

УДК 547.466.964:542.95

ЦИСТЕИНСОДЕРЖАЩИЕ ПЕПТИДЫ ВЫЗЫВАЮТ МИГРАЦИЮ МОНОЦИТОВ

2015 г. М. В. Сидорова[#], Т. И. Арефьева, М. П. Палькеева, А. С. Молокоедов,
А. А. Азьмуко, Н. Ю. Рулева, Е. А. Пылаева, Т. Л. Красникова, **Ж. Д. Беспалова**

ФГБУ «Российский кардиологический научно-производственный комплекс» Минздрава РФ,
121552, Москва, 3-я Черепковская ул., 15а

Поступила в редакцию 8.04.2014 г. Принята к печати 7.07.2014 г.

Твердофазным методом с использованием Fmoc-технологии проведен синтез ряда цистеинсодержащих линейных фрагментов моноцитарного хемотаксического белка-1 и хемокинового домена фракталкина и их аналогов, в которых остаток цистеина был модифицирован или заменен остатком серина. На основе линейных предшественников получены химерные молекулы – симметричные или несимметричные дисульфиды. Изучено влияние синтезированных соединений на клеточную подвижность *in vitro*. Показано, что пептиды, стимулирующие миграцию моноцитов, содержат в своем составе остаток цистеина со свободной тиольной группой. Пептиды с заблокированной SH-группой цистеина, с заменой остатка цистеина на серин, а также дисульфидные химерные молекулы хемокинетическими свойствами не обладают.

Ключевые слова: моноцитарный хемотаксический белок – 1, фракталкин, миграция лейкоцитов, пептидный синтез, дисульфидная связь.

ВВЕДЕНИЕ

[#] Сокращения: AcM – ацетамидометил; CCR2 – рецептор MCP-1; CDF – хемокиновый домен фракталкина (chemokine domain of fractalkine); DBU – 1,8-диазабицикло[5.4.0]ундец-7-ен; DTT – дитиотреит; Fmoc – 9-флуоренилметоксикарбонил; HOBt – 1-гидроксibenзотриазол; MALDI – матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация; MCP-1 – моноцитарный хемотаксический белок-1 (monocyte chemoattractant protein-1); 4-MePip – 4-метилпиперидин; NMM – *N*-метилморфолин; NADPH – никотинамидадениндинуклеотидфосфат; Nox – NADPH-оксидаза; TBTU – тетрафторборат 2-(1*H*-бензотриазол-1-ил)-1,1,3,3-тетраметиламиния; Pbf – 2,2,4,6,7-пентаметилдигидробензофуран-5-сульфонил; PT – коклюшный токсин *Pertussis toxin*; TIS – триизопропилсилан; Trt – тритил; АФК – активные формы кислорода; ФБ – фосфатный буфер.

[#] Автор для переписки (тел.: +7 (495) 414-67-16, факс: (495) 414-67-86, e-mail: peptide-cardio@yandex.ru).

Настоящая работа является продолжением наших исследований по поиску и синтезу пептидных фрагментов хемотаксических цитокинов (хемокинов), влияющих на миграцию лейкоцитов [1, 2]. В качестве объектов для изучения нами были выбраны моноцитарный хемотаксический белок-1 (MCP-1) и фракталкин, которые вызывают привлечение моноцитов в очаги воспаления и повреждения тканей и играют существенную роль как в патологических процессах, обусловленных воспалением, так и в процессах репарации [3-5]. Фракталкин является мембраносвязанным гликопротеидом. Хемокиновый домен фракталкина (CDF), обладающий хемоаттактантными свойствами, высвобождается из клеточной мембраны путем протеолиза [6]. Ранее нами были синтезированы и изучены в экспериментах *in vitro* и *in vivo* пептиды, соответствующие различным участкам аминокислотных последовательностей MCP-1 и CDF. Были найдены как ингибиторы (пептиды MCP-1-(65-76), MCP-1-(53-60) и CDF-(60-71)), так и активаторы миграции клеток (фрагменты MCP-1-(29-40) и CDF-(41-52)) [1, 2]. Свойства стимулирующего миграцию моноцитов пептида MCP-1-(29-40) были проанализированы нами в моделях воспаления и заживления ран у экспериментальных животных. Показано, что при локальном введении пептид вызывает привлечение моноцитов, стимулирует образование грануляционной ткани вокруг инородного материала и ускоряет заживление ран [7].

Моноциты играют существенную роль в репарации миокарда. В первые часы и сутки после инфаркта миокарда в зону повреждения мигрируют моноциты, экспрессирующие рецептор MCP-1 CCR2, функцией которых является удаление некротической ткани. Затем в миокард поступают моноциты, экспрессирующие рецептор фракталкина CX3CR1, которые участвуют в стимуляции ангиогенеза и образования внеклеточного матрикса [8]. В модели ишемии-реперфузии миокарда у крыс было обнаружено, что внутрисердечное введение пептида MCP-1-(29-40) в момент перевязки левой коронарной артерии сопровождается привлечением моноцитов в первые сутки после вмешательства. В отдаленные сроки – на 28-е сутки – количество немиоцитарных клеток в околорубцовой зоне снижается [9]. Полученный результат может свидетельствовать о кардиопротекторном действии пептида при инфаркте миокарда.

Особенностью хемокинов является наличие в их структуре в определенных положениях остатков цистеина, соединенных дисульфидными связями [5]. Известно, что дисульфидные мостики в белках выполняют разные функции: участвуют в повышении термодинамической стабильности белковых глобул, определяют механические свойства внеклеточных белков, тиол–дисульфидный обмен может лежать в основе регуляции ферментативной активности и т.п.[10]. Создание молекул, содержащих связанные природной дисульфидной связью линейные пептидные фрагменты из разных доменов белка с известной

или предполагаемой биологической активностью, является современным подходом к моделированию биологических функций белков.

Задачами данного этапа исследований являлось изучение механизмов стимулирующего действия пептида MCP-1-(29-40) на клеточную подвижность и поиск более эффективных стимуляторов клеточной подвижности. С этой целью мы получили химерные молекулы на основе пептидов MCP-1-(29-40) и CDF-(41-52), а также пептидов из других участков хемокинов и оценили их влияние на миграцию моноцитов *in vitro*.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В молекуле хемокина MCP-1 дисульфидная связь замкнута между остатками Cys¹¹ и Cys³⁶, в молекуле CDF S-S-мостиком соединены остатки Cys¹² и Cys⁵⁰ [5]. Пептиды MCP-1-(29-40) (II) и CDF-(41-52) (IV) содержат по одному из остатков цистеина, участвующих в образовании соответствующих S-S-мостиков. Нами были синтезированы дополнительно цистеинсодержащие пептидные фрагменты MCP-1-(7-18) (I) и CDF-(6-17) (III) и получены химерные молекулы (V) – (VIII), представляющие собой симметричные и несимметричные дисульфиды, построенные на основе линейных предшественников. Был также получен линейный гибрид (IX), в котором фрагменты MCP-1-(29-40) и CDF-(41-52) последовательно соединены амидной связью. Соответствующие структуры приведены в табл. 1. Кроме того, были синтезированы аналоги пептидных фрагментов MCP-(29-40) и CDF-(41-52), в которых сульфгидрильная группа цистеина была блокирована – пептид (X), либо вообще отсутствовала в молекулах аналогов (XI) и (XII) (табл.1) благодаря замене Cys → Ser. Для твердофазного синтеза линейных пептидов (I) – (IV), (IX) – (XII) была выбрана наиболее современная Fmoc-методология. Полученные пептиды очищали с помощью ВЭЖХ на обращенной фазе. Структуру пептидов подтверждали данными ¹H-ЯМР-спектроскопии и масс-спектрометрии, а их чистоту – данными аналитической ВЭЖХ. Характеристики синтезированных пептидов и полученных на их основе надмолекулярных конструкций приведены в табл. 1.

Синтез симметричных дисульфидов (V) и (VII) на основе линейных пептидных фрагментов хемокина MCP-1 был проведен в водной среде с использованием перекиси водорода при pH 7.5 – 8.0 [11] с достаточно высокими для подобных соединений выходами – 75 и 49% соответственно. Ниже представлена принципиальная схема синтеза симметричных и несимметричных дисульфидов.

При получении химерных молекул замыкание дисульфидных мостиков между разными пептидами часто осложняется побочными реакциями образования симметричных димеров. Для предотвращения таких побочных реакций при синтезе химерных молекул был

таблица 1

схема

применен метод направленного замыкания дисульфидной связи, с использованием временной 2-пиридинсульфенильной (PyS) [12] защиты цистеиновых остатков, участвующих в образовании дисульфида (см. схему синтеза). Эта устойчивая в кислых условиях защита активировывает сульфгидрильную функцию остатка цистеина и делает ее способной легко вступать в реакцию тиол-дисульфидного обмена, т.е. PyS-защита отщепляется при действии пептидных тиолов с образованием дисульфида. При синтезе соответствующих несимметричных дисульфидов (VI) и (VIII) тиольные функции Cys³⁶ в пептиде (II) и Cys⁵⁰ в пептиде (IV) были предварительно модифицированы действием дипиридилдисульфида (PyS)₂ (см. схему синтеза для (VI)). Полученные 2-тиопиридилные производные пептидов H-Arg-Arg-Ile-Thr-Ser-Ser-Lys-Cys(PyS)-Pro-Lys-Glu-Ala-OH (IIa) и H-Leu-Glu-Thr-Arg-Gln-His-Arg-Leu-Phe-Cys(PyS)-Ala-Asp-NH₂ (IVa) были очищены с помощью ВЭЖХ. Затем, путём тиол-дисульфидного обмена 2-тиопиридилного производных (IIa) и (IVa) с пептидными тиолами H-Ala-Pro-Val-Thr-Cys-Cys(Acm)-Tyr-Asn-Phe-Thr-Asn-Arg-OH (I) и H-Thr-Lys-Cys(Acm)-Asn-Ile-Thr-Cys-His-Lys-Met-Thr-Ser-OH (III), соответственно, были получены химерные молекулы – несимметричные дисульфиды (VI) из фрагментов хемокина MCP-1 и (VIII) из фрагментов CDF. Следует отметить, что, если при получении химерной молекулы (VIII), основным продуктом реакции было целевое соединение – несимметричный дисульфид (контроль с помощью аналитической ВЭЖХ), то в случае синтеза соединения (VI) в реакционной смеси был идентифицирован побочный симметричный дисульфид (VII) в достаточно большом количестве, что можно объяснить повышенной чувствительностью тиольного компонента (III) к кислороду воздуха. Тот факт, что образование димера (VII) нам удалось подавить путем постепенного прибавления тиольного компонента (III) свидетельствует в пользу такой интерпретации.

Следующий этап работы был посвящен оценке действия синтезированных соединений на миграцию моноцитов *in vitro*. Прежде всего, мы проверили, не связан ли механизм стимулирующего действия фрагмента MCP-1-(29-40) (II) на клеточную подвижность с активацией рецепторов хемокинов.

Биологический эффект хемокинов опосредован их взаимодействием с мембранными рецепторами, принадлежащими к семейству семидоменных G_i-белкоопределенных рецепторов. Известным ингибитором G_i-белков является коклюшный токсин (*Pertussis toxin*), который подавляет вызванную хемокинами миграцию клеток. Активация хемокиновых рецепторов сопровождается мобилизацией внутриклеточного Ca²⁺[13]. Мы проверили, не связано ли стимулирующее миграцию моноцитов действие пептида (II), соответствующего фрагменту MCP-1-(29-40), с активацией рецепторов хемокина MCP-1. *Pertussis toxin* не оказывал существенного влияния на спонтанную и пептидактивированную миграцию моноцитов крови *in vitro*, но ингибировал миграцию клеток, стимулированную MCP-1 (рис.1

а). Аналогичным действием на пептид- и MCP-1-стимулированную миграцию моноцитов обладал непептидный антагонист рецепторов CCR2 – BMS CCR2 22 [14]. Мы также не обнаружили быстрого повышения концентрации внутриклеточного Ca^{2+} под действием пептида в моноцитарных клетках линии THP-1 (рис. 1б), в то время как MCP-1 вызывал данный эффект. Таким образом, способность пептида (II) стимулировать миграцию, по всей видимости, не опосредована «классическими» G_i -белок сопряженными рецепторами, в частности, рецепторами MCP-1 CCR2.

При изучении действия синтезированных нами соединений на подвижность моноцитов в камере Бойдена оказалось, что, помимо известных пептидов (II) и (IV), цистеинсодержащие пептиды (I) и (III), соответствующие N-концевым участкам хемокинов MCP-1 и CDF также вызывали миграцию клеток (табл. 1). Химерные молекулы, включающие в свой состав связанные дисульфидной связью пептидные фрагменты, не влияли на миграцию моноцитов, и только линейный гибрид (IX) стимулировал миграцию с той же эффективностью, что и каждый из его компонентов (табл. 1). На основании этих данных мы предположили, что наличие тиольной группы в составе указанных пептидов является определяющим для реализации их действия на клеточную подвижность. Для проверки данной гипотезы нами были дополнительно получены фрагмент MCP-1-(29-40) с блокированной сульфгидрильной группой (X), а также сериновые аналоги (XI) и (XII) пептидов MCP-1- (29-40) и CDF-(41-52). Блокирование сульфгидрильной группы в пептиде (X), а также замена остатка Cys→ Ser в пептидах (XI) и (XII) приводили к потере хемотаксической активности моноцитов в камере Бойдена (рис. 2, табл. 1).

рис. 2

Промежуточным соединением в окислении SH-групп белков и пептидов является сульфеновая кислота [15]. Димедон (5,5-диметилциклогексан-1,3-дион) необратимо связывается с сульфеновой кислотой, препятствуя как ее восстановлению в присутствии восстанавливающих агентов, так и образованию дисульфидных связей с остатками цистеина (или глутатиона). Добавление димедона в культуру клеток подавляло миграцию моноцитов под действием пептида MCP-1-(29-40) (II) (рис. 3). В указанной концентрации димедон не влиял на жизнеспособность клеток (данные не представлены).

рис. 3

Несмотря на то, что исследуемые пептиды являются фрагментами молекул хемокинов, механизм их действия оказался не связанным с активацией рецепторов хемокинов. Так, в нашей модельной системе изучения миграции клеток химический антагонист рецепторов CCR2 подавлял миграцию, стимулированную MCP-1, но не пептидным фрагментом MCP-1-(29-40) (II). Аналогичный эффект наблюдали при использовании коклюшного токсина *Pertussis toxin PT*, который, как известно, является ингибитором передачи внутриклеточных сигналов от G_i -белоксопряженных рецепторов, в том числе рецепторов хемокинов [3]. Мы не наблюдали быстрого повышения концентрации внутриклеточного Ca^{2+} при добавлении

пептида в культуру промоноцитарных клеток линии ТНР-1, в то время как хемокин MCP-1 вызывал данный эффект (рис. 1). Наконец, действие фрагментов MCP-1-(29-40) пептид (II) и CDF-(41-52) пептид (IV) на миграцию клеток проявлялось лишь при концентрациях пептидов порядка 100 мкМ [1, 2], что косвенно указывает на вовлечение «нерецепторных» механизмов в стимуляцию подвижности клеток.

Нами обнаружено, что активность пептида зависит от наличия в его структуре «свободной» тиольной группы – пептиды с блокированной йодацетамидом или димедоном SH-группой цистеина, с заменой остатка цистеина на серин, а также дисульфидные химерные молекулы не обладали хемокинетическими свойствами.

Ранее хемокинетические свойства были выявлены у пептидных фрагментов матричного белка ламинина, которые могут образовываться в очагах воспаления [16]. Данные пептиды в диапазоне концентраций 50-200 мкг/мл стимулировали хемотаксис лейкоцитов человека *in vitro*. Интересно отметить, что в состав наиболее активных в плане стимуляции миграции клеток пептидных фрагментов, входили остатки цистеина. Хемотаксические свойства были обнаружены у тиоредоксина – тиол-дисульфид-оксиредуктазы, которая может секретироваться лейкоцитами во внеклеточное пространство в очагах воспаления. Как и в случае исследуемых нами пептидов, миграция клеток под действием тиоредоксина не сопровождалась мобилизацией внутриклеточного Ca^{2+} и не ингибировалась коклюшным токсином. Кроме того, мутантная форма тиоредоксина с заменами C32S и C35S не обладала хемотаксической активностью [17]. Механизм стимулирующего действия фрагментов ламинина и тиоредоксина на миграцию лейкоцитов установлен не был.

Большинство мембранных гликопротеинов лейкоцитов содержат остатки цистеина, которые преимущественно образуют дисульфидные связи. Выделяют «структурные» (стабильные, защищающие белки от денатурации) и «лабильные» (доступные для восстановления) S-S- связи [18,19]. Активация иммунных клеток сопровождается секрецией ферментов с восстанавливающей активностью, вследствие чего количество SH-групп на поверхности клеток увеличивается [20]. «Лабильные» дисульфидные связи обнаружены в составе интегринов – трансмембранных гетеродимерных клеточных рецепторов, участвующих в адгезии и миграции клеток [21]. Так, восстановление –S-S- связей в структуре β -субъединицы $\alpha_2\beta_3$ -интегрина вызывает агрегацию тромбоцитов [22]. Показано, что под действием восстанавливающих агентов (в частности, дитиотреита) возрастает аффинность $\alpha_4\beta_1$ -интегринов (VLA-4) в клетках монобластоидной линии U937, и этот эффект не зависит от активации внутриклеточных сигнальных молекул (т.н. «inside-out» сигналинга), который является установленным регулятором активности молекул адгезии [23]. Дитиотреит стимулировал адгезию гранулоцитов на пластиковой поверхности,

зависимую от $\alpha_M\beta_2$ -интегринов (Mac-1), а также адгезию миелоидных клеток HL-60 к фибронектину, опосредованную $\alpha_5\beta_1$ интегринными (VLA-5 [24, 25]). В отличие от адгезии, индуцированной другими агентами, дитиотреитзависимая адгезия клеток была вызвана увеличением аффинности связывания молекул интегринов с «подложкой» и не сопровождалась выраженными перестройками цитоскелета.

По данным работы [26], инкубирование мононуклеарных клеток крови с *N*-ацетилцистеином (AcC) приводило к увеличению содержания тиольных групп в составе мембранных белков, не влияя на содержание SH-групп в цитозольных белках. Одной из мишеней восстанавливающего действия *N*-ацетилцистеина, как показали авторы, является α_4 -субъединица интегринов: после «праймирования» *N*-ацетилцистеином лимфобласты приобретали способность связываться с фибронектином – лигандом $\alpha_4\beta_1$ -интегринов. По данным работы [27], активация интегринов моноцитов/макрофагов $\alpha_x\beta_2$, сопровождающаяся увеличением связывания одного из лигандов C3-компонента комплемента, также может быть вызвана структурными изменениями в богатом остатками цистеина участке α -субъединицы.

Моноциты/макрофаги способны продуцировать существенное количество активных форм кислорода (АФК) [28]. Как установлено исследованиями, NADPH-оксидаза 4 (Nox 4) является основным продуцентом H_2O_2 , которая может диффундировать через липидный бислой клеточной мембраны и попадать во внеклеточное пространство [29]. Показано, что активность Nox 4 в клетках постоянна [30]. Внеклеточная перекись водорода может окислять тиольные группы в молекулах адгезии, что приводит к образованию внутримолекулярных дисульфидных связей и изменению сродства к соответствующим лигандам [31]. В присутствии цистеинсодержащих пептидов дисульфидные «мостики», вероятно, могут образовываться также между молекулами адгезии и пептидами, что может сопровождаться ингибированием функции интегринов и, соответственно, ослаблением адгезии клеток. Для моноцитов характерна экспрессия широкого спектра молекул адгезии, в том числе различных представителей β_1 - и β_2 -интегринов, что определяет способность клеток к адгезии и миграции на различных типах «подложки» [32, 33]. Можно предположить, что циклические процессы восстановления (под действием экзогенных цистеинсодержащих пептидов) и окисления (под влиянием эндогенных АФК) тиольных групп молекул адгезии моноцитов могут лежать в основе наблюдаемого нами усиления подвижности клеток.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использованы производные *L*-аминокислот (Fluka и Bachem, Швейцария), DIC, NMM, HOBT, TIS, *N*-метилпирролидон, дихлорметан, 4-метилпиперидин, метанол и TFA (Fluka, Швейцария). Аналитическую ВЭЖХ проводили на хроматографе Gilson, (Франция), использовали колонки Kromasil 100 C18, 5 мкм, 4.6x250 мм (Швеция), подвижная

фаза: буфер А — 0.1% TFA, буфер Б – 80% ацетонитрила в буфере А, элюция градиентом концентрации буфера Б в буфере А от 10 до 70% за 30 мин; скорость потока 1 мл/мин, детекция при 220 нм. Спектры ¹H-ЯМР получены на спектрометре WM-500 (Bruker) (ФРГ) в DMSO-*d*₆ при 300 К, концентрация пептидов составляла 2-3 мг/мл. Химические сдвиги измерялись относительно тетраметилсилана. Масс-спектры регистрировали на приборе Ultraflex TOF/TOF (Bruker Daltonics, ФРГ) с ионизацией методом MALDI и времяпролетной базой.

Твердофазный синтез пептидов

Твердофазный синтез был проведен на автоматическом синтезаторе Tribute-UV Protein Technologies Inc. (США) в соответствии со стандартным протоколом для однократной конденсации Fmoc-аминокислот с использованием TBTU [33], взятых в 5-кратном избытке по отношению к аминогруппам полимера (табл. 2). Для блокирования функциональных групп боковых цепей аминокислот были использованы кислотолabile защиты: *Bu*^t- для гидроксильной функции треонина, серина, тирозина и карбоксильных групп аспарагиновой и глутаминовой кислот; *Trt*- для карбоксамидных функций аспарагина и глутамина, имидазольного кольца гистидина и сульфгидрильной группы цистеина; *Pbf*- для гуанидиновой функции аргинина и *Woc* – для ε-аминогруппы лизина. Для защиты тиольной функции цистеиновых остатков, не участвующих в образовании дисульфидной связи внутри химерных молекул (*Cys*⁸ додекапептида (I) и *Cys*¹² додекапептида (III)), применяли постоянную *Acst*-защиту, устойчивую в условиях синтеза и последующих химико-биологических процедур. Синтез пептидов проводили путем ступенчатого наращивания аминокислотной цепи, начиная с C-концевого остатка. При получении пептидов (I)-(III), (X) и (XI) с C-концевой карбоксильной группой в качестве носителя использовали сополимер стирола с 1% дивинилбензола с 4-гидроксиметилфеноксиметильной якорной группой (полимер Ванга) и исходили из 0.35 ммоль соответствующих Fmoc-аминоацилполимеров фирмы Bachem (Швейцария), а в синтезе C-концевых амидов (IV), (IX) и (XII) использовали эквивалентное количество полимера Ринка (Novabiochem, Великобритания), с содержанием аминогрупп – 0.54 ммоль/г.

Таблица 2. Протокол твердофазного синтеза пептидов

№	Операция	Реагент	Время обработки, мин
1	Деблокирование α-аминогрупп	10% 4-MePip/2% DBU/ DMF	2 x 1.5
2	Промывка	DMF	4 x 0.5
3	Конденсация	1.5 ммоль Fmoc-AA + 1.5 ммоль TBTU + 1.5	45

		ммоль NMM в DMF	
4	Промывка	DMF	5x 0.5

Заключительное деблокирование и отщепление пептидов (I) – (IV), (IX) – (XII) от полимера проводили в одну стадию путем обработки соответствующего пептидилполимера 10 мл смеси, содержащей 90% TFA, 2.5% деионизованной воды, 5% тиоанизола и 2.5% TIS, в течение 2–3 ч. Затем полимер отфильтровывали, промывали 2x2 мл деблокирующей смеси, фильтрат упаривали и к остатку прибавляли 50 мл сухого этилацетата или эфира. Осадок отфильтровывали, промывали дихлорметаном (3x3мл), эфиром (3x5 мл), сушили в вакуум-эксикаторе. «Сырые» продукты твердофазного синтеза очищали с помощью препаративной ВЭЖХ, используя колонку с сорбентом Eurosphere100-10 C18 (20x250 мм, Knauer, ФРГ), размер частиц сорбента 10 мкм. В качестве элюентов использовали буфер А – 0.1% водный раствор TFA и буфер Б – 80 % ацетонитрила в воде. Элюировали со скоростью 10 мл/мин от 100% буфера А градиентом 0.5% буфера Б в минуту. Пептиды детектировали при длине волны 220 нм. Фракции, содержащие целевой продукт, объединяли и после упаривания ацетонитрила лиофилизировали. Гомогенность продуктов определяли с помощью аналитической ВЭЖХ, структуру подтверждали данными масс-спектрометрии и ¹H-ЯМР-спектроскопии. Выходы и характеристики пептидов приведены в таблице 1.

При получении соединений с дисульфидными связями или с модифицированной тиольной группой для контроля реакции использовали качественный тест Эллмана [35] на свободную сульфгидрильную группу и аналитическую ВЭЖХ. Соответствующие продукты выделяли из реакционных смесей с помощью препаративной ВЭЖХ в вышеприведенных условиях.

Синтез димера пептида MCP-1-(29 – 40) MCP-1-(29-40)

MCP-1-(29-40) (V)

Значение pH раствора 40 мг (0.029 ммоль) пептида (I) в 4 мл деионизованной воды доводили до 8.0 с помощью 1% раствора гидроокиси аммония, добавляли при перемешивании 100 мкл 0.3% водного раствора перекиси водорода. Выход димера (V) 32 мг (80%). Характеристики пептида (V) и всех нижеописанных соединений приведены в табл. 1.

Синтез несимметричного дисульфида MCP-1-(29-40)

MCP-1-(7-18) (VI)

Для получения -[Cys(PyS)-производного пептида (II) (пептид (IIa)) 22.0 мг (0.016 ммоль) пептида (II) растворяли в 10 мл 0.05% водной TFA, прибавляли раствор 4 мг дипиридилдисульфида в 4 мл ацетонитрила и перемешивали 30 мин. Выход 2-тиопиридилного производного (IIa) 17.0 мг (71%) (время удерживания – 16.8 мин).

К раствору 12.2 мг (0.008 ммоль) производного (**IIa**) в 25 мл 0.1 М аммоний-ацетатного буфера pH 8.0 пятью порциями прибавляли раствор 12.0 мг (0.008 ммоль) пептида (**I**) в ацетонитриле. Выход несимметричного дисульфида (**VI**) 10.6 мг (46.8 %).

Синтез S-карбоксамидометильного производного пептида MCP-1-(29 – 40) (X).

40 мг (0.029 ммоль) пептида (**II**) растворяли в 3 мл 0.1 н. Na₂HPO₄ с pH 8.0, добавляли 16.6 мг (0.09 ммоль) йодацетамида и перемешивали 30 мин. Выход 34 мг (82%).

Мононуклеарные клетки из крови доноров получали центрифугированием в градиенте плотности Histopaque (Sigma-Aldrich) по методике Boyum [36]. Кровь разводили в 3-5 раз фосфатным буфером без Ca²⁺ и Mg²⁺ (pH 7.4) (Sigma-Aldrich). В стерильную пробирку наливали раствор Histopaque (Sigma, ρ=1.077), поверх градиента плотности «наслаивали» разведенную кровь (соотношение кровь – градиент, 4:7). Пробирки центрифугировали 20 мин при комнатной температуре при 400g без торможения. Собирали клеточное кольцо, расположенное в интерфазе. Полученные клетки отмывали в ФБ pH 7.4 3 раза по 10 мин при 200g и 4°C, количество выделенных клеток подсчитывали в камере Горяева. Жизнеспособность клеток, определённая по исключению красителя трипановый синий, превышала 96 %.

Анализ клеточной миграции в модифицированной камере Бойдена проводили согласно описанной ранее методике [37]. В нижние ячейки камеры помещали раствор хемоаттрактанта. В верхние ячейки камеры вносили суспензию мононуклеарных клеток, 2-4 млн/мл, в среде Хэнкса (ПанЭко) с добавлением 20 mM HEPES и 0.5% бычьего сывороточного альбумина (Invitrogen) или 1% сыворотки человека (все компоненты Invitrogen). Верхние и нижние ячейки разделяли пористой мембраной (Osmonics Incorporated) с размером пор 5 мкм. Камеру Бойдена помещали в CO₂-инкубатор на 1 ч. Непромигрировавшие клетки счищали с верхней части мембраны, а клетки, оставшиеся на фильтре, фиксировали в метаноле в течение 5 мин и окрашивали красителем Гимза (Sigma-Aldrich). Мембрану с прокрашенными клетками сканировали (HP ScanJet 5300C) и анализировали с использованием программного обеспечения ScionImage для WindowsAlpha 4.0.3.2 (ScionCorporation). Данные выражали в относительных единицах.

MCP-1 (R&D systems) в концентрации 5 нМ, пептиды в концентрации 0.1 – 1.0 мкМ добавляли в нижние ячейки камеры. Коклюшный токсин (*Pertussis toxin*, Sigma) в концентрации 1 мкг/мл или антагонист рецептора CCR2 (N-[2-[[2-[(4-метилсульфонилбензоил)амино]циклоксил]амино]-2-оксоэтил]-2-(пропан-2-илкарбамоиламино)-5-(трифторметил)бензамид, BMS CCR2 22, CAS 445479-97-0, SantaCruz) в концентрации 10 нМ вносили в верхние и нижние части камеры.

Промоноцитарная клеточная линия THP-1 была получена из Американской коллекции клеточных культур (ATCC) [<http://www.lgcstandards-atcc.org/>]. Клетки культивировали при

37°C и в атмосфере 5% CO₂ в среде RPMI 1640, содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС), 2 мМ глутамин, по 100 ед./мл пенициллина и стрептомицина (все компоненты Invitrogen) и 20 мкМ меркаптоэтанол (Sigma-Aldrich).

Для **анализа содержания внутриклеточного Ca²⁺** клетки THP-1 ресуспендировали в среде Хэнкса с добавлением 20 мМ HEPES, 2.5 мМ пробенецида (водорастворимая форма, MolecularProbes) и 2 мкМ ацетоксиметилового эфира Fluo-4 (MolecularProbes). Клетки инкубировали 30 мин при 37°C, отмывали и инкубировали еще 30 мин при комнатной температуре в среде Хэнкса с добавлением 20 мМ HEPES и 2.5 мМ пробенецида для деэтерификации метки Fluo-4 (в соответствии с рекомендацией производителя). К суспензии клеток добавляли MCP-1 (до 5 нМ) или исследуемые пептиды. Флуоресценцию клеток измеряли в режиме «реального времени» на поточном цитофлуориметре FACSCalibur, используя программное обеспечение CellQuest (BD Immunocytometry Systems).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Сидорова М.В., Молокоедов А.С., Арефьева Т.И., Кухтина Н.Б., Красникова Т.Л., Беспалова Ж.Д., Бушуев В.Н. // Биоорган. химия. 2004. Т. 30. С. 582–593. (Sidorova, M. V.; Molokoedov, A. S., Aref'eva, T. I.; Kukhtina, N. B.; Krasnikova, T. L., Bepalova, Zh. D.; Bushuev, V. N. // Russ. J. Bioorg. Chem. 2004. V. 30. P. 523–533.)
2. Кухтина Н.Б., Арефьева Т.И., Рулева Н.Ю., Сидорова М.В., Азьмуко А.А., Беспалова Ж.Д., Красникова Т.Л. // Биоорган. химия. 2012. Т. 38. №6. С. 660–666. (Kukhtina N.B., Aref'eva T.I., Ruleva N.Yu., Sidorova M.V., Azmuko A.A., Bepalova Zh.D., Krasnikova T.L. // Russ. J. Bioorg. Chem. 2012. V. 38. P. 584–589.)
3. Baggiolini M. // Nature. 1998. V. 392. P. 565–568.
4. Melgarejo E., Medina M.A., Sánchez-Jiménez F., Urdiales J.L. // Intern. J. Biochem. And Cell. Biol. 2009. V. 41. P. 998–1001.
5. Allen S.J., Crown S.E., Handel T.M. // Annu. Rev. Immunol. 2007. V. 25. P. 787–820
6. Harrison J.K., Fong A.M., Swain P.A., Chen S., Yu Y.R., Salafranca M.N., Greenleaf W.B., Imai T., Patel D.D. // J. Biol. Chem. 2001. V. 276. №24. P. 21632–21641.
7. Арефьева Т.И., Соколов О.В., Пылаева Е.А., Кухтина Н.Б., Потехина А.В., Рулева Н.Ю., Азьмуко А.А., Сидорова М.В., Беспалова Ж.Д., Красникова Т.Л. // ДАН. 2012. Т. 446. № 1. С. 106–109. (Aref'eva T.I., Sokolov V.O., Pylaeva E.A., Kukhtina N.B., Potekhina A.V., Ruleva N.Y., Sidorova M.V., Bepalova Z.D., Azmuko A.A., Krasnikova T.L. // Doklady Biological Sciences. 2012. V. 446. №1. P. 327–330).
8. Nahrendorf M., Pittet M.J., Swirski F.K. // Circulation. 2010. V. 121. №. 22. P. 2437–2445.
9. Красникова Т.Л., Беспалова Ж.Д., Сидорова М.В., Азьмуко А.А., Рулева Н.Ю., Гаврилова С.А., Ахметишина М.Р., Бердалин А.Б., Буравков С.В. // Тезисы докладов VI Российского симп. «Белки и пептиды» Уфа 11–15 июня 2013. С. 79.
10. Шульц Г., Ширмер Р. // Принципы структурной организации белков: Пер. с англ. М.: Мир, 1982. (Shulz G.E, Shirmer R.H. // Principles of Protein Structure. Springer-Verlag, New York-Heidelberg-Berlin, 1979).
11. Сидорова М.В., Молокоедов А.С., Азьмуко А.А., Кудрявцева Е.В., Краузе Э., Овчинников М.В., Беспалова Ж.Д. // Биоорган. Химия. 2004. Т. 30. С. 115–125. (Sidorova M.V., Molokoedov A.S., Az'muko A.A., Kudryavtseva E.V., Krause E., Ovchinnikov M.V., Bepalova Zh.D. // Russ. J. Bioorg. Chem. 2004. V. 30. P. 101–110).
12. Andreu D., Albericio F., Sole N.A., Munson M.C., Ferrer M., Barany G. // Peptide Synthesis Protocols. Eds. M.W. Pennington, B.M. Dunn. New Jersey, Totowa: Humana Press Inc. 1994. P. 91–169.
13. Neote K., DiGregorio D., Mak J.Y., Horuk R., Schall T.J. // Cell. 1993. V. 72. P. 415–425.

14. *Cherney R.J., Mo R., Meyer D.T., Nelson D.J., Lo Y.C., Yang G., Scherle P.A., Mandlekar S., Wasserman Z.R., Jezak H., Solomon K.A., Tebben A.J., Carter P.H., Decicco C.P.* // *J. Med. Chem.* 2008. V. 28. P. 721–724.
15. *Winterbourn C.C., Hampton M.B.* // *Free Radical Biology & Medicine.* 2008. V. 45. P. 549–561.
16. *Harvath L., Brownson N.E., Fields G.B., Skubitz A.P.* // *J. Immunol.* 1994. V. 152. P. 5447–5456.
17. *Bertini R, Howard Z, Dong H.-F., Oppenheim J.J., Bizzarri C., Sergi R., Caselli G., Pagliei S., Romines B., Wilshire J.A., Mengozzi M., Nakamura H., Yodoi J., Pekkari K., Gurunath R., Holmgren A., Herzenberg L.A., Herzenberg L.A., Ghezzi P.* // *J. Exp. Med.* 1999. V. 189 (11). P. 1783–1789.
18. *Hogg P.J.* // *J. Thromb. Haemost.* 2009. V. 7(Suppl. 1). P. 13–16.
19. *Metcalf C., Cresswell P., Ciaccia L., Thomas B., Barclay N.* // *Open Biol.* 2011. November; 1(3): 110010.
20. *Lawrence DA, Song R, Weber P.* // *J. Leuk. Biol.* 1996. V. 60 P. 611–618.
21. *Legate K.R., Wickström S.A., and Fässler F.* // *Genes Dev.* 2009. V. 23. P. 397–418.
22. *Essex D.W.* // *Antioxid. Redox Signal.* 2009, 11, 1191–1225.
23. *Chigaev A.I, Zwartz G.J., Buranda T., Edwards B.S., Prossnitz E.R., Sklar L.A.* // *J. Biol. Chem.* 2004. V. 279 (31). P. 32435–32443.
24. *Schwartz B.R.I, Harlan J.M.* // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1989. V.165 (1). P. 51–57.
25. *Davis G.E.I, Camarillo C.W.* // *J. Immunol.* 1993. V. 151(12). P. 7138–7150.
26. *Laragione T., Bonetto V., Casoni F., Massignan T., Bianchi G., Gianazza T., and Ghezzi P.* // *J. Biol. Chem.* 2001. V. 276 (10). P. 6922–6929.
27. *Zang Z., Springer T.* // *J. Biol. Chem.* 2001. V. 276. №10. P. 6922–6929.
28. *De Oliveira-Junior E.B., Bustamente J., Newburger P.E., and Condino-Neto A.* // *Scand. J. Immunol.* 2011. V. 73. P. 420–427.
29. *Takac I., Schröder K., Zhang L., Lardy B., Anilkumar N., Lambeth D., Shah A.M., Morel F., Brandes R.* // *J. Biol. Chem.* 2011. V. 286(15). P. 13304–13313.
30. *Martyn K.D.I, Frederick L.M., von Loehneysen K., Dinauer M.C., Knaus U.G.* // *Cell Signal.* 2006. V. 18 (1). P. 69–82.
31. *Eble J.A.I, de Rezende F.F.* // *Antioxid Redox Signal.* 2014 . V. 20 (13). P. 1977–1993.
32. *Blankenberg S., Barbaux S., Tiret L.* // *Atherosclerosis.* 2003. V. 170. P. 191–203.
33. *Hynes R.O.* // *Cell.* 1992. V. 69. P. 11–25.
34. *Knorr R., Trzeciak A., Bannwarth W., Gillessen D.* // *Tetrahedron Lett.* 1989. V. 30. P. 1927–1930.
35. *Ellman G.L.* // *Arch. Biochem. Biophys.* 1959. V. 82. P. 72–77.
36. *Böyum A.* // *Scand. J. Clin. Lab. Invest. Suppl.* 1968. V. 97. P. 9–29.
37. *Falk W., Goodwin R.H. Jr., Leonard E.J.* // *J. Immunol. Methods.* 1980. V. 33. P. 239–247.

Cys-Containing Peptides Cause Migration of Monocytes

2014. M. V. Sidorova[#], T. I. Arefieva, M. E. Palkeeva, A. S. Molokoedov,

A. A. Az'muko, N. Yu. Ruleva, E. A. Pylaeva, T. L. Krasnikova,

Zh. D. Beshpalova

[#]Phone: +7-495-414-67-16, fax: +7-495-414-67-86, e-mail: peptide-cardio@yandex.ru,
Russian Cardiological Research and Production Complex, Russian Ministry of Public Health, 3rd
Cherepkovskaya str., 15a, 121552, Moscow, Russia

Automated Fmoc solid-phase technique was used to synthesize Cys-containing linear peptide fragments of monocyte chemoattractant protein -1 and chemokine domain of fractalkine along with their analogues with Cys residue being either modified or replaced with Ser. Chimeric symmetric and asymmetric disulfides were also prepared from the former linear precursors. A SAR study on a set of the newly synthesized peptides revealed that capacity to stimulate migration of monocytes and to influence cell motility *in vitro*, in general, critically depends on the presence of Cys free thiol group in the molecule. Notably, all analogs lacking this feature, including chimeric disulfides, demonstrated lack of effect on monocyte migration.

Keywords: chemokines, monocyte chemottractant protein – 1, fractalkine, leukocyte migration, , peptide synthesis, disulfide bonds

ПОДПИСИ К РИСУНКАМ

Рис.1. Миграция моноцитов в присутствии пептида (II) не связана с активацией рецепторов хемокинов. (а) Миграция моноцитов периферической крови человека в модифицированной камере Бойдена. Концентрация MCP-1 – 5нМ, пептида (II) – 0.1 мкМ, коклюшного токсина (РТ) – 1 мкг/мл, антагониста CCR2 (R-a) – 10 нМ. # $p < 0.05$ по сравнению с MCP-1-стимулированной миграцией. Контр. – спонтанная миграция клеток. (б). Мобилизация внутриклеточного Ca^{2+} в клетках линии THP-1, обработанных красителем Fluo-4, под действием пептида (II) (0.1 мкМ) и MCP-1 (10 нМ).

Рис.2. Миграция моноцитов в присутствии пептидов MCP-1-(29-40) (II) и его Ser³⁶-аналога (XI) (0.1 – 1.0 мкМ). Фотография мембраны камеры Бойдена, промигрировавшие клетки зафиксированы метанолом и окрашены гематоксилином.

Рис. 3. Миграция моноцитов периферической крови человека в модифицированной камере Бойдена в присутствии пептида MCP-1-(29-40) (II) – и димедона. Концентрация пептида – 0.2 мкМ, димедона – 5мМ.

Схема синтеза симметричных (V), (VII) и несимметричного (VI) дисульфидов на основе линейных фрагментов хемокина MCP-1.

Таблица 1. Характеристики синтезированных пептидов и их влияние на миграцию лейкоцитов.

Пепт ид	Структура пептида	Обозначение пептида	M _{расчет.}	Выход (%)	ВЭЖХ		MALDI-MS (m/z)	Миграция моноцитов**
					R _t (мин)	Чистота (%)		
(I)	H-Ala-Pro-Val-Thr-Cys-Cys(Acm)-Tyr-Asn-Phe-Thr-Asn-Arg-OH	MCP-1-(7-18)	1459.4	27.4	14.7	95	1459.8	«+»
(II)	H-Arg-Arg-Ile-Thr-Ser-Ser-Lys-Cys-Pro-Lys-Glu-Ala-OH	MCP-1-(29-40)	1375.6	36 ^(a)	10.34	97.7	1376.6	«+»
(III)	H-Thr-Lys-Cys(Acm)-Asn-Ile-Thr-Cys-His-Lys-Met-Thr-Ser-OH	CDF-(6-17)	1437.6	34.8	10.6	98	1437.8	«+»
(IV)	H-Leu-Glu-Thr-Arg-Gln-His-Arg-Leu-Phe-Cys-Ala-Asp-NH ₂	CDF-(41-52)	1487.2	32.2	14.3	96	1487.6	«+»
(V)	H-Arg-Arg-Ile-Thr-Ser-Ser-Lys-Cys-Pro-Lys-Glu-Ala-OH H-Arg-Arg-Ile-Thr-Ser-Ser-Lys-Cys-Pro-Lys-Glu-Ala-OH	MCP-1-(29-40) MCP-1-(29-40)	2749.2	74.8 ⁽⁶⁾	12.02	98.0	2748.7, 1375.8*	«□»
(VI)	H-Ala-Pro-Val-Thr-Cys-Cys(Acm)-Tyr-Asn-Phe-Thr-Asn-Arg-OH H-Arg-Arg-Ile-Thr-Ser-Ser-Lys-Cys-Pro-Lys-Glu-Ala-OH	MCP-1-(7-18) MCP-1-(29-40)	2833.0	46.8 ⁽⁶⁾	13.7	95	2832.4	«□»
(VII)	H-Ala-Pro-Val-Thr-Cys-Cys(Acm)-Tyr-Asn-Phe-Thr-Asn-Arg-OH H-Ala-Pro-Val-Thr-Cys-Cys(Acm)-Tyr-Asn-Phe-Thr-Asn-Arg-OH	MCP-1-(7-18) MCP-1-(7-18)	2916.8	48.7	16.2	95	2916.6	«□»
(VIII)	H-Thr-Lys-Cys(Acm)-Asn-Ile-Thr-Cys-His-Lys-Met-Thr-Ser-OH H-Leu-Glu-Thr-Arg-Gln-His-Arg-Leu-Phe-Cys-Ala-Asp-NH ₂	CDF-(6-17) CDF-(41-52)	2922.8	48.7	12.8	95	2922.7	«□»
(IX)	H-Arg-Arg-Ile-Thr-Ser-Ser-Lys-Cys-Pro-Lys-Glu-Ala--Leu-Glu-	MCP-1-(29-40)-	2869.3	22.0 ^(a)	12.8	90	2868.4, 2890	«+»

	Thr- -Arg-Gln-His-Arg-Leu-Phe- Cys -Ala-Asp-NH ₂	CDF-(41-52)					[M+Na], 2906.4 [M+K],	
(X)	H-Arg-Arg-Ile-Thr-Ser-Ser-Lys-Cys(CH₂CONH₂)-Pro-Lys-Glu-Ala-OH	[Cys ³⁶ (CH ₂ CONH ₂)] MCP-1-(29-40)	1432.7	82 ^(б)	9.76	97.6	1433.2	«□»
(XI)	H-Arg-Arg-Ile-Thr-Ser-Ser-Lys- Ser -Pro-Lys-Glu-Ala-OH	[Ser ³⁶]MCP-1 -(29-40)	1359.6	78 ^(а)	9.22	98.0	1359.8	«□»
(XII)	H-Leu-Glu-Thr-Arg-Gln-His-Arg-Leu-Phe- Ser -Ala-Asp-NH ₂	[Ser ³⁰]CDF-(41-52)	1471.2	71.8	15.3	97	1472.0	«□»

а – Выходы пептидов приведены в расчете на стартовую аминокислоту, присоединенную к полимеру,

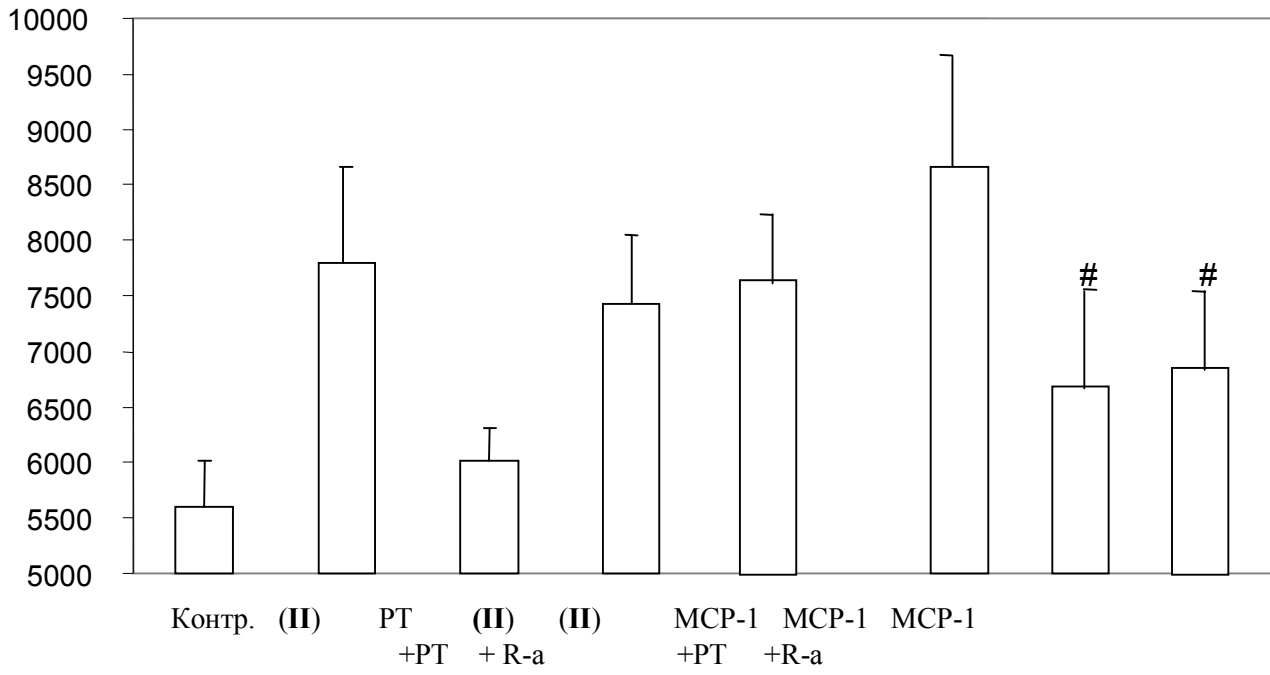
б – в расчете на исходные компоненты реакции.

* □ *m/z* соответствует молекулярной массе дочернего пептида, входящего в состав дисульфида.

** Знаком «+» помечены пептиды, стимулирующие миграцию моноцитов периферической крови человека в модифицированной камере Бойдена; пептиды, помеченные знаком «□», не обладали хемокинетическими свойствами.

(a).

Миграция, отн. ед.



(6).

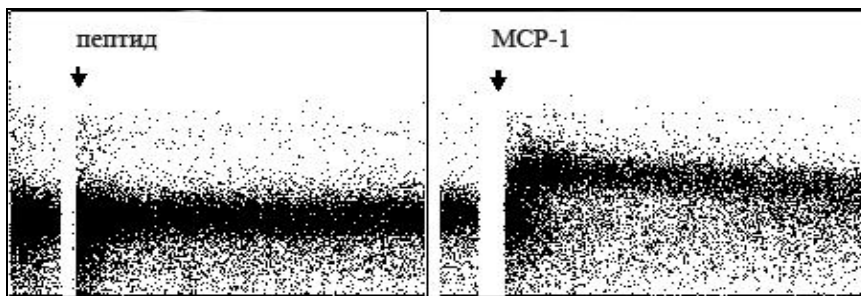


Рис. 1

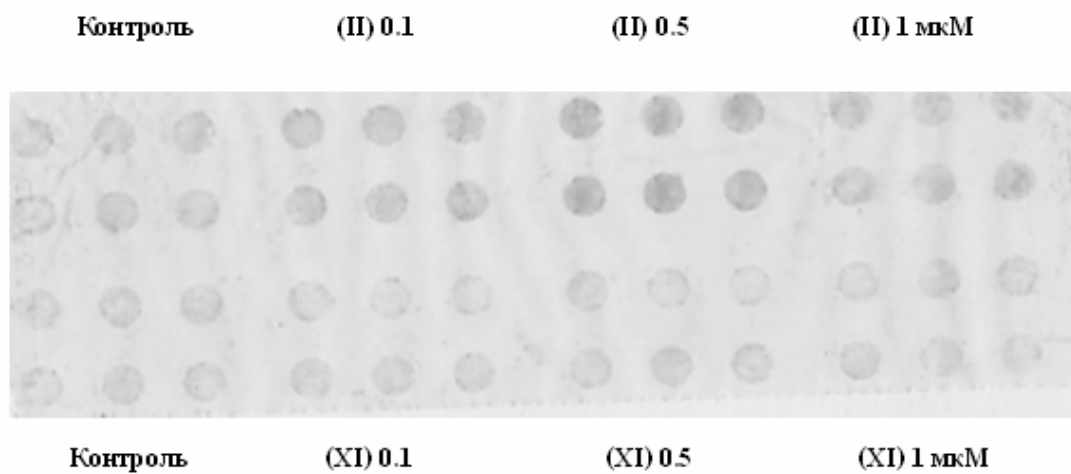


Рис. 2

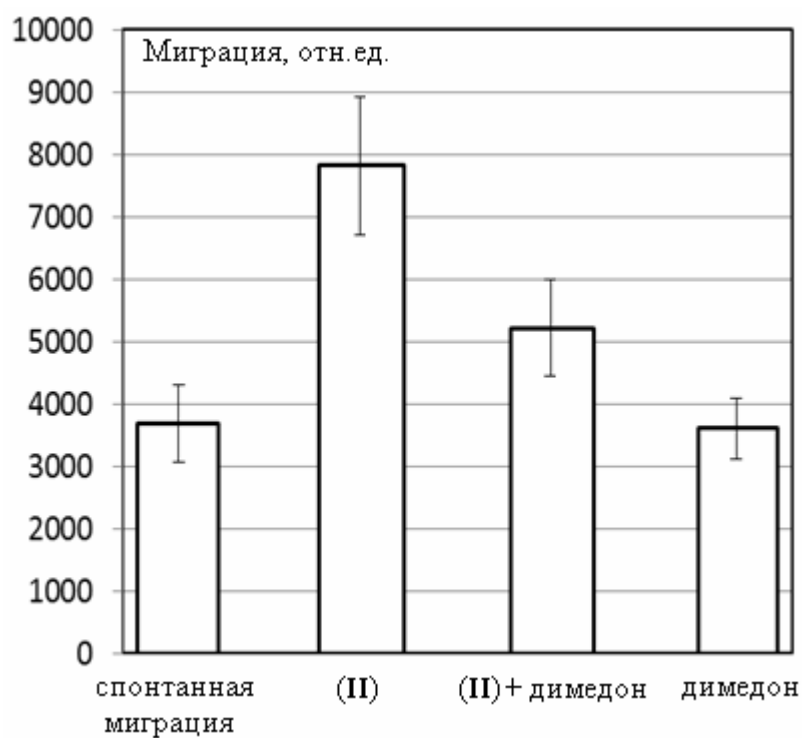
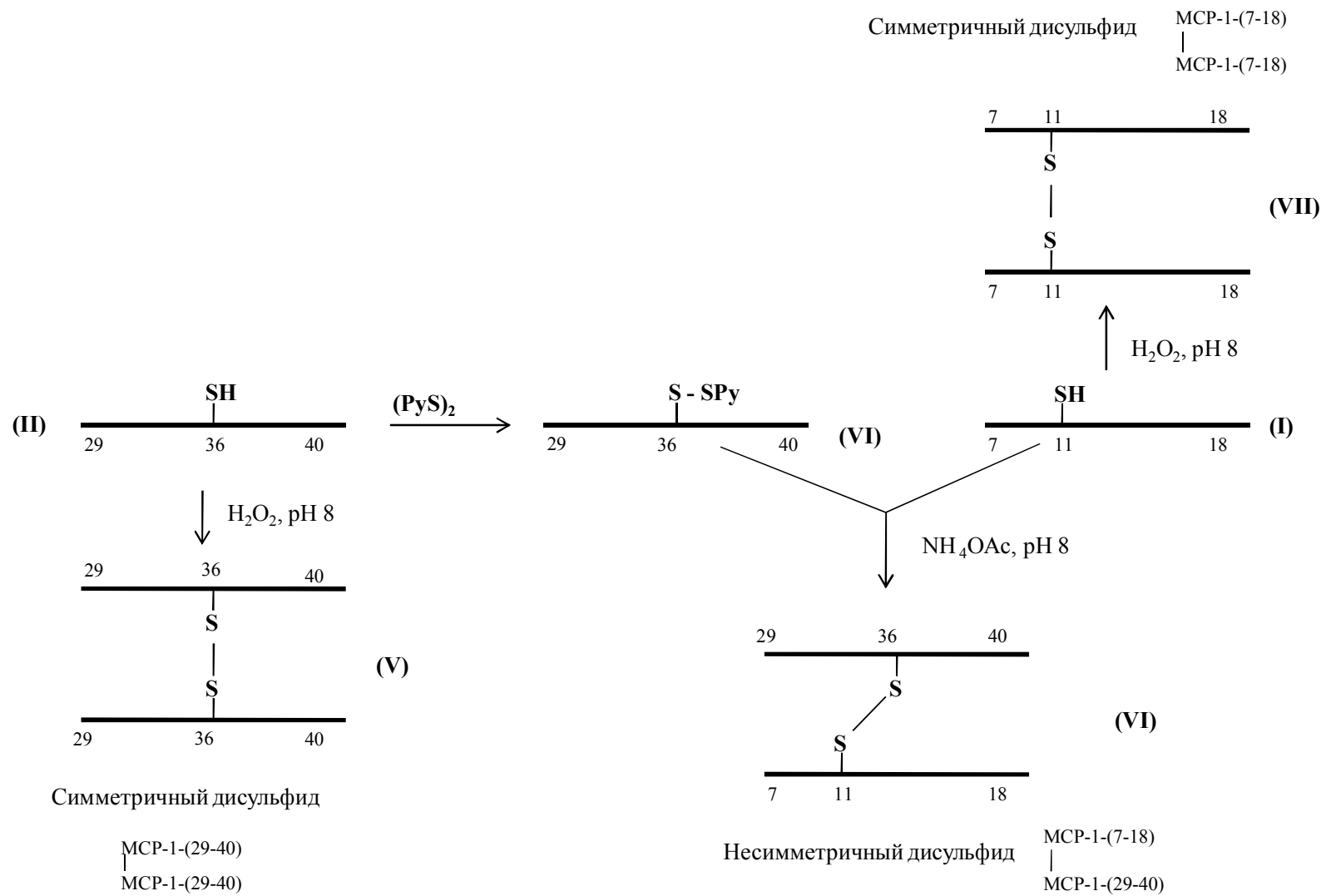


Рис. 3



схема