



Биолог. журн. Армении, 1 (65), 2013

ТВЕРДОФАЗНЫЙ СИНТЕЗ КАРДИОАКТИВНОГО ПЕПТИДА, ВЫДЕЛЕННОГО ИЗ ПРЕДСЕРДИЙ СВИНЬИ

Г.С. ЧАИЛЯН

Институт биохимии им. Бунятына НАН РА
samvelch@yahoo.com.

В целях продолжения исследований акад. Галояна, нами был проведен ряд экспериментов по выделению, очистке и определению биологической направленности нововыделенных соединений пептидной природы из предсердий и ушковых частей сердца свиньи. Для проведения биотестов требовалось получить препаративные количества исследуемых образцов. Для этого мы воспользовались методикой твердофазного синтеза пептидов с ее дальнейшей модификацией. Чистота и идентичность синтезированных препаратов проверялись методами высокоэффективной жидкостной хроматографии и масс-спектрального анализа.

*Твердофазный синтез – fmoc-аминокислоты – ВЭЖХ – фенилизотиоцианат –
масс-спектральный анализ*

Ավադեմիկոս Գալոյանի հետազոտությունների շարունակման նպատակով կատարվել են փորձեր խոզի նախասրտերից անջատած պեպտիդային բնույթի միացությունների մաքրման և կենսաբանական ուղղվածության որոշման համար: Կենսաթեստերի իրականացման համար անհրաժեշտ նմուշների պրեպարատիվ քանակներ ստանալու նպատակով օգտագործվել է պեպտիդային սինթեզի պինդ ֆազային ձևափոխված եղանակ: Սինթեզված նմուշների մաքրությունն ու իսկությունը ստուգվել է բարձր արդյունավետության հեղուկային քրոմատոգրամիայի և մասս-սպեկտրալի վերլուծության մեթոդներով:

*Պինդ ֆազային սինթեզ – բարձր էֆեկտիվության հեղուկային քրոմատոգրաֆիա – մասս
սպեկտրոմետրիա – fmoc-ամինաթթուներ – կարդիոպեպտիդներ – նախասրտեր*

For further studies established by Galoyan, a series of experiments on the isolation, purification and determination of biological direction of peptides isolated from pigs atria were carried out. For fulfilling the biotests the preparative amount of samples was required. A modified method of solid phase peptide synthesis was used. The synthesized peptide purity and identity were defined by HPLC and mass-spectral analysis.

*Solid phase synthesis – high performance liquid chromatography – mass spectrometry –
fmoc-aminoacids – cardiopeptides – atria*

В течение многих лет в Институте биохимии НАН РА в отделе биохимии нейrogормонов акад. Галояном с сотрудниками изучались пути регуляции и механизмы действия гипоталамических нейrogормонов на различные процессы в организме [5].

Подтверждение идеи о взаимосвязанном, взаимообусловленном, цельном функционировании такой системы, как гипоталамус – гипофиз – надпочечники, явилось переломным моментом в эндокринологии. Пополнение же этой концеп-

туальной триады, выдвинутой Галояном относительно взаимодействия гипоталамус - гипофиз – сердце, является огромным научным достижением. Впоследствии была обнаружена новая ткань-мишень-сердце, показана способность этого органа управлять функционированием специфических пептидов, а также существование механизма обратной связи между гипоталамусом и сердцем посредством этих пептидов[4].

Обнаружение кардиоактивных соединений – нейрогормона К, С, G и ряд других в гипоталамусе различных животных послужило началом работ не только по изучению молекулярных механизмов действия этих нейрогормонов, но и по поиску подобных соединений в сердце [6]. Основанием для всестороннего исследования биохимических и физико-химических свойств кардиоактивных начал послужили данные о наличии 2-х кардиоактивных соединений в сердечной мышце [7]. Было установлено участие нейрогормона “С” в регуляции гликолитических процессов и уровня циклических нуклеотидов посредством ингибирования ФДЭ цАМР, цАМФ- зависимой протеинкиназы и т.д. Было показано, что это соединение является низкомолекулярным и относится к гликопептидам [8].

Нами в лаборатории аналитической хроматографии и пептидного синтеза была проведена работа по выделению и очистке соединений пептидной природы из предсердий и ушковых зон сердца свиньи [9]. При разделении пептидных фракций препаративной ВЭЖХ, нами были выделены и очищены до гомогенного состояния 20 соединений пептидной природы [1]. Для определения биологической направленности все препараты были тестированы на изменения компонентов ЭКГ у крыс [10]. Результаты экспериментов показали, что 7 соединений имеют разносторонние факторы влияния на определенные компоненты ЭКГ. Пептид №7 показал наибольшую активность на изменение амплитуды компонента R, длительности комплекса QRS, амплитуды S и других параметров.

Для изучения биологических механизмов действия данного препарата стало необходимо наличие большого количества исследуемого образца. Ввиду того, что процесс выделения и очистки биопрепаратов является крайне неэффективным, трудоемким, времязатратным и не может обеспечивать хорошей воспроизводимости, стало крайне актуальным проведение химического синтеза данного препарата. Анализируя мировую литературу в области химического синтеза пептидов, мы пришли к выводу, что наиболее оптимальным для нас является методика твердофазного синтеза с использованием fmoc-защищенных аминокислот. Открытый в 1984 году твердофазный синтез пептидов (Solid phase peptide synthesis) имеет много преимуществ по сравнению с обычным синтезом с точки зрения эффективности, а также удобной обработки и очистки [1].

С использованием несколько различных методик: гидролиза данного препарата, модифицирования аминокислот фенилизотиоцианатом, нами был получен аминокислотный состав пептида №7[2]. Используя данные масс-спектрального и ЯМР-анализов, эдмоновской деградации, нам удалось получить не только аминокислотный состав, но также аминокислотную последовательность пептида №7.

Phe – Val – Pro – Ala – Met – Gly – Ile – Arg – Pro

Эффективный процесс твердофазного синтеза во многом зависит от правильного выбора различных условий его проведения, таких как выбор смолы, растворителя и кинетики проведения синтеза [3]. Эти переменные влияют на степень набухания смолы и связи ее с аминокислотами, количеству связывающих сайтов, что в конечном итоге влияет на синтез пептида в целом. Мы приспособили процесс твердофазного синтеза по отношению к нашим исследуемым пептидам с учетом особенностей их аминокислотной последовательности.

Материал и методика. Все использованные реактивы, растворители, смолы фирмы “Advanced Chem Techcompany”. Мы использовали fmoc-группы для защиты N-концов аминокислот в процессе синтеза и диметилформамид (DMF) как растворитель в процессе всего синтеза. В качестве подложки мы использовали кислотолабильную 2-хлортритильную смолу. Снятие защитных fmoc-групп проводилось с помощью раствора пиперидина в DMF.

Очень важным в процессе синтеза является посадка первой аминокислоты на смолу. Два грамма 2Cl-Trt-й смолы насыпали в шприц объемом 10 мл. Набирали DMF в шприц, давали набухнуть смоле в течение 15 мин. После этого DMF вымывался. Затем в шприц набирался раствор первой аминокислоты (fmoc-Pro) и активатор реакции (DIPEA) в соотношении $1_{\text{смолы}}/1,2_{\text{FMOC-PRO}}/4_{\text{DIPEA}}$. Реакция посадки первой аминокислоты шла 3 ч. Очень важным условием проведения синтеза является отсутствие свободных линкероов после посадки первой аминокислоты, поэтому смолу после связывания с первой аминокислотой обрабатывали смесью метилена, DIPEA (диизопропилэтиламин) и DMF в соотношении $80_{\text{DMF}}/15_{\text{МЕОН}}/5_{\text{DIPEA}}$ для блокирования возможно оставшихся свободных концов. После этого промывали смолу DMF 5 раз по 5 мин. Затем проводили деблокирование аминокислот 30%-ным раствором пиперидина в DMF 8 раз по 5 мин. После этого смолу промывали DMF 5 раз по 5 мин. Этот цикл повторялся в течение всего синтеза пептида. После каждого шага присоединения и деблокирования аминокислот контроль хода реакции проверялся Кайзер тестом, что представляет собой реакцию нингидрина со свободной аминогруппой с образованием характерного темно-синего цвета. Благодаря этому тесту, стал возможным пошаговый контроль реакций посадки и деблокирования аминокислот.

Очистка и контроль синтезированного пептида № 7 были проведены на 2-х компонентной препаративной системе ВЭЖХ фирмы Waters (USA). Для ввода образца использовался инжектор Rheodyne с объемом петли 500 мкл. Детектирование проводилось в диапазоне 190-360 нм. Мы использовали колонку “Symmetry Si-100 C18” (4,6x250 mm) для обращенно-фазовой ВЭЖХ. Скорость потока была 50 мл/мин. Использовалась градиентная система элюента $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}/\text{TFA}$ (98/2/0.1) / (0.100.0.1). Время анализа 15 мин. Рехроматографию проводили на аналитической системе Knauer HPLC. Использовалась колонка X-bridgeC18 (2.6x150 mm). Детектирование проводили при 214 нм.

Для подтверждения полученных данных синтезированный препарат был подвергнут масс-спектральному анализу на CSU “Analytical spectrometry”.

Результаты и обсуждение. Данные, полученные на хроматограмме, позволяют утверждать, что чистота синтезированного пептида №7 после очистки составляет более 99,6% (рис.1).

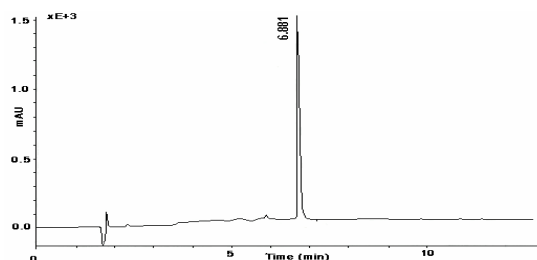


Рис. 1. Хроматограмма синтезированного и очищенного пептида №7. Колонка X-bridgeC18 (2.6x150 mm). Детектирование 214 нм.

Нами был проведен сравнительный хроматографический анализ нативного пептида №7 на колонке X-bridgeC18 в тех же условиях, что и его синтезированный аналог. Результаты сравнения представлены (рис. 2).

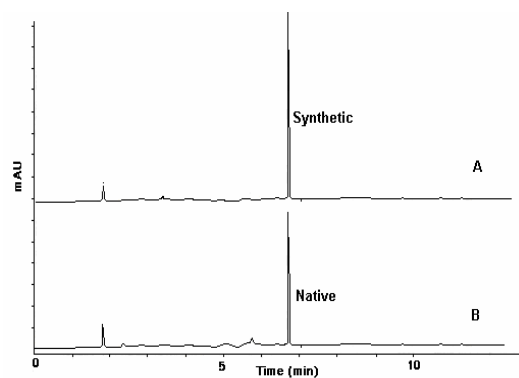


Рис. 2. Хроматограммы синтезированного (А) и нативного (В) пептидов. Колонка X-bridgeC18 (2.6x150 mm). Элюенты : H₂O/ACN/TFA (98/2/0.1). Детектирование при 214 нм. Условия градиента одинаковы для обеих хроматограмм.

Далее мы получили данные масс-спектрального анализа для синтезированного препарата (рис. 3) и сравнили его спектр со спектром нативного пептида. Результаты сравнения приведены (рис. 4).

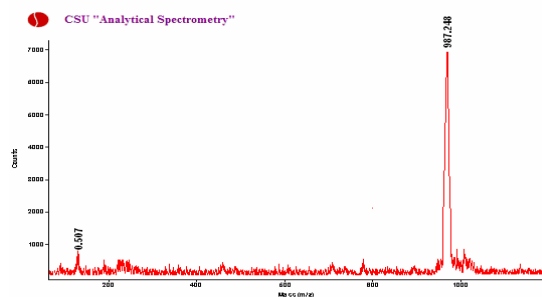


Рис. 3. Спектрограмма синтезированного препарата №7

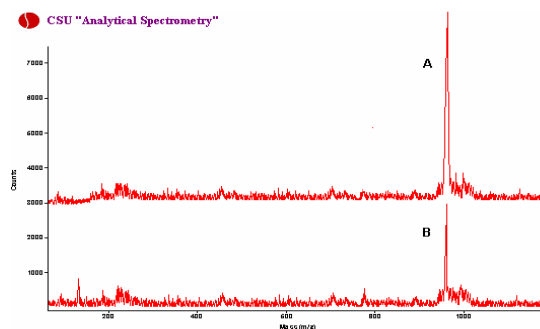


Рис. 4. Спектрограммы синтезированного (А) и нативного (В) препаратов.

Как видно из сравнения хроматограмм, синтезированный аналог и нативный пептид № 7 одинаковы по массе и времени выхода, что говорит об идентичности их структур и аминокислотной последовательности. Таким образом, используя метод твердофазного синтеза пептидов и учитывая особенности строения исследуемого пептида, нам удалось получить гомогенный и идентичный нативному пептид, состоящий из 9 аминокислот. В дальнейшем, имея достаточное количество препарата, мы планируем провести ряд биотестов по выявлению не только путей регуляции сердечной деятельности этим пептидом, но также механизмов действия на другие органы и системы.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Попова Т.В., Срапионян Р.М., Галоян А.А.* Обнаружение и идентификация в сердце быка новых кардиоактивных белков. *Вопр. мед. химии*, 37, 2, с. 56-58, 1991.
2. *Срапионян Р.М., Саакян С.А., Саакян Ф.М., Галоян А.А.* Выделение и характеристика кардиоактивного триптического фрагмента белка-носителя нейрогормона "С". *Нейрохимия*, 2, 3, с. 263-271, 1983.
3. *Срапионян, Р.М. Мисирян, С.С.* Разделение низкомолекулярных коронароактивных соединений сердечной мышцы сочетанием методов гелевой фильтрации и электрофореза в полиакриламидном геле. *Биолог. журн. Армении*, 27, 10, 102-104, 1974.
4. *Срапионян, Р.М. Попова, Т.В. Галоян, А.А.* Распределение кардиоактивных белковых комплексов в сердце различных животных. *Биолог. журн. Армении*, 40, 7, 588-590, 1987.
5. *Galoyan A.* The Regulation of Neurosecretion and Hormones of Hypothalamo-Neurohypophyseal System, USSR, 1963.
6. *Galoyan A.A.* Biochemistry of Novel Cardioactive Hormones and Immunomodulators of the Functional System Neurosecretory Hypothalamus, Endocrine Heart. Nauka Publ. p. 240, 1997.
7. *Galoyan A.A., Besedovsky H.* Handbook of Neurochemistry and molecular Neurobiology, 3rd edition, Springer Publishers, 500 p., 2008.
8. *Galoyan A.A., Brain Neurosecretorycytokins: Immune Response and Neuronal Survival*, VIII, 188 p., 2004.
9. *Galoyan A.A., Srapionyan R.M.* The purification of coronarodilatory proteins isolated from the hypothalamus. *Dokl. Akad. NaukArm.SSR*, 42, 4, p. 210-213, 1966.
10. *March J., Smith M.* March's advanced organic chemistry. Published by John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, p. 133, 2007.

Поступила 07.02.2013