

УДК 577.15.07.157

ОТКРЫТИЕ ПЕПТИДИЛ-ЦИС-ТРАНС-ИЗОМЕРАЗЫ В ГИПОТАЛАМУСЕ

(Новые его функции)

ГАЛОЯН А. А., ГУРВИЦ Б. Я.

Институт биохимии АН Армении

Ранее мы сообщили о выделении кальций-кальмодулинзамещающих пептидных системах гипоталамуса (ККЗПС). Они являются регуляторами активности кальмодулинзависимых ферментов (ФДЭ, сАМР, киназы легких цепей миозина и др.) без участия ионов кальция и кальмодулина [1]. К числу этих пептидов относится выделенный и идентифицированный нами тимозин β_4 (1—39). Его фрагменты 11—19, 25—31, 16—38, а также тимозин α_1 , пептид RF (С-модулин 1) [2—4] и полипептид EKAQGHPRQDENPY (фрагмент основного белка миеллина) [5].

Первоначально при выделении С-модулинов из гипоталамического вторичного порошка (ГВП—3—4) системой ВЭЖХ на обращенных фазах (C_{18} , C_8) в градиенте ацетонитрила нами было установлено наличие 3-х зон. Из первой зоны были выделены С-модулины 1 и 3, а из II—С-модулин-3 или тимозин β_4 (1—39) [6].

Одна из биологически активных фракций, относящаяся к системе С-модулинов, выделенная нами из одной из трех основных зон активаторов ФДЭ [6], а именно, из зоны III, была нами подвергнута очистке до гомогенного состояния с помощью обратнотазовой ВЭЖХ на колонке С-8 (Brownlee, аппарат RP-300, $4,6 \times 220$ мм). Элюцию С-модулинов осуществляли с помощью линейного градиента (20—50%) ацетонитрила, содержащего 0,08% трифторуксусной кислоты (ТФУ), против 0,1% ТФУ, со скоростью 0,5 мл/мин в течение 45 мин.

Вещество, выделенное при 42% ацетонитрила, подвергали секвенированию на секвенаторе фирмы «Кнаер», ФРГ. Оказалось, что первичная структура выделенного пептида представляет собой N-концевой фрагмент, совпадающий по аминокислотной последовательности со структурой пептидил-пролил-цис-транс-изомеразы (ЦТИ) быка и человека: $NH_2Gly-Val-Gln-Val-Glu-Thr-Ile-Ser-Pro-Gly-Asp-Gly-Arg-Thr-Phe-Pro-Lys-Arg-Gly-Gln-Thr-Cys-Val-Val-His-Tyr-Thr-Gly-NH_2$ - Leu.

ЦТИ относится к новому классу ферментов, отличающихся по

молекулярной массе, внутриклеточной локализации и субстратной специфичности. Впервые этот фермент был открыт в 1984 г. [7]. Он обнаружен практически во всех тканях и организмах, от млекопитающих до бактерий. Было показано, что ЦТИ катализирует цис-транс-изомеризацию пролина в коротких олигопептидах. Под действием этого фермента осуществляется поворот на 180° вокруг C-N-пептидной связи в месте присоединения пролина. В этом процессе не происходит ни разрыва пептидной связи, ни образования ковалентных связей. ЦТИ приписывают важнейшую роль в формировании оптимальной конформации белков, в частности, в ускорении определенной укладки вновь синтезированных пептидных цепей в клетке [8], которая предохраняет белок от протеолитического расщепления или нежелательной агрегации с другими компонентами клетки. Субстратами этого фермента, наряду с короткими пептидами, содержащими пролин, являются также некоторые белки, относительно которых было показано, что изомеризация пролина играет в них важную функциональную роль [9, 10]. В частности, это относится к рибонуклеазе, хмотрипсину и др.

Обнаружение того факта, что активность ЦТИ присуща циклофиллину [11, 12], явилось неожиданностью.

Циклофиллин впервые был выделен в 1984 г. как цитозольный белковый рецептор ($M_r \sim 18000$ Д) циклоспорина А — лекарственного соединения, широко используемого в медицинской практике для подавления отторжения трансплантата при различных операциях по пересадке органов и тканей [13]. Недавно было обнаружено, что соединение FK 506 обладает механизмом действия, подобным циклоспорино А, однако оно оказалось в 10—100 раз более эффективным иммуносупрессором по сравнению с циклоспорином А [14].

В опытах *in vitro* было показано, что циклоспорин А и FK 506 избирательно тормозят рост и дифференцировку Т-лимфоцитов на уровне транскрипции [15]. Несмотря на то, что соединения имеют различную структуру, они проявляют одинаковые механизмы действия, и их рецепторные белки обладают активностью ЦТИ. Это позволяет предположить, что в процессе торможения под действием данных иммуносупрессоров пролиферации Т-клетки участвует ЦТИ.

Следует, однако, отметить, что в настоящее время почти ничего не известно о ферментативных механизмах работы ЦТИ. Кроме того, несмотря на «настоящую революцию», которую совершили указанные иммуносупрессоры, а также некоторые другие подобные им лекарственные соединения в области трансплантации органов, биохимические механизмы их влияния на иммунную систему не ясны.

Тот факт, что иммунофиллины, в том числе и циклофиллин, обладающие активностью ЦТИ, являются связывающими белками для иммуносупрессоров различной структуры (циклоспорин А, FK-506, рапамицина), позволяет предположить наличие множества лигандов, способных вступать с ними во взаимодействие. В то же время, наличие ЦТИ во многих различных организмах свидетельствует о том,

что этот «вездесущий» фермент обладает важнейшими регуляторными функциями в клетке. Это подтверждается, например, тем, что упомянутый выше лиганд этого фермента—циклоспорин А, наряду с иммуносупрессорными свойствами, имеет большую терапевтическую ценность при лечении аутоиммунных нарушений, диабета, энцефаломиелиита и других болезней. Исследования биохимических функций этого соединения показали, что оно связывается с кальмодулином и ингибирует кальмодулин-активированную ФДЭ концентрационно-зависимым образом. Было высказано предположение о том, что в результате подобного связывания блокируется активация кальмодулин-зависимых ферментов, участвующих в различных процессах, в том числе и в процессе пролиферации Т-лимфоцитов и формирования иммунного ответа. Чувствительным к действию циклоспорина А является и Ca^{2+} -ионофор А 23187.

Не исключено, что ЦТИ также является кальмодулин-зависимым ферментом. Ca^{2+} -независимая активация кальмодулин-зависимых ферментов [3—6] под действием С-модулинов свидетельствует о существовании универсальной регуляторной системы, в которой участвуют ЦТИ и различные лиганды этого фермента.

Кроме того, кальмодулин-зависимые ферменты могут служить очень удобной моделью для изучения этой регуляторной системы, одной из функций которой является создание определенной конформации белков и пептидов в клетке *in vivo*, а также ускорение возврата к нативной конформации белков и пептидов, претерпевших нарушение структуры в системе *in vitro*.

Предстоит выяснить уникальную роль этого белка-фермента в процессинге пептидных нейропептидов и в сложных механизмах метаболизма и функции нервных клеток.

THE DISCOVERY OF PEPTIDYL-CYS-TRANS-ISOMERASE IN HYPOTHALAMUS (its new functions)

GALOYAN A. A., GURVITS B. Ya.

Institute of Biochemistry Acad. Sci. of Armenia

From the bovine hypothalamus a polypeptide with C-modulin properties has been individually isolated on HPLC reverse phase (C_{18} , C_8) in acetonitrile gradient. By Edman degradation its primary structure has been determined which coincides with the structure of 1—30 peptidyl-prolyl-cys-trans isomerase of bovine and human (immunodepressant receptors FK—506).

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Галоян А. А., Гурвиц Б. Я. Нейрохимия, т. 5, с. 420—422, 1986.
2. Галоян А. А. Доклады АН Армении, т. 92, с. 172—176, 1991.
3. Ga'ouan A. A., Gurvits B. Y., Shumilova L. A., Davis M. T., Shively J. E., Lee T. D. Neurochem. Res., v. 17, p. 773—777, 1992.
4. Ga'ouan A. A. Abstract for 23-d Annual Meeting of ASN p. 170, 1992.
5. Гурвиц Б. Я., Алексанян С. С., Галоян А. А. Нейрохимия (в печати).
6. Галоян А. А., Бобрускин И. Д., Гурвиц Б. Я., Абрамян Г. Э. Нейрохимия, т. 8, № 1 с. 78—86 1989.
7. Fischer G., Bang H., Mech C. Biomed. biochem. acta, v. 43, p. 1101—1111, 1984.
8. Fischer G., Schmid F. X. Biochem., v. 21, p. 2205—2212, 1990.
9. Lang K., Schmid F., Fischer G. Nature, v. 329, p. 268—270, 1937.
10. Lin L. N., Hasum H., Brandts J. P. Biochim. et biophys. acta, v. 955, p. 256—265, 1988.
11. Takahashi N., Hayane T., Suzuki M. Nature, v. 337, p. 473—475, 1989.
12. Fischer G., Wittmann-Liebold B., Lang K., Kieffhaber T., Schmid F. X. Nature v. 337, p. 265—270, 1989.

Поступила 10. XII. 1991

The Biology of Nicotine dependence. Ciba Foundation Symposium 152. J. Wiley and Sons, Baffins Lane, Chichester, 280 p., 1990.

Биология никотиновой зависимости

Никотин является сильным препаратом, действующим на центральную нервную систему и оказывающим выраженные физиологические и психологические эффекты. Он считается основным фактором, вырабатывающим поведение курильщика табака и несет ответственность за поведенческие и физиологические реакции на вдыхаемый табачный дым. Предлагаемый сборник, охватывающий материалы 152-го симпозиума «Ciba Foundation», посвящен успехам в области идентификации никотиновых ацетилхолиновых рецепторов в мозгу. Приемы молекулярной биологии, как указывается в книге, использовались для характеристики этих рецепторов и изучения их взаимодействия с никотином. Кроме того, в свете современных представлений о биологии никотина в мозгу, рассматривается роль никотина в формировании поведения курильщика. Книга предназначена для специалистов в области как прикладных, так и фундаментальных нейронаук.