

О ЧЕМ МОГУТ РАССКАЗАТЬ ЛЯГУШКИ? ИЗУЧЕНИЕ ПЕПТИДНОГО СОСТАВА КОЖНОГО СЕКРЕТА АМФИБИЙ

А.Лебедев, д.х.н., Т.Самгина, к.х.н.,
Химический факультет МГУ им. Ломоносова
lebedev@org.chem.msu.ru

В поисках новых биологически активных соединений исследователи вынуждены обращаться к природным объектам, например к кожным секретам амфибий. В статье показаны возможности масс-спектрометрии высокого разрешения для определения аминокислотных последовательностей всех компонентов сложных пептидных смесей, обсуждены возникающие при этом проблемы и предложены пути решения.

Замечательные создания – всем знакомые лягушки. Благодаря удивительной приспособляемости и иммунитету, они живут на Земле вот уже сотни миллионов лет. Они расселились по всему земному шару, причем предшественники кожных пептидов современных особей структурно во многом напоминают те, что были у их предков во времена Гондваны [1]. У лягушек нет внешних средств самозащиты вроде когтей, рогов, зубов. Единственное орудие их защиты от многочисленных хищников и патогенных микроорганизмов – это кожный секрет, обильно выделяющийся при стрессе. Кожа амфибий – богатейший источник биоактивных пептидов. Они хранятся в гранулярных железах животных в неактивном состоянии, а при необходимости активируются и секретируются на их спину. Направленность действия кожных пептидов чрезвычайно широка: от антимикробной, антивирусной и фунгицидной до противоопухолевой. Есть также в лягушиных секретах нейропептиды и пептиды-анальгетики, ингибиторы синтеза

НО и проч. Вот их совокупному действию и обязаны амфибии своим высоким иммунитетом.

Не зная о пептидном составе кожных секретов, наши внимательные предки использовали свои наблюдения о лягушках в повседневной жизни с давних времен. Например, в северных регионах России лягушка в колодце означала чистоту воды и пригодность ее для питья. А в Финляндии лягушку помещали в сосуд с молоком для предотвращения его быстрого скисания. В народной медицине практиковали удаление бородавок при контакте с кожей лягушек. Сейчас всему этому можно найти научное объяснение.

Бактерицидное и противогрибковое действие пептидов лягушек понятно: оно позволяет им эффективно бороться с патогенными микроорганизмами. Но как пептиды могут предохранить амфибию от крупных хищников? Оказывается, действительно могут! В кожном секрете живущей в воде прудовой лягушки обнаружены пептиды, активирующие кининовые рецепторы рыб – их наиболее

вероятных врагов, а у сухопутной травяной лягушки – птиц. В случае нападения секретирование лягушкой этих пептидов вызывает рвотный рефлекс у хищника и дает лягушке шанс на спасение.

На химическом факультете МГУ активное изучение пептидов российских лягушек началось в 2004 году и было инспирировано работами Джона Бови (Аделаида, Австралия), который к тому времени уже более 15 лет занимался пептидами австралийских лягушек, в основном квакш. За три года совместных работ с университетом Аделаиды сотрудники и аспиранты лаборатории органического анализа освоили технику работы с земноводными, их секретом, а также осознали возможности современной масс-спектрометрии в секвенировании пептидов, т.е. определении их первичной структуры. За прошедшие десять лет установлены структуры около 200 новых пептидов, опубликовано более 20 работ (11 в журналах Top 25, причем последняя [2] вошла в пресс-релиз American Chemical Society), сделано несколько десятков докладов на международных конференциях. Материалы исследований активно используются в курсах лекций, вошли составной частью в первое учебное пособие на русском языке по масс-спектрометрии пептидов и белков, вышедшее совсем недавно в издательстве “Техносфера” [3]. Тема оказалась плодотворной, поскольку кожные секреты обитающих на территории России амфибий к тому времени не были исследованы. Как выяснилось в процессе экспериментов, секреты российских лягушек богаты самыми разнообразными пептидами, для каждого вида удалось зарегистрировать по несколько десятков, в том числе ранее не описанных в литературе. При обработке спектров пептидов мы использовали методы поиска по заданным характеристическим ионам, которые широко применяются в масс-спектрометрии при изучении объектов окружающей среды. И этот прием позволил обнаружить все родственные пептиды, даже если они присутствовали в кожных секретах в следовых количествах [2].

В силу климатических особенностей нашей страны, у нас наиболее распространены ранидные лягушки из рода *Rana*. Именно поэтому в первую очередь изучали секреты доступных зеленых и бурых лягушек, обитающих также и в Европе: *R. ridibunda*, *R. lessonae*, *R. esculenta*,

R. temporaria, *R. arvalis*. Характерной особенностью секретов этих лягушек являются пептиды-антибиотики с С-концевым дисульфидным циклом, образованным взаимодействием двух цистеиновых остатков. Этот структурный фрагмент называется *Rana box*. Он существенно усложняет прямое секвенирование таких пептидов, делая недоступной часть последовательности.

Первоначальной задачей всех исследовательских групп, занимающихся пептидами лягушек, был простой поиск новых биологически активных соединений. Однако по мере накопления информации вставали новые проблемы, для решения которых предстояло провести эксперименты в следующих направлениях:

- изучение характера фрагментации нетриптических пептидов в различных условиях ионизации образцов (МАЛДИ и электрораспыление) и инициирования распада протонированных молекул пептидов (активация соударениями, захвата/переноса электрона и т.д.); изучение влияния на характер фрагментации пептидов различных дериватизаций N-концевых аминогрупп и дисульфидной связи; разработка на этой основе комплексного подхода к масс-спектрометрическому секвенированию компонентов сложных пептидных смесей с целью получения достоверных данных об их первичной структуре;
- обоснование проведения таксономических исследований на основе установленного масс-спектрометрическим путем пептидного состава кожных секретов, в том числе и у близкородственных видов;
- предсказание типа биологической активности неохарактеризованных пептидов по параметрам масс-спектра методом построения двумерных пептидных карт.

Масс-спектрометрия – один из наиболее эффективных методов установления состава смесей сложнейших органических соединений и структуры их компонентов. Сегодня она практически вытеснила бывший классический метод секвенирования деградацией по Эдману. Масс-спектрометрия значительно чувствительнее и быстрее может оперировать с длинными пептидами, со смесями пептидов, с пептидами, содержащими посттрансляционные модификации. Удивительно, но масс-спектрометрическое секвенирование оказывается даже дешевле, чем анализ по Эдману, при

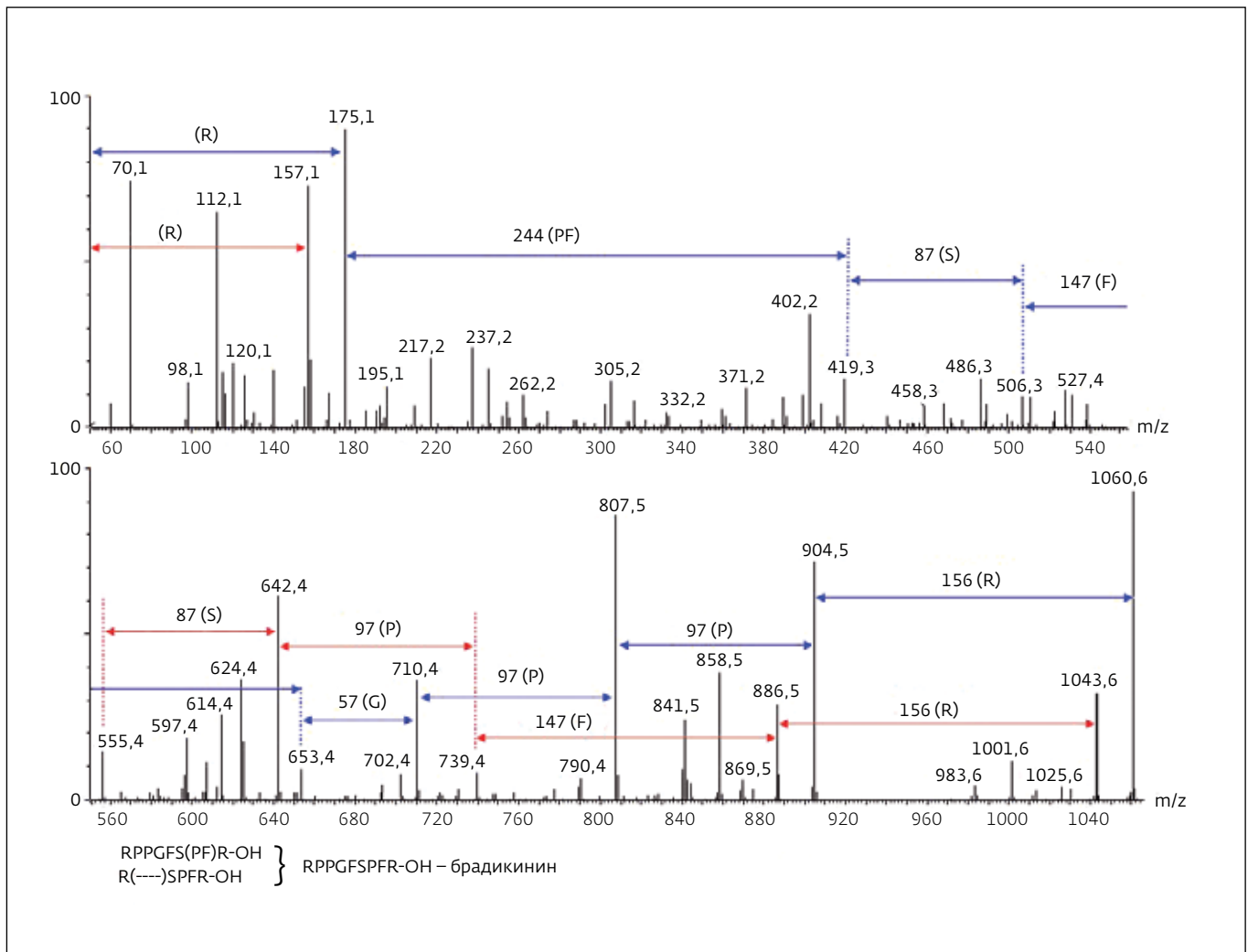


Рис.1. Масс-спектр одного из основных компонентов секрета амфибий – брадикинина. Синим цветом выделена у-серия, а красным – b-серия. Поскольку информация комплементарна, то, несмотря на то что в обеих сериях есть пропущенные участки, совместное рассмотрение серий позволяет установить полную последовательность пептида

изначально более высокой стоимости приборного оборудования.

Рисунок 1 иллюстрирует процесс масс-спектрометрического секвенирования. В наиболее распространенном варианте иницирования фрагментации протонированной молекулы соударениями происходят разрывы пептидных связей вдоль цепочки пептида. Поскольку в результате разрыва заряд остается на любом из образующихся фрагментов, возникает две серии фрагментных ионов: у-серия (с зарядом на С-конце) и b-серия (с зарядом на N-конце). Массы всех аминокислот известны. Поэтому в задачу исследователя входит установление расстояния между пиками в масс-спектре, которое бы соответствовало извест-

ной аминокислоте. В идеале разрыв каждой пептидной связи должен подтверждаться присутствием в масс-спектре пиков двух альтернативных b-у-ионов. К сожалению, это далеко не всегда так. Не все пептидные связи рвутся с одинаковой легкостью: для некоторых из них порой не удастся увидеть ни одного характеристического фрагментного иона. В этом случае необходимо привлекать другие методы активации фрагментации, работать с ионами другой зарядности или прибегать к модифицированию пептида.

Помимо избирательного разрыва пептидных связей, существуют еще несколько проблем, усложняющих масс-спектрометрическое секвенирование. Это, прежде всего, длина пептида.

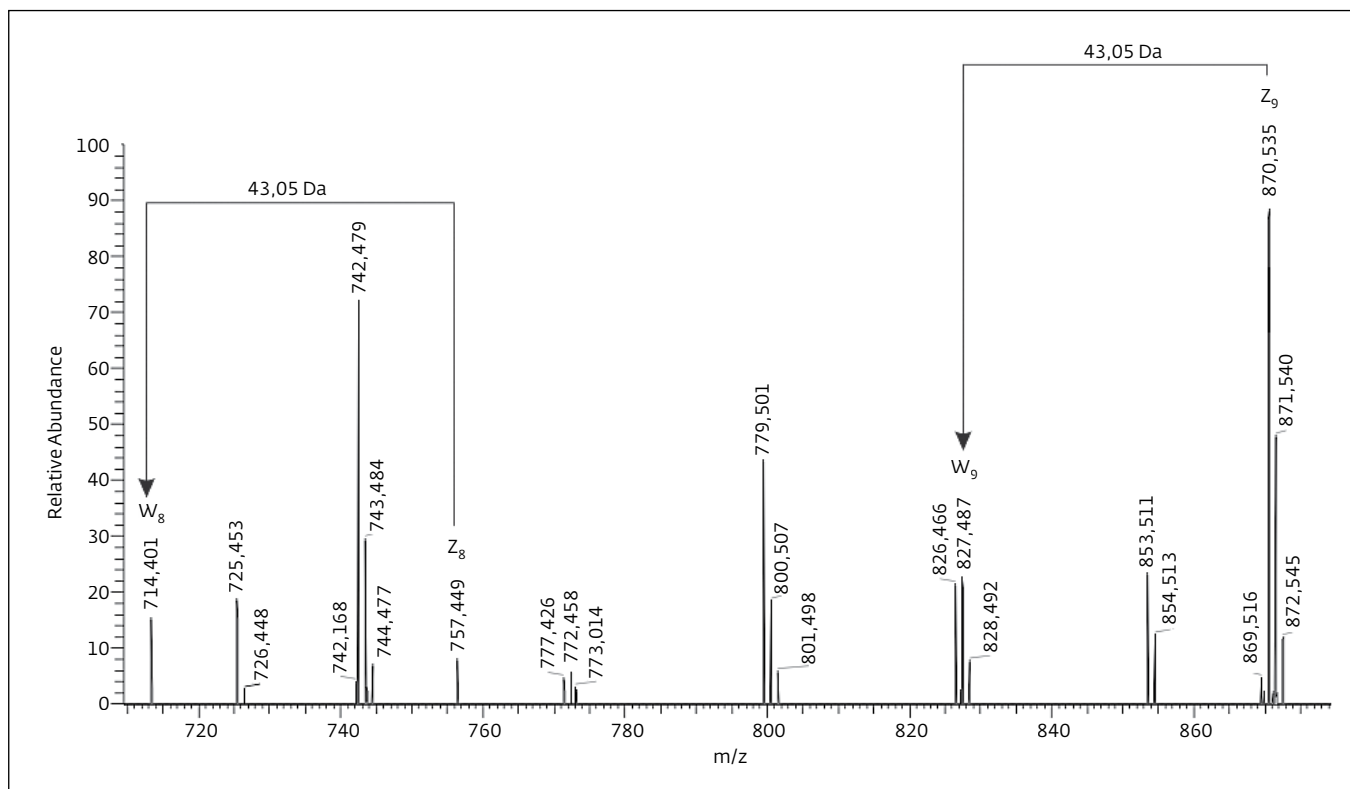


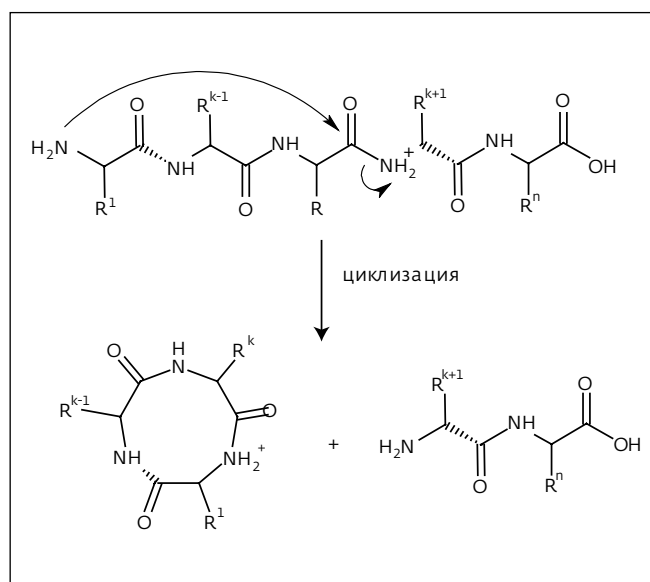
Рис.2. Фрагмент спектра ДЗЭ пептида GLLDVVKGAA

Понятно, что чем длиннее пептид, тем сложнее установить его полную структуру. В наших работах максимальная длина пептидов амфибий достигала 46 аминокислотных звеньев [4]. Фактически в этих случаях речь шла о небольших белках. Еще одна проблема связана с идентификацией изобарных аминокислот. Существует несколько пар "изобарных" аминокислот, т.е. таких, целочисленная масса которых совпадает. Для их идентификации ранее широко использовалась дериватизация внутри изобарной пары, но современные масс-спектрометры высокого разрешения позволяют с легкостью решить эту задачу по точно измеренной массе аминокислоты. Именно поэтому вся работа проводилась на орбитальных ловушках и масс-спектрометрах ионного циклотронного резонанса с преобразованием Фурье.

Не решенной до конца проблемой остается дифференциация изомерных лейцина и изолейцина. В этом случае наиболее эффективным оказывается поиск вторичных ионов. Для лейцина характерен выброс первичным фрагментным ионом изопропильной группы, а для изолейцина – этильной. Этот процесс наиболее выражен при захвате электрона (ДЗЭ). На

рис.2 представлен фрагмент масс-спектра, в котором потери изопропильных радикалов из первичных ионов z_8 и z_9 подтверждают присутствие в последовательности двух остатков лейцина [5].

Еще одной сложностью масс-спектрометрического секвенирования пептидов является

Рис.3. Циклизация двухзарядных ионов b^{2+} по типу "голова к хвосту"

циклизация коротких пептидов по механизму "голова к хвосту" с потерей молекул воды или аммиака. Последующее раскрытие образовавшегося цикла по любой амидной связи приводит к измененной исходной (реальной) последовательности (рис.3). Исследования показали, что циклизацию протонированной молекулы пептида можно блокировать дериватизацией N-концевой аминогруппы [6]. Для этого можно использовать методы ацилирования, сульфонилирования или введение фиксированного заряда на N-конец.

Очень важными оказались работы по раскрытию дисульфидных циклов у нетриптических пептидов. В обычных масс-спектрах информация об аминокислотной последовательности внутри таких циклов остается скрытой. Связи S-S создают трудности и при работе с белками, когда отдельные аминокислотные цепочки оказываются сшитыми такими мостиками. Были изучены варианты восстановления и окисления S-S-связи, предложен широкий круг дериватирующих реагентов [7]. Вместе с тем удалось обнаружить и новую серию фрагментных ионов, образующихся в условиях электрораспыления кожных секретов при низкоэнергетической активации разрыва столкновениями. Анализ серий образующихся ионов в этом случае позволяет делать выводы о последовательности внутри *Rana box*, не прибегая к какому-либо химическому раскрытию дисульфидной связи [8].

Для длинных пептидов с дисульфидным циклом на C-конце, предложена аналитическая процедура, приводящая практически к стопроцентному результату при определении последовательности аминокислот у новых пептидов (de novo-секвенирование). Для этой цели использована масс-спектрометрия высокого разрешения с параллельным иницированием фрагментации соударениями и при захвате электрона. Анализу необходимо подвергать не только исходный пептид, но и их производные, полученные при окислении и восстановлении дисульфидной связи.

Поскольку протеом каждой лягушки состоит из нескольких десятков пептидов, представление результатов в виде хроматограмм или таблиц не очень наглядно. Для визуализации полученных данных предложены двумерные карты, которые позволили отразить пол-

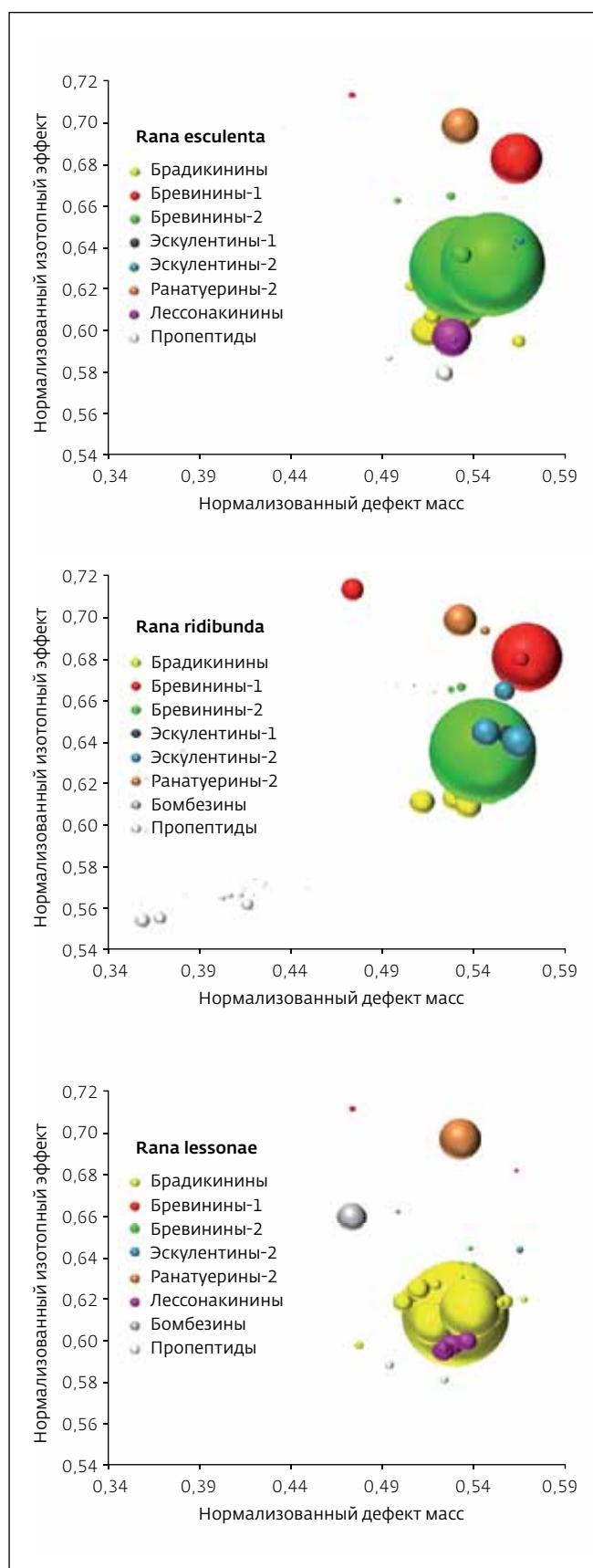


Рис.4. Пептидные карты трех близкородственных видов зеленых лягушек [10]

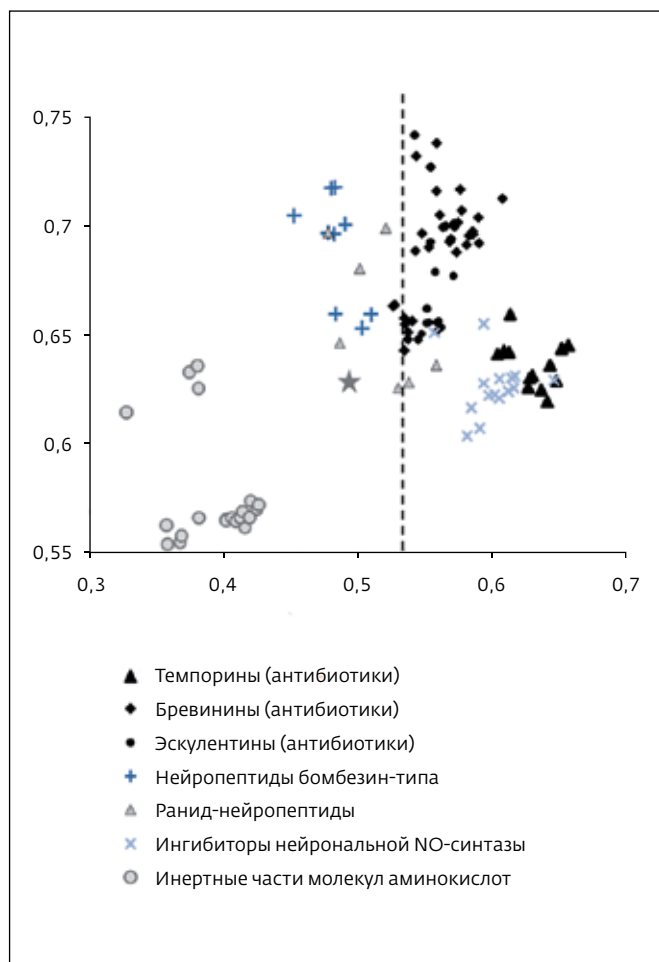


Рис.5. Двумерная карта пептидов лягушек с разными типами биологической активности [9]

ный протеом особи [9]. Они понятны и даже по-своему красивы.

На рис.4 представлены пептидные карты трех близкородственных видов лягушек. Цветом выделены пептиды разных семейств, а размер шарика соответствует количеству данного пептида в секрете. Карты сделаны в координатах "нормализованный дефект масс - нормализованный изотопный дефект", причем оба этих параметра легко вычисляются по кластеру молекулярного иона пептида в масс-спектрах [10]. В этом случае не требуется даже предварительно устанавливать последовательность аминокислотных звеньев. Учитывая, что *Rana esculenta* (рис.4а) является естественным гибридом *Rana ridibunda* и *Rana lessonae* (рис.4б и 4в), а морфологические характеристики их пересекаются, что приводит к ошибкам при проведении видовой идентификации, такая масс-спектрометрическая пептидная карта

может стать надежным инструментом таксономических исследований.

Эти карты оказались полезными с неожиданной стороны, поскольку на их основе можно сделать удивительный прогноз о характере потенциальной активности неохарактеризованного еще пептида. На рис.5 в тех же координатах представлены все пептиды с известным типом биологической активности [9]. Как видно, пептиды с определенной активностью занимают конкретную область пространства. Поэтому в зависимости от места расположения нового пептида на такой карте можно делать выводы о его возможной биологической активности [9].

Все пептиды в каждом секрете лягушек биоактивны, даже если активность некоторых из них пока не определена. Действуя совокупно, они проявляют синергетический эффект, усиливая защитные свойства всего кожного секрета. Поэтому крайне важно оценить вид и уровень активности каждого из компонентов. Охарактеризованность действия новых пептидов амфибий оставляет желать лучшего, большинство из них к настоящему времени остается непротестированными. Пептиды амфибий обладают уникальным механизмом действия на патогенные клетки, практически исключая привыкание. Интерес к изучению взаимосвязи структура-активность не ослабевает, особенно со стороны фармацевтических компаний, поскольку открываются широкие перспективы применения этих уникальных биологических соединений. Некоторые из протестированных нами новых пептидов имеют антибактериальную активность на уровне современных антибиотиков. В частности, бревинин 1Tb [2] оказался активен в отношении некоторых видов бактерий в концентрации 10^{-8} М.

ЛИТЕРАТУРА

1. Vanhoe D., Bruston F., Nicolas P., Amiche M. Antimicrobial peptides from hylid and ranid frogs originated from a 150-million-year-old ancestral precursor with a conserved signal peptide but a hypermutable antimicrobial domain. - European Journal of Biochemistry, 2003, vol.270, №9, p.2068-2081.
2. Samgina T.Yu., Vorontsov E.A., Gorshkov V.A., Hakalehto E., Hanninen O., Zubarev R.A., Lebedev A.T. Composition and antimicrobial activity of the skin peptidome of russian brown frog *Rana*

- temporaria. – Journal of Proteome Research, 2012, vol.11, p.6213–6222.
3. **Лебедев А.Т., Артеменко К.А., Самгина Т.Ю.** Основы масс-спектрометрии белков и пептидов. – М.: ТЕХНОСФЕРА, 2012.
 4. **Samgina T.Yu., Artemenko K.A., Gorshkov V.A., Zubarev R.A., Lebedev A.T.** De novo sequencing of peptides secreted by the skin glands of the caucasian green frog *Rana ridibunda*. – Rapid Communication for Mass Spectrometry, 2008, vol.22, p.3517–3525.
 5. **Samgina T.Yu., Artemenko K.A., Gorshkov V.A., Ogourtsov S.V., Zubarev R.A., Lebedev A.T.** Mass Spectrometric study of peptides secreted by the skin glands of the brown frog *Rana arvalis* from the Moscow region. – Rapid Communication for Mass Spectrometry, 2009, vol.23, p.1241–1248.
 6. **Samgina T.Yu., Kovalev S.V., Gorshkov V.A., Artemenko K.A., Poljakov N.B., Lebedev A.T.** N-terminal tagging strategy for de novo sequencing of short peptides by ESI-MS/MS and MALDI-MS. – Journal of American Society for Mass Spectrometry, 2010, vol.21, №1, p.104–111.
 7. **Samgina T.Yu., Vorontsov E.A., Gorshkov V.A., Artemenko K.A., Nifant'ev I.E., Kanawati B., Schmitt-Kopplin P., Zubarev R.A., Lebedev A.T.** Novel cysteine tags for the sequencing of non-tryptic disulfide peptides of anurans: ESI-MS study of fragmentation efficiency. – Journal of American Society for Mass Spectrometry, 2011, vol.22, p.2246–2255.
 8. **Samgina T.Yu., Vorontsov E.A., Gorshkov V.A., Artemenko K.A., Zubarev R.A., Ytterberg J.A., Lebedev A.T.** Collision-induced dissociation fragmentation inside disulfide C-terminal loops of natural non-tryptic peptides. – Journal of American Society for Mass Spectrometry, 2013, vol.24, №7, p.1037–1044.
 9. **Artemenko K.A., Zubarev A.R., Samgina T.Yu., Savitski M.M., Lebedev A.T., Zubarev R.A.** Two Dimensional mass mapping as a general method of data representation in comprehensive analysis of complex molecular mixtures. – Analytical Chemistry, 2009, vol.81, p.3738–3745.
 10. **Samgina T.Yu., Gorshkov V.A., Artemenko K.A., Zubarev R.A., Lebedev A.T.** LC-MS/MS with 2D mass mapping of skin secretions' peptides as a reliable tool for interspecies identification inside *Rana esculenta* complex. – Peptides, 2012, vol.34, p.296–302.