

СИНТЕЗ И ХАРАКТЕРИСТИКА ФОТОАКТИВНЫХ АРИЛАЗИДНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ПЕПТИДОВ СЕМАКСА И PRO-GLY-PRO

К.В. Мартынова, аспирант, *И.Ю. Нагаев, старший научный сотрудник,

*С.И. Шрам, старший научный сотрудник,

В.И. Швец, зав. кафедрой, *Н.Ф. Мясоедов, зам. директора по науке

кафедра Биотехнологии МИТХТ им. М.В. Ломоносова

* Институт молекулярной генетики РАН

e-mail: sateral@rambler.ru

О существлен синтез *p*-азидотетрафторбензойных производных пептидов семакса и Pro-Gly-Pro. Показано, что полученные фотоаффинные арилазидные зонды обладают цитопротективным действием на культивируемые клетки PC12 в условиях окислительного процесса

Ключевые слова: фотоактивный зонд; фотолиз; цитопротективная активность; семакс.

Введение

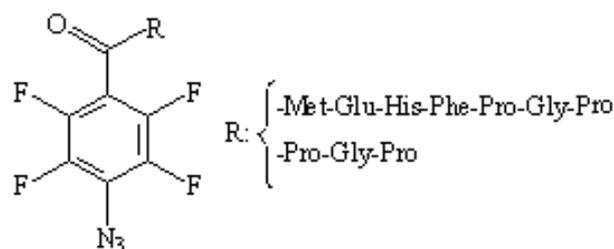
Одним из подходов для поиска биологически мишеней пептидов является метод фотоаффинного мечения, в основе которого лежит направленная доставка фотоактивного радиоактивно меченого аналога природного лиганда – пептида (так называемого фотоактивного зонда, ФАЗ) к участку связывания в изучаемом белке, последующая фотоактивация и ковалентная сшивка зонда в активном центре мишени [1]. Мы предлагаем использовать данный метод для поиска мишеней пептидов семакса (Met-His-Glu-Phe-Pro-Gly-Pro) и Pro-Gly-Pro на нервных клетках. Эта задача является актуальной, поскольку в настоящее время в ряде лабораторий проводятся исследования механизма действия этих пептидов на мозг, но их молекулярные мишени еще не выявлены [2–6].

Целью данной работы являлись синтез и сравнительное исследование биологического действия фотоактивных арилазидных производных пептидов семакса и Pro-Gly-Pro.

Обсуждение результатов

Синтез фотоактивных зондов

Выбор арилзамещенных соединений в качестве фотоактивируемых предшественников зондов был связан с их широкой распространенностью, относительной простотой получения и доступностью исходных соединений. В работе мы использовали фторированные арилазиды, поскольку присутствие электроноакцепторных заместителей в бензольном кольце позволяет увеличить скорость фотолиза, что значительно снижает вероятность повреждения биологического объекта [7].



Модификацию незащищенного пептида семакса по *N*-концевой аминогруппе осуществляли *N*-оксисукцинимидным эфиром *p*-азидотетрафторбензойной кислоты (АТФБК). Выход модифицированного пептида, согласно данным ВЭЖХ, составил 33% (относительно исходного количества семакса).

Использование метода активированных эфиров, а также метода смешанных ангидридов (с тионилхлоридом в качестве активирующего агента) не привело к успеху в синтезе зонда на основе незащищенного Pro-Gly-Pro вследствие низкой химической реактивности вторичной аминогруппы остатка пролина, а также образования большого количества побочных продуктов. Поэтому в качестве исходного соединения был взят пептид, защищенный по карбоксилу бензильной группой (OBzl). Модификацию Pro-Gly-Pro-OBzl проводили кабодимидным методом в тетрагидрофуране (ТГФ) с использованием 1-гидроксibenзотриазола для предотвращения рацемизации. Выход защищенного производного составил 75.5% (в пересчете на АТФБК). Защитную группу удаляли щелочным гидролизом в метаноле. Целевой продукт был получен с выходом 64% (относительно исходного количества кислоты).

Модифицированные пептиды были проанализированы с помощью ВЭЖХ и масс-

спектрометрии. При облучении УФ-светом в растворе 50% водного метанола арилизиды легко подвергались фотолизу, что сопровождалось снижением интенсивности характерных для фторированных арилизидов пиков поглощения в области 260 нм (рис. 1). Полученные результаты фотолиза согласуются с данными, полученными Дрейком и соавт. [8]. Согласно данным ВЭЖХ, в указанных

условиях полный фотолиз полученных соединений протекал за 120 с, что существенно меньше времени, требуемого для фотолиза ранее синтезированного в нашей лаборатории *n*-азидобензойного производного семакса [9]. Это свойство важно, поскольку с уменьшением времени облучения снижается вероятность повреждения биологических образцов.

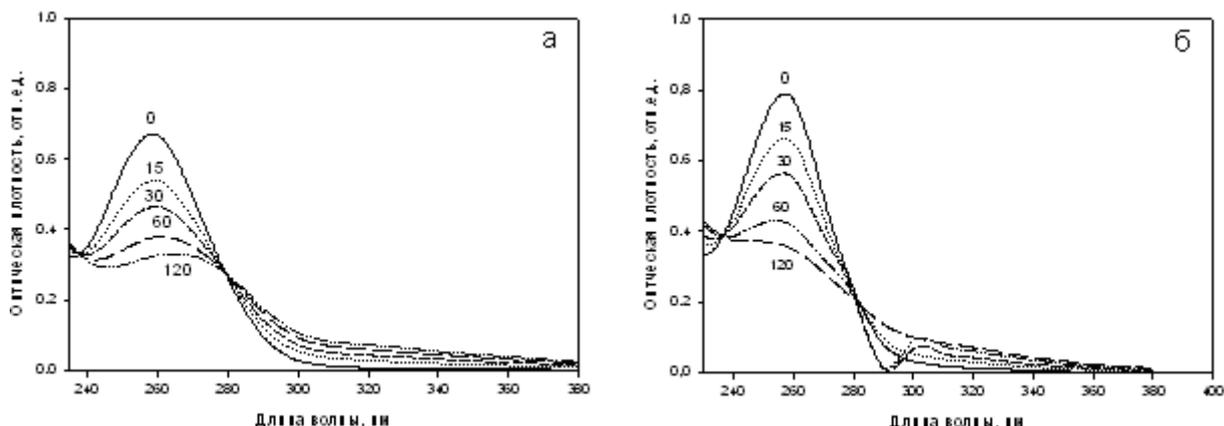


Рис. 1. Изменение спектров поглощения ФАЗ семакса (а) и Pro-Gly-Pro (б) при облучении УФ-светом. Концентрация образцов – 38.5 мкг/мл. Числа на спектрах – время облучения (в секундах).

Оценка биологической активности фотоактивных зондов

Известно, что успех процедуры фотоаффинного мечения зависит от того, сохраняет ли фотоактивное производное способность к связыванию с рецептором, свойственную исходному прототипу [10]. Поэтому одним из основных требований, предъявляемым к ФАЗ, является сохранение структурных параметров, необходимых для распознавания пептида рецептором. Поскольку молекулярные Мишени семакса и Pro-Gly-Pro неизвестны, то для сравнения фотоактивных зондов и пептидов-прототипов могут быть использованы биологические тесты.

Ранее нами было показано, что семакс и Pro-Gly-Pro оказывают цитопротективное

действие на культуру клеток феохромоцитомы крысы РС12 [11] в условиях окислительного стресса, вызванного 30-минутной инкубацией в среде с H₂O₂ [12, 13]. Такое воздействие приводило к развитию некротических процессов, в частности, к нарушению целостности клеточной мембраны, обнаруживаемому уже через несколько часов после индукции окислительного стресса. В данной работе этот тест был использован нами для количественной оценки активности полученных арилизидных производных пептидов.

На первом этапе проводили сравнительное исследование цитопротективной активности семакса и Pro-Gly-Pro и их фотоактивных производных в концентрации 10 мкМ. Также оценивали аддитивность действия ФАЗ.

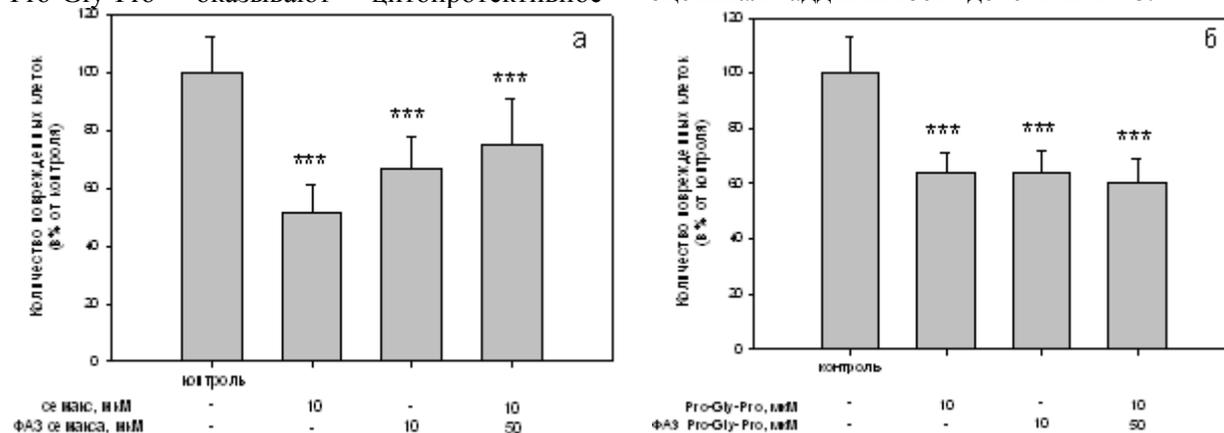


Рис. 2. Сравнение цитопротективной активности семакса (а), Pro-Gly-Pro (б) и их фотоактивных производных в культуре РС12 в условиях окислительного стресса. H₂O₂ – 1.5 мМ, 30 мин.

****p*<0.001 по сравнению с контролем (t-тест Стьюдента для выборок с равными дисперсиями).

Было показано, что зонд на основе семакса в концентрации 10 мкМ обладает меньшей цитопротективной активностью, чем исходный пептид (рис. 2). При этом в концентрации 50 мкМ он снижал эффект семакса (10 мкМ) примерно в 1.5 раза. Фотоактивное производное Pro-Gly-Pro в концентрации 10 мкМ демонстрировало такую же активность, как и исходный пептид (рис. 2 б), а в концентрации 50 мкМ даже несколько увеличивало эффективность действия Pro-Gly-Pro (10 мкМ).

Также определяли цитопротективную активность ФАЗ в диапазоне концентраций 0.2–100 мкМ. Достоверное снижение процента поврежденных клеток для обоих модифицированных пептидов наблюдали уже при концентрации 0.2 мкМ (табл. 1). Однако при больших концентрациях характер действия зондов различался. Так, с увеличением концентрации производного семакса до 10 мкМ наблюдали снижение его цитопротективной активности, а при концентрации 50 мкМ процент некротических клеток даже увеличивался по сравнению с контролем. В то же время фотоактивное производное Pro-Gly-Pro во всех протестированных концентрациях достоверно снижало количество поврежденных клеток.

Таблица 1. Зависимость цитопротективного действия ФАЗ семакса и Pro-Gly-Pro от концентрации.

Концентрация ФАЗ, мкМ	Количество поврежденных клеток (в % от контроля)
ФАЗ семакса	
0.2	74± 4.8***
10	86±9.6*
50	114±5.1**
ФАЗ Pro-Gly-Pro	
0.2	69±12.5**
1	71±7.9**
10	61±7.7*
100	63±3.1*

H₂O₂ – 1.5 мМ, 30 мин. Контроль – инкубация клеток после окислительного стресса без ФАЗ

*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 по сравнению с контролем (t-тест Стьюдента для выборок с равными дисперсиями).

Снижение активности ФАЗ семакса с увеличением концентрации могло быть вызвано цитотоксическим действием АТФБ-группы, обладающей высокой липофильностью. Для проверки этого предположения исследовали действие АТФБК в концентрациях 10 и 50 мкМ, а также ее смесей с семаксом на культуру PC12 в условиях окислительного стресса.

Согласно данным, приведенным в табл. 2, АТФБК не обладала цитотоксическим действием в указанных концентрациях, однако,

значительно снижала цитопротективную активность семакса.

Таблица 2. Действие *n*-азидотетрафторбензойной кислоты на клетки PC12 в условиях окислительного стресса.

Концентрация вещества, мкМ	Количество поврежденных клеток (в % от контроля)
Семакс	
10	68±9.0**
50	62±11.1**
АТФБК	
10	113±19.7
50	92±20.1
АТФБК + семакс, 1 : 1	
10 : 10	80±8.0*
50 : 50	92±1.1

H₂O₂, 1.5 мМ – 30 мин. Контроль – инкубация клеток после окислительного стресса без добавок

*p<0.05, **p<0.01 по сравнению с контролем (t-тест Стьюдента для выборок с равными дисперсиями).

Таким образом, в результате проведенной работы были получены *n*-азидотетрафторбензойные производные пептидов семакса и Pro-Gly-Pro. Показано, что полученные соединения способны подвергаться фотолизу под действием УФ-света. Также было проведено сравнение биологической активности полученных соединений с активностью исходных пептидов. Показано, что модификация Pro-Gly-Pro существенно не повлияла на его цитопротективную активность, тогда как активность ФАЗ семакса оказалась существенно ниже активности исходного прототипа. Предположительно, такой эффект был обусловлен действием *n*-азидотетрафторбензойной группы. Способность полученных зондов подвергаться фотолизу под воздействием УФ-света, а также наличие у них, как и у исходных пептидов, цитопротективной активности указывает на возможность использования этих соединений в качестве фотоаффинных зондов для поиска и характеристики мишеней семакса и Pro-Gly-Pro.

Экспериментальная часть

В работе использовали 4-азидо-2,3,5,6-тетрафторбензойную кислоту (Sigma, США), дициклогексилкарбодиимид (DCC), 1-гидроксибензотриазол (НОВТ) (Fluka, Швейцария), а также сульфат магния (безв.), КОН, H₂SO₄, NaHCO₃, NaCl, NaOH, триэтиламин (TEA) и растворители отечественного производства марки «чда» Растворители перед использованием перегоняли. Пептиды семакс, Pro-Gly-Pro и Pro-Gly-Pro-OBzl были любезно предоставлены Л.А. Андреевой из Отдела химии физиологически активных веществ Института молекулярной генетики РАН.

ТСХ проводили на силикагелевых пластинках Sorbfil-UF (ПБК ПЛАСТМАШ ИВС, Россия) в системе растворителей хлороформ-метанол, 9 : 1. Детекцию осуществляли с помощью УФ-лампы ЭЗАН (15 Вт, λ 254 нм).

Масс-спектрометрический анализ проводили на приборе Finnigan LCQ Max (Finnigan, США) с ионизацией методом электроспрея.

ВЭЖХ-анализ проводили на приборе МИЛЛИХРОМ А02 (Миллихром, Россия). Использовали колонку Prontosil 12C_{18aq} (2x75 мм, 5 мкм), элюент А – 0.2 М LiClO₄, 0.05 М HClO₄, элюент Б – метанол; градиент 30–100% за 30 мин; скорость элюции 0.2 мл/мин. Детекцию проводили одновременно на 5-ти каналах в диапазоне от 210 до 260 нм.

***n*-Азидотетрафторбензоил-Met-His-Glu-Phe-Pro-Gly-Pro**

Получение *n*-азидотетрафторбензойного производного семакса проводили по методике [8]. Получено 1.3 мг продукта с выходом 33% относительно исходного количества семакса. Масс-спектр, m/z : 1031.2 (M^+), MS/MS: 1031.3 ($M^+ - H_2O$).

***n*-Азидотетрафторбензоил-Pro-Gly-Pro**

Получение зонда на основе Pro-Gly-Pro проводили по методике [14], использованной для синтеза Вос-Phe-(трифторметилдиазирин)-*D*-Leu-ОМе из Вос-Phe-(трифторметилдиазирин)-ОН и *H*-*D*-Leu-ОМе.

***n*-Азидотетрафторбензоил-Pro-Gly-Pro-OBzl**

124.6 мг (0.53 ммоль) *n*-азидотетрафторбензойной кислоты и 85.9 мг (0.64 ммоль) НОВТ растворили в 4 мл ТГФ, охладили до 0°C, добавили 131.3 мг (0.64 ммоль) DCC и перемешивали 60 мин при 0°C. Затем внесли в смесь 90 мкл ТЕА и раствор 228 мг (0.64 ммоль) Pro-Gly-Pro-OBzl в 2.2 мл ТГФ. Смесь перемешивали в течение 3-х суток при комнатной температуре. За ходом реакции следили с помощью ТСХ. По окончании реакции смесь отфильтровали, упарили и растворили в 34 мл этилацетата. Полученный раствор последовательно промывали равными объемами (3x3.3 мл) воды, 10% KHSO₄, воды, 5% NaHCO₃, воды и насыщенного раствора NaCl. Этилацетатный экстракт высушили безв. MgSO₄, затем отфильтровали и упарили. На последней стадии проводили дополнительную очистку – сухой остаток растворили в 3 мл этилацетата и высадили продукт гексаном. Полученный осадок сушили под вакуумом над P₂O₅, парафином и КОН, несколько раз меняя осушители. Получено 231.1 мг целевого продукта с выходом 75.5% относительно исходного количества кислоты. R_f 0.2. Масс-спектр, m/z : 577.1 (M^+); MS/MS: 462.0 ($M^+ - CH_2-C_6H_6$).

Удаление бензильной эфирной группы

231.1 мг (0.4 ммоль) *n*-азидотетрафторбензоил-Pro-Gly-Pro-OBzl растворили в 2.35 мл метанола и при перемешивании добавили 440 мл 2 н. NaOH. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение часа, затем разбавили водой до 88 мл и отогнали метанол под вакуумом. Продукт экстрагировали 44 мл этилацетата. Водную фракцию охладили до 0°C, добавили 1 н. H₂SO₄ до pH 3 и дважды экстрагировали 44 мл этилацетата. Объединенные экстракты промыли 59 мл воды и 59 мл насыщенного раствора NaCl, высушили безв. MgSO₄ и удалили растворитель на роторном испарителе. Полученный продукт сушили под вакуумом над P₂O₅, парафином и КОН, несколько раз меняя осушители. Получено 191.2 мг продукта с выходом 98% относительно исходного количества *n*-азидотетрафторбензоил-Pro-Gly-Pro-OBzl. ВЭЖХ-анализ: время удерживания 12.7 мин. Масс-спектр, m/z : 487.07 (M^+); MS/MS: 469.07.04 ($M^+ - H_2O$).

Фотолиз *n*-азидотетрафторбензойных производных пептидов

Облучение фотоактивных производных пептидов проводили с использованием УФ-лампы PHILIPS Hg TUV 15W/G15T8 (Нидерланды). Источник излучения располагался на расстоянии 15 см от образца, находящегося в кварцевой кювете толщиной 1 см. Время облучения измеряли на спектрофотометре U-2800 в диапазоне длин волн от 230 до 400 нм с шагом 10 нм, скоростью сканирования 100 нм/мин в кварцевой кювете 1x1 см.

Культивирование клеток феохромоцитомы крысы PC12

Исследования проводили с недифференцированной культурой клеток феохромоцитомы крысы PC12. Клетки PC12 культивировали во флаконах с площадью поверхности 25 см² (Corning, США) при 37°C в атмосфере 5% CO₂ в среде Игла в модификации Дульбекко – DMEM (БиолоТ, Россия), содержащей 5% сыворотки эмбрионов коров (БиолоТ, Россия) и 10% сыворотки лошади (БиолоТ, Россия), глутамин (2 мМ), стрептомицин (100 мкг/мл) и пенициллин (100 ед./мл) (ПанЭко, Россия).

Повреждение клеток перекисью и определение количества некротических клеток

Эксперименты на модели окислительного стресса проводили на 24-луночных культуральных планшетах (Corning, США). В лунки планшета, предварительно покрытые раствором поли-*L*-лизина (0.1 мг/мл) (Fluka, США), вносили по 1 мл суспензии клеток (30x10³ клеток/мл) в полной среде для культиви-

рования и выдерживали 15–18 ч при 37 °С в атмосфере 5% CO₂. Для индукции окислительного стресса клетки помещали в бессывороточную среду, вносили свежеприготовленный раствор H₂O₂ до конечной концентрации 1.5 мМ и инкубировали в течение 30 мин при 37 °С и 5% CO₂. Затем заменяли среду с H₂O₂ на полную среду для культивирования, добавляли водно-этанольные растворы пептидов таким образом, чтобы концентрация этанола в среде культивирования не превышала 0.02%, и инкубировали в течение 4 ч. По окончании инкубации клетки окрашивали раствором красителя трипанового синего по методике [15], позволяющей выявлять клетки с некротическими повреждениями. Затем клетки фиксировали 2% параформальдегидом в течение 10 мин при комнатной температуре, промывали дистиллированной водой и рассматривали под световым микроскопом при увеличении ×100 или ×200. Определяли количество поврежденных клеток относительно контроля (инкуба-

ция без пептида – 100%). Каждый эксперимент повторяли не менее трех раз.

Статистический анализ данных

Анализ данных проводили с использованием программ Statistica 4.0 (StatSoft, США) и SigmaPlot 7.0 (SYSTAT, США). Все результаты по цитопротективной активности пептидов представляли в виде «среднее ± среднее квадратичное отклонение», используя результаты трех независимых экспериментов, в каждом из которых производили три независимых измерения показателя цитопротективной активности (отношение числа некротических клеток к общему числу клеток).

Работа выполнена при частичной поддержке программы фундаментальных исследований РАН «Молекулярная и клеточная биология» (руководитель проекта – акад. РАН Н.Ф. Мясоедов), программы Президента РФ «Ведущие научные школы» (проект № НШ-5638.2006.4) и Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 08-0401760-а).

ЛИТЕРАТУРА:

1. Hatanaka, Y. Photoaffinity labeling in drug discovery and developments: chemical gateway for entering proteomic frontier / Y. Hatanaka, Y. Sadakane // *Curr. Topics in Med. Chem.* – 2002. – Vol. 2. – P. 271–288.
2. Semax, an analogue of adrenocorticotropin (4-10), binds specifically and increases levels of brain-derived neurotrophic factor protein in rat basal forebrain / O. V. Dolotov [et al.] // *J. Neurochem.* – 2006. – Vol. 97. Suppl. 1. – P. 82–86.
3. Изучение особенностей связывания нейропептида семакс, меченного по концевому остатку пролина, с плазматическими мембранами мозга крыс / Т. В. Вьюнова [и др.] // *Нейрохимия.* – 2006. – Т. 22, № 8. – С. 290–295.
4. Влияние семакса и его фрагмента Pro-Gly-Pro на кальциевый гомеостаз нейронов и их выживаемость в условиях глутаматной токсичности / Т. П. Сторожевых [и др.] // *Бюлл. эксп. биол. и мед.* – 2007. – Т. 143, № 5. – С. 538–541.
5. Semax, an analog of ACHTH(4-10) with cognitive effects, regulates BDNF and trkB expression in rat hippocampus / O. V. Dolotov [et al.] // *Brain Res.* – 2006. – Vol. 1117, № 1. – P. 54–60.
6. Binding of tripeptide Pro-Gly-Pro labeled at C-terminal proline residue to plasma membranes of rat forebrain / T. V. V'unova [et al.] // *Dokl. Biol. Sci.* – 2008. – Vol. 419. – P. 95–96.
7. Keana, J. F. W. New reagents for photoaffinity labeling: synthesis and photolysis of functionalized perfluorophenyl azides / J. F. W. Keana., S. X. Cai // *J. Org. Chem.* – 1990. – Vol. 55. – P. 3640–3647.
8. Application of an *N*-(4-azido-2,3,5,6-tetrafluorobenzoyl)tyrosine-substituted peptide as a heterobifunctional cross-linking agent in a study of protein *O*-glycosylation in yeast / R. R. Drake [et al.] // *Bioconjugate Chem.* – 1992. – Vol. 3. – P. 69–73.
9. Синтез фотоаффинного арилазидного производного семакса. / К. В. Мартынова [и др.] // *Вестник МИТХТ.* – 2007. – Т. 2, № 4. – С. 78–82.
10. Bayley, H. Photoaffinity labeling / H. Bayley, J. R. Knowles // *Methods in Enzymology.* – 1977. – Vol. 46. – P. 69–115.
11. Tischler, A. S. Morphologic and cytochemical properties of a clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor / A. S. Tischler, L. A. Green // *Lab. Investigation.* – 1978. – Vol. 39. – P. 77–89.
12. Влияние пептида семакса на выживаемость культивируемых клеток феохромоцитомы крысы при окислительном стрессе / Э. Р. Сафарова [и др.] // *Бюлл. эксп. биол. и мед.* – 2003. – Т. 135. – С. 268–271.
13. Сафарова, Э. Р. Фармакологическое исследование цитопротекторного действия нейротропных пептидов : дисс...канд. биол. наук : 14.00.25; 03.00.03 / Сафарова Эльвира Рафиговна. – М. : ГУ НИИ фармакологии РАМН, 2003. – 131 с.
14. Синтез новых фотоактивных пептидов, родственных энкефалину / Н. В. Сумбатян [и др.] // *Вестник Моск. Ун-та. Сер. 2. Химия.* – 2001. – Т. 42, № 4. – С. 287–290.
15. Животная клетка в культуре (Методы и применение в биотехнологии) / под ред. Л. П. Дьяконова. – М. : Компания «Спутник», 2000. – 399 с.