

Т. В. Вьюнова¹, К. В. Шевченко¹, Л. А. Андреева¹, В. П. Шевченко¹,
А. С. Радилев², С. А. Дулов², С. Г. Петунов², Н. Ф. Мясоедов¹

ЭНЗИМАТИЧЕСКАЯ УСТОЙЧИВОСТЬ И ВОЗМОЖНЫЕ МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МИШЕНИ СИНТЕТИЧЕСКОГО ПЕПТИДА HFRWPGR

¹ ФГБУН Институт молекулярной генетики Российской академии наук (ИМГ РАН), Россия, 123182, Москва, пл. Курчатова, 2, факс (495) 196-02-21; e-mail: ATRegister@mail.ru

² ФГУП "НИИ гигиены, профпатологии и экологии человека" Федерального медико-биологического агентства, Россия, 188663, Ленинградская область, Всеволожский район, п/о Кузьмоловский, ст. Капитолово, корп. № 93, факс: (812) 449-61-77; e-mail: grech@fmbaemail.ru

В представленном исследовании рассмотрены молекулярные аспекты механизма биологического действия синтетического пептида HFRWPGR, включая оценку устойчивости HFRWPGR к действию мембранных протеолитических ферментов, а также определение некоторых параметров межмолекулярных взаимодействий пептида на плазматических мембранах клеток головного мозга крысы. На основании полученных данных выдвинуто предположение, что молекулы данного пептида, по-видимому, выступают в роли аллостерических модуляторов активности целого ряда рецепторных систем и могут влиять на характер передачи сигнала клеткам. Установлено, что процессы деградации гептапептида HFRWPGR в присутствии плазматических мембран клеток мозжечка и гиппокампа крыс характеризуются значениями, близкими по величине к соответствующим характеристикам процессов протеолиза семакса (взятого в качестве пептида-сравнения) в тех же условиях инкубирования.

Ключевые слова: HFRWPGR; семакс; меченые лиганды; плазматические мембраны; агонисты и антагонисты рецепторов; специфическое связывание; лиганд-рецепторный анализ; каннабиноидные, ваниллоидные, дофаминовые рецепторы.

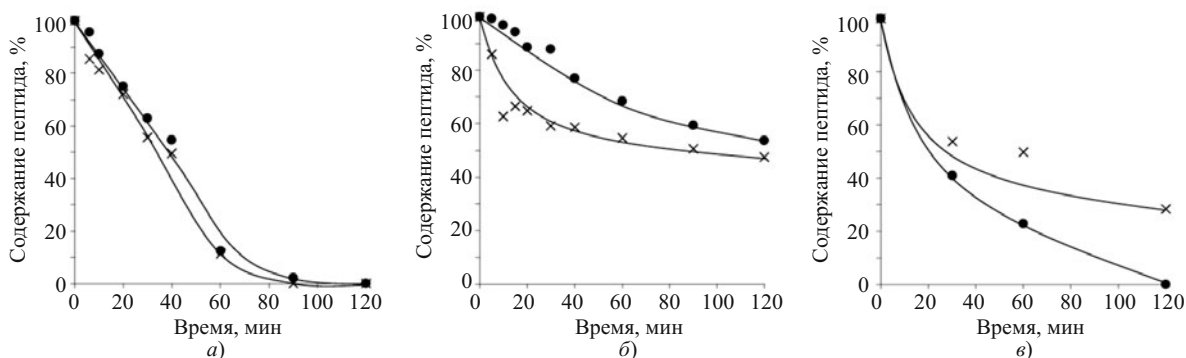
Ранее нами показано, что некоторые синтетические модифицированные аналоги пептидных фрагментов адренокортикотропного гормона (АКТГ), полученные введением в структуру последних С-концевой аминокислотной последовательности Pro-Gly-Pro, характеризуются существованием общих мест специфических взаимодействий на плазматических мембранах клеток [1–3]. На плазматических мембранах клеток гиппокампа крысы нами были охарактеризованы места специфического связывания АКТГ(4-7)-Pro-Gly-Pro, $K_d = (106 \pm 3)$ нМ и АКТГ(6-7)-Pro-Gly-Pro, $K_d = (82 \pm 8)$ нМ [4], показано существование их взаимной конкуренции за некоторые центры специфических взаимодействий. С другой стороны, ранее установлено, что места специфических взаимодействий семакса и его метаболитов (His-Phe-Pro-Gly-Pro и Pro-Gly-Pro) расположены в разных отделах головного мозга крысы [5, 6]. Одним из новых физиологически активных синтетических пептидов семейства АКТГ является гептапептид HFRWPGR, структура которого состоит из последовательности АКТГ(6-9) и Pro-Gly-Pro С-концевого фрагмента. В представленном исследовании рассмотрены молекулярные аспекты механизма биологического действия синтетического пептида HFRWPGR, включая оценку устойчивости данного пептида к действию мембранных протеолитических ферментов, а также определение некоторых параметров межмолекулярных взаимодействий HFRWPGR на плазматических мембранах клеток головного мозга крысы с участием ряда меченных тритием специфиче-

ских лигандов известных биологически значимых нейрорецепторов.

Экспериментальная часть

Синтез меченных тритием соединений. По описанным ранее методикам [7–9] синтезированы и охарактеризованы следующие меченные тритием соединения: неселективные агонисты каннабиноидных CB_1 и CB_2 рецепторов [³H]CP-55,940 и [³H]WIN-55,212-2, агонист ваниллоидных рецепторов дигидрокапсаицин [³H]Capsaicin(2H), агонист (D_2 -подобных) дофаминовых рецепторов второго подтипа 7-OH-[³H]DPAT, неселективный агонист дофаминовых рецепторов дофамин [³H]Dopamine (таблица).

Выделение плазматических мембран клеток головного мозга крысы проводили при 4 °С. Взрослых крыс (самцы) линии Вистар усыпляли диэтиловым эфиром и декапитировали. После извлечения головного мозга его промывали холодным фосфатно-солевым буфером, переносили в буфер А (10 мМ Трис-НCl, рН 7,4 при 4 °С, 0,32 М сахароза, 1 мМ EDTA, 1 мМ бензамидин, 0,1 мМ PMSF), где разделяли на соответствующие отделы (кора, гиппокамп и т.д.). Полученные образцы гомогенизировали в 10 объемах буфера А в гомогенизаторе тефлон-стекло. Гомогенат центрифугировали в течение 20 мин при 1000 g, осадок отбрасывали, а супернатант подвергали повторному центрифугированию при 40000 g в течение 40 мин. Плотный коричневый осадок на дне пробирки, обогащенный митохондриями, отбрасывали, а менее плотный светлый осадок мембран ресуспендировали в буфере А, переносили в



Устойчивость HFRWPGP и семакса (• — семакс, × — HFRWPGP) при инкубации в присутствии: а) плазматических мембран клеток целого мозга крысы; б) плазматических мембран клеток мозжечка крысы; в) плазматических мембран клеток гиппокампа крысы.

чистую пробирку и, осаждая мембраны центрифугированием, аналогичным предыдущему, дополнительно промывали буфером А. По окончании промывок осадок суспендировали в буфере А2 (10 мМ Трис-НСl, рН 7,4 при 4 °С, 0,22 М сахараза), разделяли на порции и замораживали в жидком азоте (хранили не более 30 сут при – 70 °С). Концентрацию белка в образцах раствора мембран определяли по модифицированному методу Хартри — Лоури [10].

Радиолиганд-рецепторный анализ. Инкубирование реакционной смеси осуществляли непосредственно в лунках стандартных 96-луночных планшетов с GF/B фильтрами. Реакционная смесь (конечный объем 200 мкл) содержала: 50 мкл раствора радиоактивно меченного лиганда, 50 мкл буфера (либо раствора немеченого лиганда в инкубационном буфере, либо раствора исследуемого соединения в инкубационном буфере, в зависимости от задачи конкретного эксперимента), реакцию начинали добавлением 100 мкл раствора мембранного белка (конечной концентрации в инкубационной смеси 0,2 мг/мл), разведенного в буфере Б (50 мМ Трис-НСl, 1 мМ СаCl₂, 0,003 % BSA (бычьего сывороточного альбумина), рН 7,4 при 30 °С) с добавлением комбинации ингибиторов протеолитических ферментов (100 мкМ PMSF (фенилметилсульфонил фторид) + 10 мкМ Bacitracine + 5 мкМ Pepstatine А). Планшеты выдерживали при температуре 30 °С при постоянном перемешивании в течение 20 мин. По окончании инкубации пробы фильтровали непосредственно через планшетные фильтры, трижды промывая холодным (4 °С) буфером Б по 200 мкл на лунку. Планшет сушили на воздухе, затем фильтры от-

деляли и переносили в сцинтилляционные флаконы, содержащие 5 мл сцинтилляционной смеси Ecolite+ фирмы MP Biomedicals. Для определения количественных параметров радиоактивности использовали счетчик LKB 1215 Rackbeta с эффективностью регистрации трития около 35 % на вышеуказанном сцинтиляторе. Математическую обработку результатов осуществляли при помощи программного пакета SigmaStat 10.

Дегградация пептидов под действием мембранных протеолитических ферментов. К раствору 0,18 мкмоль пептида в 260 мкл фосфатно-солевого буфера (27,4 мМ NaCl, 0,4 мМ KCl, 2 мМ Na₃PO₄ в 100 мл H₂O, рН 7,4) прибавляли 120 мкл раствора плазматических мембран клеток головного мозга крыс (8,6 мг белка/мл) или соответствующее количество раствора, приготовленного из мембран клеток интересующего отдела головного мозга крыс. Инкубационную смесь перемешивали и термостатировали при 30 °С, отбирая аликвоты по 40 мкл через определенные промежутки времени. Полученные пробы очищали твердофазной экстракцией на обращенной фазе, суть которой заключалась в нанесении пептидной фракции на патрон, упакованный обращенной фазой Lichroprep RP-18, с последующим элюированием пептидов смесью метанол — вода (4:1) с 0,1 % трифторуксусной кислотой. Затем смесь упаривали и растворяли в 200 мкл смеси метанол — вода (10:90). Дальнейший анализ смеси проводили методом ВЭЖХ.

Результаты и их обсуждение

Оценку устойчивости HFRWPGP к действию мембранных протеолитических ферментов проводили, используя в качестве вещества-сравнения гептапептид семакс (синтезирован в инновационном научно-производственном центре “Пептоген”) (МЕНFPGP), поскольку процессы дегградации этого синтетического пептида в аналогичных условиях уже были достаточно подробно исследованы нами ранее. При инкубировании HFRWPGP в присутствии плазматических мембран клеток головного мозга крысы скорость дегградации HFRWPGP (рисунок, а) практически совпадает со значением скорости дегградации контрольного пептида

Удельная радиоактивность лигандов, используемых в работе

Лиганд	Удельная радиоактивность, Ки/ммоль	Химическая чистота, %
[³ H]CP55,940	70	97
[³ H]WIN-55,212-2	55	97
[³ H]Capsaicin(2H)	70	98
[³ H]7-OH-DPAT	120	97
[³ H]Dopamine	100	98

(семакса). В присутствии плазматических мембран клеток мозжечка (рисунок, б) и гиппокампа (рисунок, в) крысы, несмотря на незначительные отличия, значения скоростей протеолиза обоих пептидов составляют величины одного порядка. Это позволило нам проводить исследования межмолекулярных взаимодействий гептапептида HFRWPGR на плазматических мембранах клеток-мишеней головного мозга крысы с применением методик, отработанных ранее при исследовании семакса [1, 3, 4].

Поскольку HFRWPGR является близким структурным аналогом некоторых функционально значимых фрагментов АКТГ, обладающих собственными местами специфических взаимодействий на плазматических мембранах клеток головного мозга, то можно ожидать, что и исследуемый пептид будет специфически взаимодействовать с плазматическими мембранами клеток похожим образом. Нами выбрана группа нескольких функционально значимых нейрорецепторов — потенциальных мишеней действия гептапептида. Синтезированы меченные тритием лиганды различных подтипов дофаминовых, каннабиноидных, ванилоидных рецепторов (таблица). На плазматических мембранах гиппокампа крысы охарактеризованы параметры специфического связывания меченых лигандов (в условиях, применяемых при исследовании пептидов): [³H]CP 55940 ($K_d = (1,1 \pm 0,1)$ нМ, $B_{max} = (906 \pm 34)$ пмоль/мг белка мембран), 7-ОН-[³H]DPAT ($K_d = (9,3 \pm 0,8)$ нМ, $B_{max} = (197 \pm 13)$ пмоль/мг белка мембран), [³H]Dopamine ($K_d = (7 \pm 0,1)$ нМ, $B_{max} = (37 \pm 1)$ пмоль/мг белка мембран), обнаружено 2 сайта связывания [³H]Capsaicin(2H) ($K_{d1} = (7,5 \pm 0,4)$ нМ, $B_{max} = (300 \pm 6)$ пмоль/мг белка мембран, $K_{d2} = (54 \pm 6)$ нМ, $B_{max} = (718 \pm 14)$ пмоль/мг белка мембран).

Для изучения возможного сродства HFRWPGR к различным типам дофаминовых рецепторов использовали неселективный агонист этих рецепторов — дофамин ([³H]Dopamine), а также агонист “D₂-подобных” дофаминовых рецепторов второго подтипа (7-ОН-[³H]DPAT). Установлено, что в присутствии HFRWPGR (10 мкМ) в инкубационной смеси более чем наполовину уменьшается число мест специфических взаимодействий 7-ОН-[³H]DPAT (до 45 % от исходного) и практически полностью блокируется связывание [³H]Dopamine (до 20 % от исходного). Это может быть обусловлено как прямой конкуренцией за места связывания агонистов, так и возможными конформационными изменениями в структуре соответствующего рецептора, возникающими при связывании пептида на сайтах аллостерической модуляции, что приводит к снижению его аффинности к селективному лиганду.

Диаметрально противоположный эффект (увеличение на 10 – 15 %) оказывает присутствие HFRWPGR (10 мкМ) на число мест специфического связывания агониста каннабиноидных рецепторов [³H]CP55,940 на плазматических мембранах гиппокампа крысы. При этом пептид, по-видимому, не конкурирует напря-

мую с [³H]CP55,940, а действует в качестве молекулы-модулятора.

Влияние исследуемого пептида на специфическое связывание агониста ванилоидных рецепторов [³H]Capsaicin(2H) оценивали, опираясь на полученные ранее данные о существовании на плазматических мембранах клеток мозга 2 сайтов специфических взаимодействий меченого лиганда. Установлено, что HFRWPGR в концентрации 10 – 100 мкМ способен незначительно (на 5 – 20 %) блокировать связывание [³H]Capsaicin(2H) на высокоаффинном сайте ($K_{d1} = (7,5 \pm 0,4)$ нМ). При этом величина связывания [³H]Capsaicin(2H) на низкоаффинном сайте ($K_{d2} = (54 \pm 6)$ нМ) в присутствии исследуемого пептида (в концентрации 100 мкМ) составляет лишь половину (до 52 %) от специфического. Необходимо заметить, что при тех же условиях проведения экспериментов аналогичная величина (% от специфического связывания [³H]Capsaicin(2H)) в присутствии синтетического агониста каннабиноидных рецепторов CP 55940 составляла на обоих сайтах величины порядка 85 %.

Молекулы HFRWPGR, по-видимому, выступают в роли аллостерических модуляторов активности представленных выше и, возможно, иных рецепторов. При этом необходимо учитывать, что с течением времени степень воздействия пептида на специфическое связывание собственных эндогенных эффекторных молекул организма может незначительно колебаться вследствие существующих процессов биодegradации и образования группы коротких биологически активных фрагментов исходного пептида.

Данная работа проводилась при частичной поддержке программы фундаментальных исследований Президиума РАН “Молекулярная и клеточная биология” № госрегистрации 01201353020, гранта Научные школы № 14.120.14.4222-НШ под руководством академика Н. Ф. Мясоедова.

ЛИТЕРАТУРА

1. T. V. Vyunova, K. V. Shevchenko, V. P. Shevchenko, et al., *Neurochem. J.*, **1**(1), 37 – 42 (2007).
2. Т. В. Вьюнова, Л. А. Андреева, К. В. Шевченко и др., *ДАН*, **419**(1), 136 – 137 (2008).
3. Т. В. Вьюнова, К. В. Шевченко, В. П. Шевченко и др., *Нейрохимия*, **23**(1), 57 – 62 (2006).
4. Т. В. Вьюнова, К. В. Шевченко, В. П. Шевченко и др., *Тезисы V Международного междисциплинарного конгресса “Нейронаука для медицины и психологии”*, 3 – 13 июня, Судак, Крым, Украина (2009), с. 71.
5. Т. В. Вьюнова, К. В. Шевченко, В. П. Шевченко и др., *ДАН*, **410**(1), 134 – 135 (2006).
6. Т. В. Вьюнова, К. В. Шевченко, В. П. Шевченко и др., *Радиохимия*, **51**(2), 161 – 166 (2009).
7. В. П. Шевченко, В. В. Безуглов, М. Ю. Бобров и др., *Радиохимия*, **52**(3), 281 – 284 (2010).
8. V. P. Shevchenko, I. Yu. Nagaev, N. F. Myasoedov, *J. Label. Compounds Radiopharm.*, **53**(11 – 12), 693 – 703 (2010).
9. В. П. Шевченко, И. Ю. Нагаев, К. В. Шевченко и др., *Радиохимия*, **53**(3), 285 – 288 (2011).
10. O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr, R. J. Randall, *J. Biol. Chem.*, **193**(1), 265 – 275 (1951).

Поступила 03.06.15

ENZYMATIC STABILITY AND POSSIBLE MOLECULAR TARGETS OF SYNTHETIC HFRWPGP PEPTIDE

T. V. V'yunova^{1*}, K. V. Shevchenko¹, L. A. Andreeva¹, V. P. Shevchenko¹, A. S. Radilov^{2**}, S. A. Dulov², S. G. Petunov², and N. F. Myasoedov¹

¹ Institute of Molecular Genetics, Russian Academy of Sciences, 123182 Moscow

² Research Institute of Hygiene, Occupational Pathology and Human Ecology, Federal Medico-Biological Agency, Kapitolovo, Vsevolozhsk district, Leningrad oblast, 188663 Russia

e-mail: * ATRegister@mail.ru; ** gpech@fmbamail.ru

We have examined molecular aspects of the mechanism of biological action of synthetic HFRWPGP peptide, including estimation of the stability of HFRWPGP with respect to the action of membrane proteolytic enzymes as well as determination of some parameters of the intermolecular interactions of peptide with cell (plasma) membrane of rat brain cells. Based on the obtained data, it is suggested that the peptide molecules probably act as allosteric activity modulators for a number of receptor systems, and can affect the character of signal transfer to cells. It is established that the process of HFRWPGP heptapeptide degradation in the presence of plasma membranes of the cells of the cerebellum and hippocampus of rats is characterized by values that are close to the corresponding characteristics of proteolysis of semax (reference heptapeptide taken for comparison) under the same incubation conditions. Taken together, these data allow us to characterize peculiarities and formulate general laws of the molecular mechanism of action of regulatory peptides.

Keywords: HFRWPGP peptide; semax; labeled ligands; plasmatic membranes; receptor agonists; receptor antagonists; specific binding; ligand-receptor analysis; cannabinoid receptors; vanilloid receptors; dopamine receptors.