



УДК 663.257.2: 612.017.1

Выделение геропротекторных пептидов из тимусамин–нуклеопротеинового комплекса тимуса

Соловьёв А.Ю., Чернова И.А.

Институт высокомолекулярных соединений РАН, Санкт-Петербург

Жилинский Д.В., Хавинсон В.Х.

*Санкт-Петербургский Институт биорегуляции и геронтологии СЗО РАМН,
Санкт-Петербург*

Поступила в редакцию 20.05.2011 г.

Аннотация

Разработан метод препаративного фракционирования нуклеопротеинового комплекса тимусамин путем использования тангенциальной микрофльтрации и селективной сорбции низкомолекулярных пептидов на плотно сшитом сульфополистирольном катионите Dowex 50-X8. Выделенные препараты пептидов были исследованы методами гель-хроматографии, УФ-спектроскопии, тонкослойной хроматографии, оценкой биологической активности по реакции торможения миграции лейкоцитов. Показано, что выделенная из нуклеопротеинового комплекса тимусамин пептидная фракция включает компоненты с молекулярными массами ММ от 0,1 кДа до 3 кДа.

Ключевые слова: нуклеопротеиновый комплекс, тангенциальная микрофльтрация, трековая мембрана, твердофазная экстракция, регуляторные пептиды.

Cross-flow microfiltration and selective adsorption of low molecular weight peptides on cation exchanger Dowex 50-X8 were used for the preparative fractionation of nucleoprotein complex from thymus. Peptide fraction were studied by gel chromatography, UV-spectroscopy, thin layer chromatography and evaluation of biological activity by leukocyte migration inhibition factor. It is shown that the peptide fraction from nucleoprotein complex includes components with molecular weights of 0.1 kDa to 3 kDa.

Keywords: nucleoprotein complex, cross-flow microfiltration, track etched membrane, solid phase extraction, regulatory peptides

Введение

Экстракты различных животных тканей являются источником получения регуляторных тканеспецифических пептидов. Однако они содержат огромное количество белковых примесей и очень низкую концентрацию целевых компонентов. Фракционирование высокомолекулярных биополимеров и препаративное выделение низкомолекулярных компонентов, присутствующих в смеси в минорных концентрациях, до сих пор представляет сложную задачу, которая традиционно решается с помощью фракционного осаждения и переосаждения.

Новые способы синтеза ионообменных материалов, предназначенных для селективной сорбции биологически активных веществ определённых классов, позволяют использовать вместо осаждения ионообменную хроматографию низкого давления в препаративных и производственных масштабах [14]. В последние годы всё шире используются приёмы твёрдофазной экстракции (ТЭ) с целью выделения и концентрирования минорных компонентов из сложных смесей [15]. Этот метод позволяет использовать широкий спектр сорбентов, в том числе иониты, различающиеся химическими свойствами, размером и гидрофильностью. Сферическая форма зёрен сорбентов позволяет использовать их в противоточных колонках, в условиях, далёких от равновесия.

Для выделения и концентрирования низкомолекулярных пептидов используются селективные катиониты, обладающие сетчатой структурой для молекулярного ситования. Частными примерами использования такого процесса являются: сорбционное извлечение кортикотропина из экстрактов гипофиза овец [1] и выделение иммуностимулирующего пептида из экстрактов тимуса телёнка [2].

Тимус осуществляет синтез и секрецию ряда пептидных гормонов, которые влияют на скорость развития и созревание определённых популяций лимфоидных клеток. До настоящего времени не определено место расположения в клетке этих эндогенных регуляторных пептидов. Ранее нами была выдвинута гипотеза о том, что такие пептиды представляют собой фрагменты высокомолекулярных факторов транскрипции (ФТ), содержатся в клеточном ядре, связаны с двойной спиралью ДНК (фракциями активного хроматина) и участвуют в иницировании транскрипции генов [3]. Позднее на модельных системах «синтетическая ДНК–синтетический пептид» экспериментально было показано, что ДНК связывает пептид и при этом изменяет свою конформацию [4]. Связь между ДНК и пептидом обеспечивается несколькими межмолекулярными водородными связями, прочность которых зависит от внешних условий, таких как температура и кислотность среды.

Цель данной работы заключалась в том, чтобы экспериментально показать, что эндогенные регуляторные пептиды расположены преимущественно в ядре живой клетки в составе нуклеопротеиновых комплексов хроматина.

Эксперимент

В работе использовали нуклеопротеиновый комплекс – тимусамин, полученный из тимуса телят по запатентованному методу [5]. Характеристики и компонентный состав тимусамин описаны в литературе [6]. Для сравнения свойств пептидных компонентов, полученных из тимусамин, использовали коммерческий инъекционный пептидный препарат Тималин производства ООО «Самсон» (СПб).

Стерилизующую микрофльтрацию раствора тимусамин проводили на коммерческом микрофльтрационном модуле - плазмофилт্রে ПФМ-800 (ЗАО «Плазмофилтър», СПб) с номинальным размером пор трековых мембран 0,3 – 0,4 мкм при скорости рециркуляции суспензии в камере концентрата 30 – 38 л/час и скорости фильтрации 1,8 – 2,5 л/час.

Измерение оптической плотности выполняли на спектрофотометре Shimadzu UV-1700 (Japan).

Концентрацию низкомолекулярных пептидов и аминокислот оценивали с помощью нингидринового реактива по Муру и Штейну с калибровкой по лейцину; оптическую плотность измеряли при длине волны 570 нм.

Для селективной сорбции пептидов использовали сильнокислотный катионит Dowex 50X8 в водородной форме. Десорбцию пептидных компонентов проводили 0,5М раствором аммиака.

В работе использованы массообменники колоночного типа с двумя (верхним и нижним) дренажами, что позволяло подавать растворы как сверху, так и снизу.

Для оценки молекулярных масс разделяемых компонентов использовали метод гель-хроматографии на сефадексах G-25 и G-50 (superfine). Параметры колонки 1,6 x 32 см, элюент – 0,05М NaCl.

Для сравнения компонентного состава пептидного препарата из тимусамина и Тималина использовали метод высоко эффективной тонкослойной хроматографии (ВЭТСХ) на пластинках «Сорбфил» ПТСХ-П-В (РФ); подвижная фаза: изопропанол/этилацетат/аммиак/вода (v/v: 30/10/3.5/10).

Биологическую активность полученного препарата пептидов, выделенных из нуклеопротеинового комплекса, оценивали по реакции торможения миграции лейкоцитов (РТМЛ) [7], в модификации авторов [8]. В качестве стандартных препаратов сравнения использовали Тималин, конканавалин А (КА) и фитогемагглютинин пшеницы (ФГА).

Нормальную донорскую кровь объёмом 0,2 мл вносили в лунки планшета для иммунологических исследований и добавляли в каждую по 0.05 мл растворов Тималина, КА, ФГА и исследуемых препаратов тимусамина и пептидов в физиологическом растворе; в качестве контроля использовали физиологический раствор. Концентрации белка в растворах перечисленных препаратов определяли по методу Лоури. Полученными растворами заполняли стеклянные капилляры до метки, капилляры закрывали воском, центрифугировали 5 минут при 800 об/мин и затем помещали в термостат. После инкубации при 37⁰С в течение 24 часов под микроскопом с помощью окуляр микрометра определяли величину миграции зоны основной массы лейкоцитов от границы эритроцитарного осадка. Рассчитывали относительную подвижность популяции лейкоцитов после воздействия Тималина, конканавалина А (КА), фитогемагглютинина (ФГА) и препарата пептидов, полученного из тимусамина.

Обсуждение результатов

Лиофилизированный препарат тимусамина с высоким содержанием ДНК мало растворим в воде и в физиологическом растворе. Для определения условий его растворения навески (100 мг) заливали буферными растворами (300 мл) с разными значениями рН. Суспензию энергично перемешивали в течение суток, прогревали 1 час при 80⁰С, затем отбирали пробу надосадочного раствора, центрифугировали ее и определяли оптическую плотность раствора при 260 нм (характеристическая длина волны поглощения для ДНК). На рисунке 1 представлены полученные результаты. При рН выше 10,2 наблюдалось полное растворение нуклеопептидного комплекса. Резкое повышение оптической плотности на длине волны 260 нм в щелочной области может быть связано с частичным разрушением двойной спирали ДНК, что, как правило, сопровождается гиперхромным эффектом.

Молекулярно-массовое распределение компонентов, присутствующих в щелочном растворе тимусамина (0,5 М NH₄OH), исследовали методом гельхроматографии. На рисунке 2 представлена полученная хроматограмма, которая свидетельствует о присутствии высокомолекулярной фракции компонентов (ММ > 50 кДа) и низкомолекулярной фракции компонентов с ММ от 3 до 5 кДа. Для

разделения двух фракций проводили микрофильтрацию на плазмодифльтре ПФМ-800.

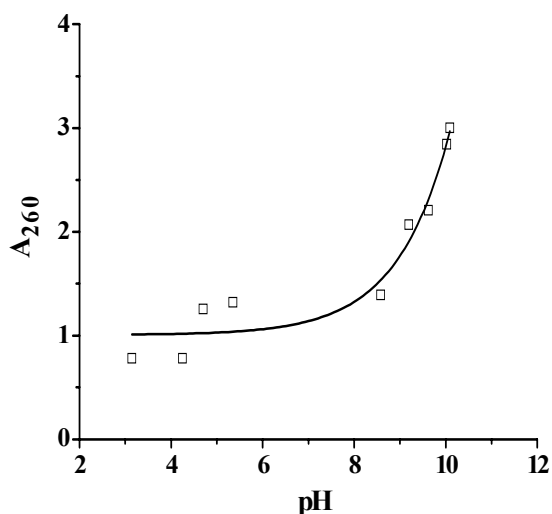


Рис. 1. pH-Зависимость оптической плотности равновесного раствора тимусаминна на длине волны 260 нм при растворении лиофилизированного препарата

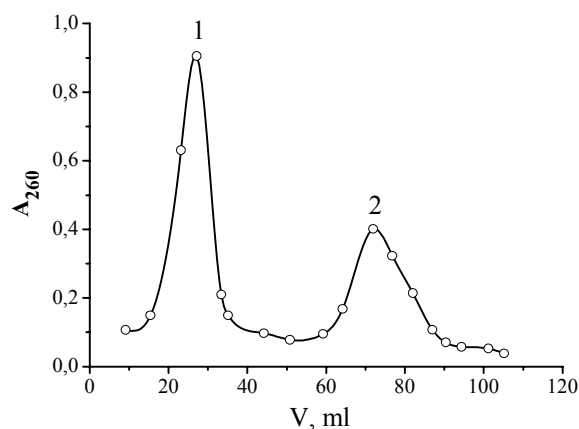


Рис. 2. Гельхроматограмма исходного раствора тимусаминна (рН 10,2); (1) – высокомолекулярная фракция, содержащая ДНК, (2) – низкомолекулярная фракция, содержащая олигонуклеотиды и пептиды. Колонка 1,6 x 32 см, Сефадекс G-50 (superfine), элюент 0.05M NaCl

Особенности ультра- и микрофильтрации коллоидных растворов и суспензий биополимеров определяются не только соотношением размера частиц и величиной просвета фильтрующих пор, но и реологическими свойствами фильтруемой смеси, в частности, гидродинамическими условиями потока над поверхностью мембраны. Ранее в литературе сообщалось об использовании микрофильтрации в тангенциальном режиме при фракционировании полидисперсной суспензии [9]. Позднее было показано, что фракционирование достигается только при ламинарном движении и высоких напряжениях сдвига в потоке фильтруемой суспензии. Распределение частиц в потоке зависит от профиля скоростей: чем больше линейная скорость потока суспензии, чем острее профиль скоростей, тем сильнее действует эффект подъемной силы на крупные частицы (lifting), тем острее происходит разделение частиц в потоке на тяжелые и легкие фракции [10]. В результате этого разделения более мелкие частицы оказываются рядом с фильтрующей стенкой камеры концентрата и удаляются в фильтрат тангенциальным конвективным потоком.

Давно известно, что жесткоцепные макромолекулы ориентируются своими большими осями в направлении потока пропорционально их жесткости и концентрируются в области максимальной скорости потока пропорционально молекулярной массе [11]. Например, при движении вязкого раствора через фильеру высокомолекулярные компоненты концентрируются вдоль оси фильеры [12]. Использование этого свойства в процессе тангенциальной микрофильтрации полидисперсных коллоидных систем на плазмодифльтрах с трековыми мембранами позволяет фракционировать их компоненты по молекулярному размеру [13]. Для обеспечения этого эффекта при конструировании микрофильтров используют очень

узкие щелевые камеры для разделяемой смеси. В плазмодифльтре, использованном в нашей работе, высота щели в камерах концентрата равнялась 100 мкм.

Микрофильтрация раствора тимусамина проводилась в режиме многократной рециркуляции раствора через плазмодифльтр со скоростью 300 мл/мин и длилась 4 часа. Затем полученные растворы – концентрат и фильтрат – также были охарактеризованы с помощью гелихроматографии.

На рисунке 3 представлены полученные результаты. Гелихроматограмма А свидетельствует о том, что концентрат тимусамина содержит только высокомолекулярные компоненты с ММ > 50 кДа, а гелихроматограмма Б обнаруживает в фильтрате раствора тимусамина только низкомолекулярные компоненты со средней ММ 3 кДа. Оптическая плотность фильтрата при 260 нм позволяет предполагать присутствие в нём низкомолекулярных фрагментов ДНК. Так как растворение и микрофильтрацию тимусамина проводили на фоне высокой концентрации аммиачного раствора, нингидриновый метод для оценки концентрации пептидов не использовали.

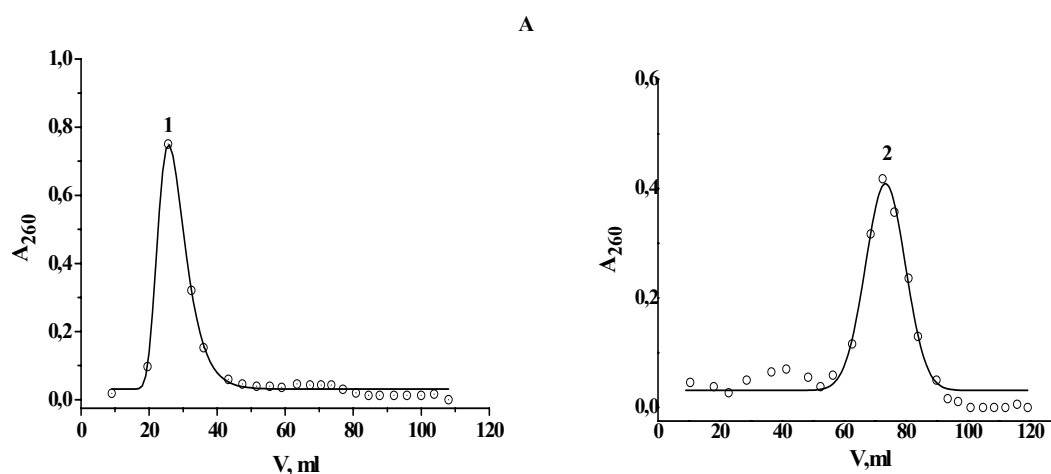


Рис. 3. Гелихроматограммы растворов, полученных после тангенциальной микрофильтрации: А-концентрат; В-фильтрат раствора тимусамина

Для отделения остатков ДНК от пептидной фракции тимусамина использовали сорбцию пептидов на сильнокислотном катионите Dowex 50X8 в водородной форме, на котором ДНК не сорбируется из-за электростатического отталкивания от сульфогрупп сорбента.

Перед проведением ТЭ фильтрат тимусамина подкисляли ледяной уксусной кислотой до рН 2,8 и прокачивали его через противоточную колонку с сорбентом при подаче раствора снизу со скоростью 100 мл/ч·см² сечения колонки. Объём сорбента 200 мл. После окончания сорбции колонку промывали 5% уксусной кислотой и водой.

Использование ионитов определённой полярности, в свою очередь, позволяет использовать режимы ионообменной хроматографии на стадии десорбции целевых компонентов [16]. Десорбцию пептидов тимусамина осуществляли 0,5 М раствором аммиака, подавая его на колонку сверху вниз со скоростью 5 мл/ч·см² и собирая фракции элюата на выходе из колонки. На рисунке 4 представлен график десорбции низкомолекулярных пептидов тимусамина при ступенчатом изменении рН на выходе из колонки.

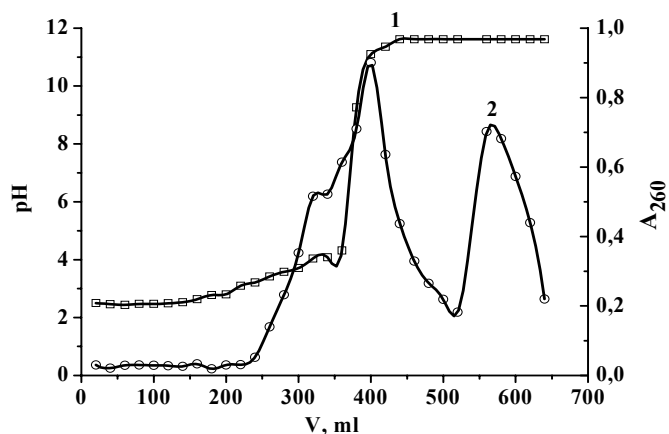


Рис. 4. Десорбция пептидных компонентов щелочным раствором с колонки Dowex 50x8: рН раствора во фракциях на выходе из колонки (1), оптическая плотность раствора в этих фракциях (2)

Очевидно, что низкомолекулярная фракция тимусамина содержит пептиды с нейтральными (первый пик) и основными (второй пик) свойствами.

Полученные пики были объединены и исследованы методом гельхроматографии. На рисунке 5 представлены хроматограммы пептидов тимусамина (А) и Тималина (В). Наличие малого пика оптической плотности на длине волны 260 нм для Тималина (рис.5В) скорее всего обусловлено высоким содержанием стабилизатора (20 мг глицина в ампуле). Сравнение основных пиков хроматограмм указывает на близость по величине молекулярных масс пептидов, входящих в препараты Тималина и тимусамина.

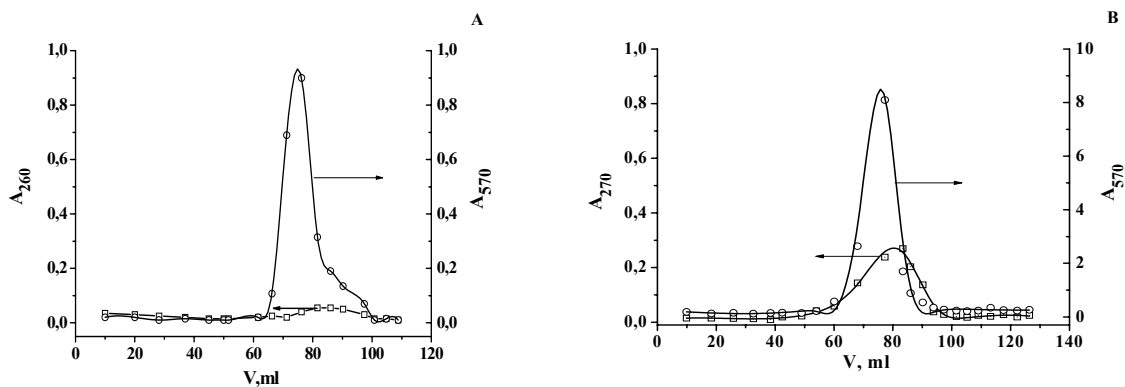


Рис. 5. Гельхроматограммы пептидных препаратов, выделенных из тимусамина (А) и Тималина (В). Оптическая плотность растворов при 570 нм при окраске нингидрином, соответствует концентрации пептидов в полученной фракции

На рисунке 6 представлена ВЭТСХ этих препаратов, а также дипептида (Lys-Glu) и аминокислот-свидетелей. Сравнение R_f 5-го и 6-го образцов показывает, что в препарате Тималина проявляется наиболее близкое к старту пятно, которое отсутствует в пептидах из тимусамина и, возможно, соответствует дипептиду Вилон. Избыточное пятно глицина на дорожке Тималина соответствует глицину, добавляемому к пептидам по технологии в процессе производства. В остальном, можно считать, что пептидные компоненты Тималина и пептидов тимусамина идентичны.

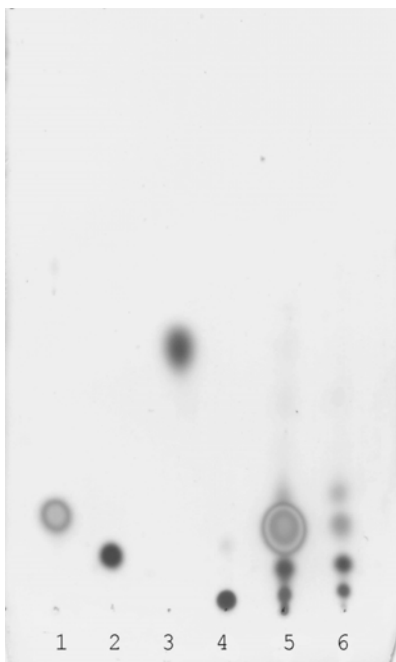


Рис. 6. Тонкослойная хроматография препарата *Тималина* и выделенных пептидов из *Тимусамина*. 1. Глицин; 2. Глутаминовая кислота; 3. Лейцин; 4. Дипептид (Lys-Glu); 5. Тималин; 6. Пептиды тимусамина. Неподвижная фаза: ВЭТСХ-пластинки «Сорбфил» ПТСХ-П-В. Подвижная фаза: изопропанол:этилацетат:аммиак:вода (v/v: 30-10-3.5-10)

Это наблюдение позволяет сделать вывод о том, что в хроматине ядра регуляторные олигопептиды и ДНК образуют обратимо диссоциирующие межмолекулярные комплексы. По-видимому, регулярные пептиды, входящие в состав лечебного препарата Тималин, получаемые из экстракта гомогенизированного тимуса, также являются ядерными молекулами и могут быть классифицированы как эндогенные регуляторные пептиды хроматина.

Оценка биологической активности Тималина и пептидов, выделенных из нуклеопротеинового комплекса тимусамин, в реакции РТМЛ также указывает на сходство этих комплексных пептидных препаратов.

Фильтрат, полученный после микрофльтрации раствора тимусамин, подавали на массообменник снизу, так что сорбент находился в форме взвешенного слоя, что способствовало однородному обтеканию гранул сорбента, как показано на рисунке 3А. Вытеснение фильтрата из экстрактора и отмывку сорбента проводили 5% водным раствором уксусной кислоты в том же режиме.

В табл. 1. представлены полученные результаты, которые обнаруживают сравнимую величину биологической активности пептидных фракций тималина и тимусамин.

Выделение низкомолекулярных пептидов из нуклеопротеиновых комплексов свидетельствует о присутствии в хроматине ядра дифференцированных клеток определённого количества эндогенных низкомолекулярных пептидов, проявляющих тканеспецифическую активность при использовании в качестве экзогенных лечебных препаратов.

Таблица 1. Активность Тималина и низкомолекулярных пептидов из нуклеопротеинового комплекса тимусамина по отношению к Т-лимфоцитам человека в РТМЛ

Препарат	Концентрация, белка, мкг/мл	Подвижность по сравнению с контролем, доля	Удельная активность, ед/мг
Тималин	10	0,40	40
КА	10	0,58	58
ФГА	10	0,65	65
Тимусамин	30	0,52	17
Пептиды тимусамина	20	0,72	36

Инициация транскрипции генов представляет собой ключевой механизм контроля биологических процессов в клетке. Следовательно, уровень активности факторов транскрипции в клеточном ядре также подлежит строгому контролю: и на уровне их синтеза, и на уровне их деградации. Наиболее надёжный путь остановки транскрипции состоит в деструкции инициатора. Для этого все организмы используют внутриклеточную протеолитическую систему для селективного удаления нежелательных белков. Селективный протеолиз начинается с убиквитинизации белка и осуществляется в протеосомах. Было установлено, что большинство факторов транскрипции (ФТ) эукариотов разрушаются в ядре в результате связывания с убиквитином и последующего гидролиза в протеосомах [18]. Продукты этого гидролиза – низкомолекулярные пептиды – представляют собой фрагменты высокомолекулярных ФТ и остаются в составе хроматина в виде обратимо диссоциирующих нуклеопептидных комплексов. При возрастном замедлении синтеза ФТ в хроматине естественно понижается концентрация продуктов гидролиза этих белков – регуляторных геропротекторных пептидов. Эта потеря эндогенных пептидов может быть компенсирована введением в организм пептидных препаратов, полученных из экстрактов тканей молодых животных или их синтетических аналогов.

Список литературы

1. Li C.H., Geschwind J.J., Dixon J.S., Levy A.L., Harris J. Corticotropins (ACTH). Isolation of corticotropin from sheep pituitary glands. // J. Biol. Chem., 1955. V.213, N1. P. 171-177.
2. Морозов В.Г., Хавинсон В.Х., Писарев О.А. Выделение из тимуса и изучение природы фактора, стимулирующего иммуногенез // Докл. АН СССР. 1977. Т. 233, № 3, С. 491-494.
3. Khavinson V., Shataeva L., Chernova A. DNA double-helix binds regulatory peptides similarly to transcription factors // Neuroendocrinology Lett. – 2005. V. 26, N3. P. 237-241.
4. Хавинсон В.Х., Соловьёв А.Ю., Шатаева Л.К. Молекулярный механизм взаимодействия олигопептидов и двойной спирали ДНК. // Бюл. exper. биол. 2006. Т.141, № 4. С.443-447.
5. Морозов В.Г., Хавинсон В.Х. Патент РФ № 2075944. Способ получения белковой пищевой добавки. Оpubл. Бюлл. Изобрет. № 9 от 27.03.96.
6. Морозов В.Г., Рыжак Г.А., Малинин В.В. Цитамины. Биорегуляторы клеточного метаболизма. СПб, «Фолиант», 1999. 120 с.

7. Лабораторные методы исследования в клинике / Под ред.Меньшикова В.В. М.:Медицина, 1987. 207 с.
8. Синицкая Н.С., Шатаева Л.К., Потехина Т.С., Касьянов А.Д. Нуклеопротеиновые комплексы и их биологическая активность по отношению к Т-лимфоцитам. // Прикл. Биохим. Микробиол. 2001. М Т.37, № 1. С.29-35.
9. Shauly A., Wasch A., Nir A., Shear induced particle migration in a polydisperse concentrated suspension. // J. Reology, 1998, V. 42, P. 1329-1348.
10. Levesley J.A., Bellhouse B.J., Particulate separation using inertial lift forces. // Chem. Eng. Sci., 1993. V.48. N21. P.3657-3669.
11. Цветков В.Н. Жесткоцепные полимерные молекулы. Л.: Наука. 1986. 380 с.
12. Де Жен П. Идеи скейлинга в физике полимеров. Москва, «Мир», 1982 – 368 с.
13. Соловьёв А.Ю., Жилинский Д.В., Чернова И.А., Басин Б.Я., Шатаева Л.К. Фракционирование жесткоцепных полимеров при микрофльтрации. // Мембраны, 2009. №44, С.22-26.
14. Селеменев В.Ф., Котова Д.Л., Орос Г.Ю., Загородний А.А. Хроматография низкого давления физиологически активных веществ. С.546 – 569 в книге «100 лет хроматографии», М.: Наука, 2003. 740 с.
15. Thurman E. M., Mills M. S., Solid-Phase Extraction: Principles and Practice, Wiley-Interscience, 1998. 372 p.
16. Hentze H.-P., Antonietti M. Porous polymers and resins for biotechnological and biomedical applications. // Reviews in Molecular Biotechnology. 2002.V.90, Iss 1. P. 27-53.
17. Ulrich H.D. Degradation or Maintenance: Actions of the Ubiquitin System on Eukaryotic Chromatin // Eukaryotic Cell, 2002, Vol. 1, N.1, P. 1-10.

Соловьёв Андрей Юрьевич – с.н.с., к.х.н.,
Учреждение российской академии наук
институт высокомолекулярных соединений
РАН, С-Петербург

Жилинский Дмитрий Владимирович –
аспирант, Институт биорегуляции и
геронтологии СЗО РАМН, С-Петербург

Чернова Ирина Александровна – н.с.,
к.х.н., Учреждение российской академии наук
институт высокомолекулярных соединений
РАН, С-Петербург

Хавинсон Владимир Хацкелевич – проф.,
д.м.н., чл.-корр. РАМН, директор Института
биорегуляции и геронтологии СЗО РАМН, С-
Петербург

Solovyev Andrey Yu. – senior researcher,
Institute of macromolecular compounds of RAS, St
Petersburg. aslovo@yandex.ru

Zhilinski Dmitry V. – graduate student, Institute
of bioregulation and gerontology of the North-
Western Branch of the Russian Academy of
Medical Sciences, St Petersburg

Chernova Irina A. - researcher, Institute of
macromolecular compounds of RAS, St Petersburg

Khavison Vladimir Kh. - prof., corr.member of
the Russian Academy of Medical Sciences, director
of Institute of bioregulation and gerontology of
Western Branch of the Russian Academy of
Medical Sciences , St Petersburg