

Масс-спектрометрическое секвенирование пептидов, выделенных из кожных желез лягушки *Rana arvalis*.

Горшков Владимир Александрович

студент

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

E-mail: homer2k@gmail.com

Железы кожи амфибий служат источником множества биоактивных соединений, необходимых для защиты животных от хищников и целого ряда патогенных бактерий. Пептиды широкого спектра действия: от нейропептидов, антимикробных и антигрибковых до противораковых – составляют основную часть их кожного секрета [1]. Благодаря своим уникальным свойствам, пептиды, выделяемые железами амфибий, рассматриваются как потенциальные лекарственные препараты. Первым шагом в изучении структуры этих соединений является определение последовательности аминокислот. Широко используемое в настоящее время для этих целей масс-спектрометрическое секвенирование в сравнении с методом деградации пептидов по Эдману имеет неоспоримые преимущества вследствие своей экспрессности и высокой чувствительности. Целью настоящей работы явилось изучение не описанного ранее пептидного профиля европейской лягушки *Rana arvalis* для выделения новых пептидов, определения их первичной структуры.

Секрет был получен электростимуляцией спинных желез четырех особей *Rana arvalis*. Выделенные и очищенные с помощью HPLC пептиды были проанализированы масс-спектрометрически с применением MALDI, MALDI-TOF/TOF, LC-FTICR-MS.

Профиль лягушки представлен, в основном, двумя группами пептидов:

1) пептидами из семейства брадикинина и 2) пептидами, содержащими С-концевой цикл, образованный дисульфидной связью боковых цепей цистеина («Rana box»). Основной компонент секрета – брадикинин, нейропептид из первой группы, известный своей ролью в регуляторной функции кожи амфибий [1]. NanoLC-FTICRMS анализ позволил обнаружить в секрете пять новых пептидов этого семейства, не описанных ранее в литературе.

Вторая группа пептидов представлена пятью новыми пептидами с М.м. 1903, 1924, 1810, 1892 и 1874 Д. Дисульфидный цикл первых двух пептидов образован шестью С-терминальными аминокислотами (семейство Ranatuerin 2), трех последних – семью аминокислотными остатками (семейство Ranalexin). Для определения последовательности внутри цикла пептиды с М.м. 1810 и 1874 Д были модифицированы двумя способами: 1) окисление дисульфидной связи надмуравьиной кислотой с образованием сульфоновых кислот и 2) восстановление ее дитиотриэтолом с последующим карбоксиметилированием цистеиновых остатков иодацетамидом. Спектры MALDI-TOF/TOF, а также ESI MS/MS, модифицированных пептидов позволили установить их первичные последовательности (FLPLLASFACTVTKKC и FVPLLVSKLVCVVTKKC соответственно), которые были позже подтверждены методом деградации по Эдману. Первичная структура пептида с М.м.1903 Д также была подтверждена его секвенированием по Эдману.

Пептиды с М.м. 1924 и 1892 Д имеют в своих последовательностях по две замены аминокислот по сравнению с пептидами с М.м. 1903 и 1874 Д соответственно.

Биологическая активность обнаруженных соединений будет являться предметом дальнейших исследований. Установленная первичная структура новых дисульфидсодержащих пептидов по имеющимся в литературе аналогиям позволяет предположить их потенциальную антимикробную активность.

1. Pukala T. L., Bowie J. H., Maselli V. M., Musgrave I. F., Tyler M. J. “Host-defence peptides from the glandular secretions of amphibians: structure and activity” *Nat. Prod. Rep.*, 2006, **23**, 368–393.