-Arg-Pro-Arg-Ile-Met-Thr-Pro, Val-Val-Tyr-Pro-Asp, and Val-Asp-Pro-Pro.

Key words: myelo peptides, isolation, primary structure, bone marrow

[#] To whom correspondence should be addressed; phone: 330-7256, e-mail: stas@ibch.siobc.ras.ru.