

ИССЛЕДОВАНИЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ НАТИВНЫХ И СИНТЕТИЧЕСКИХ КОРОНАРОСУЖИВАЮЩИХ ПЕПТИДНЫХ ФАКТОРОВ НА АКТИВНОСТЬ КАЛЬЦИНЕИРИНА

БАРСЕГЯН К. С., БАРХУДАРЯН Н. А., ГАЛОЯН А. А.

Институт биохимии им. Г. Х. Бунятыана НАН Армении, Ереван

Исследовано воздействие нативных (ПФ₁₋₅) и синтетических (СП₁₋₄) коронаросуживающих пептидных факторов на активность Са²⁺-кальмодулинзависимой фосфопротеинфосфатазы (кальцинеирин). Активность фермента определяли с помощью чувствительного флуорометрического метода, используя в качестве субстрата 4-метилумбеллиферилфосфат (4-МУФ). Обнаружено, что как нативные, так и синтетические пептиды являются ингибиторами кальцинеирин с K_i для нативных пептидов от 1.9.10⁻⁹ М до 2.8.10⁻⁹ М и с K_i от 2.5.10⁻⁹ М до 3.1.10⁻⁹ М для синтетических пептидов. Показано, что при исследовании кооперативного воздействия коронаросуживающих пептидов и трифторперазина на активность кальцинеирин происходит уменьшение ингибиторного эффекта как ПФ₁₋₅ и СП₁₋₄, так и трифторперазина на активность фермента. Высказывается предположение о возможном участии ПФ₁₋₅ в регуляции активности кальцинеирин и в условиях *in vivo*.

Фосфорилирование и дефосфорилирование белков, вызывая конформационные изменения в их молекуле и, тем самым, модифицируя их биологические свойства, являются одним из основных механизмов, регулирующих многие важнейшие процессы, протекающие в клетке: сокращение мышц, мембранный транспорт, секрецию и др. [1]. Следует отметить, что эти процессы являются сопряженными: степень фосфорилированности белков определяется соотношением соответствующих протеникиназ и протенифосфатаз [2]. Поэтому, обнаружив, что коронаросуживающие пептидные факторы (ПФ₁₋₅), выделенные из гипоталамуса крупного рогатого скота [3], вызывают Са²⁺-независимое активирование киназы легких цепей миозина (КЛЦМ) [4—6] путем Са²⁺-независимого связывания с кальмодулином [7, 8], мы сочли необходимым изучить воздействие ПФ₁₋₅ также и на активность Са²⁺-кальмодулинзависимой фосфопротеинфосфатазы (ФПаза)-кальцинеирин.

Кальцинеирин или ФПаза 2В (составляет 1% от общего белка мозга) связывает 1 моль кальмодулина на моль фермента, проявляя весьма высокое сродство (K_d=0,1 нМ). Кальмодулины активируют фермент в 5—10 раз [1, 9]. Кальцинеирин состоит из двух субъединиц

лизи (СЕ) А и В. СЕ А с M_r 61 кД содержит каталитический и кальмодулинсвязывающий участки [10, 11]. СЕ В с M_r 19 кД представляет собой Ca^{2+} -связывающий компонент [12, 13] и имеет высокую степень гомологии с кальмодулином (35%) [14]. В аминокислотной последовательности СЕ В выявлено наличие 4-х Ca^{2+} -связывающих участков в виде «EF hand» доменов—генетически детерминированных участков, характерных для семейства Ca^{2+} -связывающих белков [15, 16].

Факт наличия в аминокислотной последовательности СЕ В гомологии с кальмодулином представлял особый интерес, так как не исключал возможности воздействия PF_{1-5} , обладающих высоким сродством к кальмодулину ($K_d=2-10$ нМ), на активность кальцинейрина как через связывание с кальмодулином, так и путем прямого воздействия на фермент через связывание с СЕ В.

В 1990 г. нами была установлена первичная структура 3-х из PF_{1-5} , которые оказались фрагментами 33—37, 33—38 и 32—38 β -цепи гемоглобина [6, 17]. Было высказано предположение, что и остальные 2 пептида с невыявленной первичной структурой являются фрагментами β -цепи гемоглобина, отличающиеся от структуры вышеуказанных пептидов лишь длиной пептидной цепи. Методом твердофазного синтеза были получены синтетические пептиды СП_1 (LVVYPWTQF) и СП_2 (LVVYPWTQ), представляющие фрагменты 32—41 и 32—39 β -цепи гемоглобина и изучено их влияние, а также воздействие 2-х других синтетических пептидов— СП_3 (LVVYPWT) и СП_4 (VVVYPWT), соответствующих по структуре PF_3 и PF_2 соответственно, на тест-системы, специфичные для PF_{1-5} . Полученные результаты указывали на некоторую идентичность свойств нативных и синтетических пептидов [17].

В данной работе сообщается об изучении влияния нативных (PF_{1-5}) и синтетических (СП_{1-4}) коронаросуживающих пептидных факторов на активность кальцинейрина. Учитывая тот факт, что PF_{1-5} изменяли чувствительность кальмодулина к трифторперазину (ТФП)—известному антагонисту кальмодулина [7, 8], представлялось интересным изучить также кооперативный эффект коронаросуживающих пептидов и ТФП на активность кальцинейрина.

Материалы и методы

PF_{1-5} выделяли по методу Галояна и соавт. [3] из гипоталамуса быка.

Высокоочищенные препараты кальцинейрина получали из мозга крупного рогатого скота по методам Sharma и соавт. [18] и Tallant и соавт. [19] с некоторыми модификациями. Чистоту полученных препаратов проверяли электрофорезом в 7,5—15%-ном ПААГ в присутствии 0,1%-ного ДДС-На и 1 мМ ЭГТА по методу Laemmli [20].

Активность кальцинейрина определяли, используя чувствительный флуорометрический метод Anthony и соавт. [21]. В качестве субст-

рата был использован 4-метилумбеллиферилфосфат (4-МУФ), синтезированный в нашей лаборатории Я. Возным. Измерение активности фермента проводили в пробе, объемом 1 мл, содержащей 50 нМ трис-НСI буфер, рН 7,5, БСА (1 мг/мл), 0,5 мМ ДТТ, 1 мМ $MgCl_2$, 0,3 мМ $CaCl_2$, 360 нМ кальмодулина, 1 мкМ 4-МУФ и необходимое количество фермента (12,5—25 нМ). Пробы инкубировали 1 ч при 32°. Ферментативную реакцию останавливали добавлением 30%-ной ТХУ. После центрифугирования при 5000 г рН проб доводили до 8,0 добавлением 0,5 мл 1 М трис. Количество образовавшегося 4-метил-

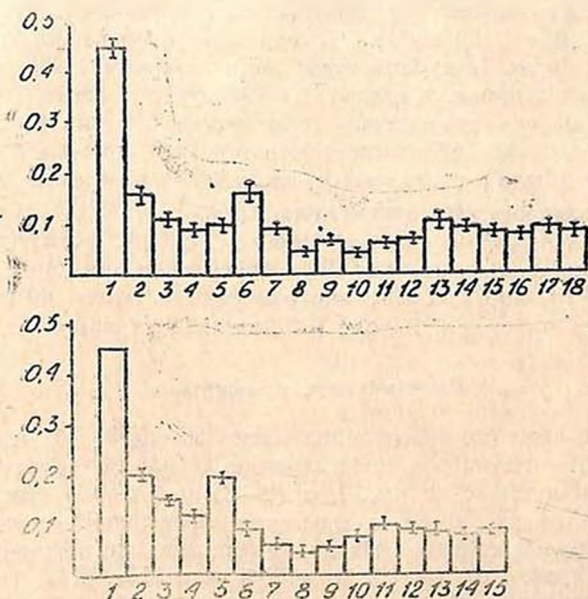


Рис. 1. а. Влияние коронаросуживающих пептидных факторов (PF_{1-5}), выделенных из гипоталамуса крупного рогатого скота на активность кальцинейрина. Пептиды использовали в концентрации 10 нМ. 1—контроль 1 (K_1), содержащий 0,3 мМ $CaCl_2$, 360 нМ кальмодулина (КМ), 12,5 нМ кальцинейрина; 2— $K_1 + PF_1$; 3— $K_1 + PF_2$; 4— $K_1 + PF_3$; 5— $K_1 + PF_4$; 6— $K_1 + PF_5$; 7—контроль 2 (K_2), содержащий 1 мМ ЭГТА + 360 нМ КМ + 12,5 нМ кальцинейрина; 8— $K_2 + PF_1$; 9— $K_2 + PF_2$; 10— $K_2 + PF_3$; 11— $K_2 + PF_4$; 12— $K_2 + PF_5$; 13—контроль 3 (K_3), содержащий 1 мМ ЭГТА + 12,5 нМ кальцинейрина; 14— $K_3 + PF_1$; 15— $K_3 + PF_2$; 16— $K_3 + PF_3$; 17— $K_3 + PF_4$; 18— $K_3 + PF_5$.

б. Влияние синтетических пептидов (SP_{1-4}) на активность кальцинейрина. Пептиды использовали в концентрации 10 нМ. 1—контроль 1 (K_1), содержащий 0,3 мМ $CaCl_2$, 360 нМ КМ, 12,5 нМ кальцинейрина; 2— $K_1 + SP_1$; 3— $K_1 + SP_2$; 4— $K_1 + SP_3$; 5— $K_1 + SP_4$; 6—контроль 2 (K_2), содержащий 1 мМ ЭГТА + 360 нМ КМ + 12,5 нМ кальцинейрина; 7— $K_2 + SP_1$; 8— $K_2 + SP_2$; 9— $K_2 + SP_3$; 10— $K_2 + SP_4$; 11—контроль 3 (K_3), содержащий 1 мМ ЭГТА + 12,5 нМ кальцинейрина; 12— $K_3 + SP_1$; 13— $K_3 + SP_2$; 14— $K_3 + SP_3$; 15— $K_3 + SP_4$.

умбеллиферона (4-МУ) определяли флуорометрически на спектрофлуорометре фирмы «Perkin-Elmer MPF-44A» (США). Флуоресценцию измеряли при 445 нм (возбуждение при 365 нм). В качестве контроля служили субстрат и фермент, инкубированные отдельно. За единицу активности фермента принимали такое его количество, которое вызывало в течение 1 ч при 32° образование 4-МУ, соответствующее по флуоресценции 0,1 нМ 4-МУ.

Количество белка определяли по методу Lowry и соавт. [22].

Величины K_i для кальцийейрина относительно ПФ₁₋₅ и СП₁₋₄ были определены по методу Диксона. Использовали две концентрации 4-МУФ (0,7 и 1,4 мкМ) и следующие концентрации пептидов: 1; 2,5; 5; 10; 15 нг. Инкубационная смесь объемом 1 мл содержала 12,5 нМ кальцийейрина. Фермент и исследуемый пептид инкубировали 10 мин при комнатной температуре в присутствии Ca^{2+} и кальмодулина, затем добавляли субстрат и инкубировали 1 ч при 32°.

В работе были использованы следующие реактивы: CNBr-активированная сефароза 4В, кальмодулин («Sigma», США), TSK ДЭАЭ Тоуорепат 650 М («Toyo Soda», Япония), ЭГТА, Кумасси R-250, акриламид, бис-акриламид, TEMED, персульфат аммония, ДДС-Na («Sigma», ФРГ), MgCl_2 , CaCl_2 , ацетонитрил («Merck», ФРГ). Остальные реактивы марок х.ч. и ос.ч. («Союзхимреактив»).

Результаты и обсуждение

Было исследовано воздействие нативных (ПФ₁₋₅) и синтетических (СП₁₋₄) пептидов в концентрации 10 нМ на активность кальцийейрина. Как видно из рис. 1, а (2—6) и б (2—5) как нативные, так и синтетические пептиды вызывали значительное ингибирование активности кальцийейрина. Нативные пептиды ингибировали активность фермента на 87, 94, 99, 98 и 85% для ПФ₁, ПФ₂, ПФ₃, ПФ₄ и ПФ₅ соответственно. Синтетические пептиды СП₁, СП₂, СП₃ и СП₄ ингибировали активность фермента на 76, 87, 94, 77% соответственно (данные относительно ингибирующего воздействия ПФ₁₋₅ и СП₁₋₄ приведены с вычетом базальной активности фермента, определенной в отсутствие Ca^{2+} и кальмодулина в инкубационной среде). Следует отметить, что наибольшим ингибирующим воздействием на активность кальцийейрина обладали ПФ₃ и соответствующий ему по структуре СП₃. Эти пептиды снижали активность фермента до уровня базальной активности.

Были определены величины K_i (рис. 2) для кальцийейрина относительно ПФ₁₋₅ и СП₁₋₄. Оказалось, что ПФ₁₋₅ и СП₁₋₄ имеют близкие величины K_i . Величина K_i для ПФ₁₋₅ находится в диапазоне от $1,9 \cdot 10^{-9}$ М до $2,8 \cdot 10^{-9}$ М; для СП₁₋₄ величина K_i находится в диапазоне от $2,5 \cdot 10^{-9}$ М до $3,1 \cdot 10^{-9}$ М.

Учитывая обнаруженную нами ранее способность ПФ₁₋₅ вызывать Ca^{2+} -независимое активирование КЛЦМ и кальмодулинчув-

ствительной ФДЭ сАМР [4—6] путем Ca^{2+} -независимого связывания с молекулой кальмодулина [7, 8], исследовали влияние как ПФ_{1-5} , так и СП_{1-4} на активность кальцинейрина в отсутствие Ca^{2+} . Инкубационная среда содержала при этом кальмодулин и 1 мМ ЭГТА. Как видно из рис. 1, а (8—12) и б (7—10), ПФ_1 , ПФ_2 , ПФ_3 , ПФ_4 , ПФ_5 ингибируют активность фермента (которая в данном случае равна базальной активности кальцинейрина, определенной в отсутствие Ca^{2+} и кальмодулина) в отсутствие Ca^{2+} , но в присутствии кальмодулина (360 нМ) на 54, 24, 59, 33 и 24% соответственно; синтетические пептиды также вызывали Ca^{2+} -независимое ингибирование активности кальцинейрина в присутствии кальмодулина на 35, 48, 37, 19% для СП_1 , СП_2 , СП_3 и СП_4 соответственно. На основании полученных результатов можно предположить, что ПФ_{1-5} и СП_{1-4} являясь, по-видимому, аллостерическими регуляторами кальмодулина, связываются с ним и образуют комплекс кальмодулин—пептид, который, в свою очередь связываясь с СЕ А, содержащей кальмодулинсвязывающий домен, вызывает определенные конформационные изменения в молекуле кальцинейрина, ведущие к ингибированию его активности. Обнаруженный нами факт ингибирования ак-

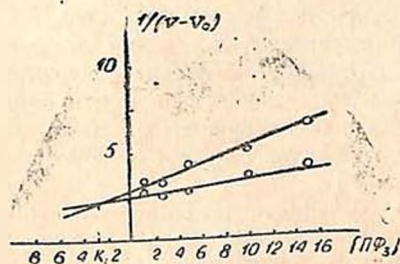


Рис. 2. Определение величины K_1 для кальцинейрина относительно коронаресуживающего пептидного фактора (ПФ), выделенного из гипоталамуса крупного рогатого скота. v —относительная флуоресценция при 445 нм; $[\text{ПФ}_3]$ —иг ПФ_3 в пробе. 12,5 нМ кальцинейрина инкубировали с набором концентраций ПФ_3 (1—15 иг) в течение 10 мин при комнатной температуре, затем добавляли 0,7 мкМ или 1,4 мкМ 4-МУФ и инкубировали 1 ч при 32°

тивности кальцинейрина под влиянием вышеуказанных пептидных факторов как в присутствии Ca^{2+} и кальмодулина, так и в отсутствие Ca^{2+} (но в присутствии кальмодулина коррелирует с данными, полученными нами ранее с использованием метода ферментзависимого иммуносорбентного анализа (ELISA)), свидетельствует о том, что ПФ_{1-5} связываются с кальмодулином как в присутствии, так и в отсутствие Ca^{2+} . Кальцинейрин оказался хорошей моделью для демонстрации этой особенности ПФ_{1-5} .

Как было сказано выше, учитывая, что СЕ В кальцинейрина имеет высокую степень гомологии (35%) [14] с кальмодулином, мы не исключали также возможности прямого воздействия ПФ_{1-5} на фермент путем связывания с СЕ В, поскольку ПФ_{1-5} обладают высоким сродством к кальмодулину ($K_d = 2\text{--}10$ нМ). Поэтому мы исследовали влияние ПФ_{1-5} и СП_{1-4} на активность фермента в отсутствие как Ca^{2+} , так и кальмодулина в инкубационной среде. В этом случае мы также наблюдали ингибирование активности фермента (рис. 1, а, 14—18; б, 12—15), однако оно было выражено

значительно слабее, чем в случае, когда инкубационная среда содержала кальмодулин. Нативные коронаросуживающие пептиды ингибировали активность фермента на 8, 18, 25, 11, 18% для ПФ₁, ПФ₂, ПФ₃, ПФ₄ и ПФ₅ соответственно. Синтетические пептиды ингибировали активность кальцинейрина в этом случае на 7, 13, 20, 10% для СП₁, СП₂, СП₃ и СП₄ соответственно. На основании полученных результатов можно было предположить, что прямое воздействие ПФ₁₋₅ и СП₁₋₄ очевидно, имеет место, и, по-видимому, все же через связывание с СЕ В. Однако прямое воздействие ПФ₁₋₅ и СП₁₋₄ на фермент выражено лишь в незначительном ингибировании его активности, и, по всей вероятности, если предположить, что и в условиях *in vivo* ПФ₁₋₅ могут принять участие в регуляции активности кальцинейрина, то эти пептидные факторы будут оказывать воздействие на активность фермента путем связывания с кальмодулином.

Недавно пептид, названный LVV-геморфин-6, соответствующий фрагменту 32—40 β-цепи гемоглобина, был выделен из гипофиза человека [23]. Было обнаружено, что этот пептид обладает сильным опиоидным свойством, кроме того, является ингибитором ангиотензинконвертирующего фермента, то есть препятствует образованию сильного сосудосуживающего агента—ангиотензина II [24]. Эти данные косвенно подтверждают наши результаты, поскольку логично предположить, что данный пептид, содержащий аминокислотную последовательность ПФ₁₋₃ [6, 17], обладающих, как известно, и сосудосуживающими свойствами [3, 4], может конкурировать с ангиотензином II путем ингибирования активности ангиотензинконвертирующего фермента.

Таким образом, фрагмент 32—41 β-цепи гемоглобина содержит биологически активные пептиды и до сих пор имеются сообщения о выделении этих пептидов только из двух источников: гипоталамуса и гипофиза [3, 23]. Поскольку гипофиз и гипоталамус принадлежат к тем отделам мозга, где ГЭБ наиболее уязвим [25—27], можно предположить, что вышеуказанные биологически активные пептиды, образуясь из гемоглобина в результате его ограниченного протеолиза при различных физиологических или патологических состояниях организма, проникают в гипоталамус и гипофиз и принимают участие в различных метаболических процессах, в том числе и в регуляции активности Ca²⁺-кальмодулинзависимых систем, путем связывания с кальмодулином.

С помощью метода ELISA нами было обнаружено, что ПФ₁₋₅ изменяют чувствительность кальмодулина к ТФП [7, 8], а также к другим антагонистам кальмодулина [32]. Учитывая эти данные, мы исследовали кооперативное воздействие коронаросуживающих пептидов и ТФП на активность кальцинейрина. В экспериментах были использованы ПФ₃ и СП₃, которые в концентрации 10 нМ ингибировали активность кальцинейрина до уровня базальной. В свою очередь, ТФП в концентрации 50 мкМ также ингибировал актив-

ность кальцинейрина до уровня его базальной активности. Полученные результаты (таблица) показали, что при кооперативном воздействии ПФ₃ и ТФП, а также СП₃ и ТФП на активность кальцинейрина происходило уменьшение ингибиторного эффекта, вызываемого каждым из этих соединений в отдельности. По-видимому, в данном случае, в результате образования комплекса кальмодулин-пептид-ТФП происходят определенные изменения в конформации кальмодулина, отличные от тех, которые происходят при его связывании с пептидом или с ТФП. Комплекс кальмодулин-пептид-ТФП, в свою очередь, связываясь с СЕ А кальцинейрина, соответствующим образом изменяет и активность фермента.

Таблица

Кооперативное воздействие коронаросуживающих пептидных факторов (ПФ₃ и СП₃) и трифторперазина (ТФП) на активность кальцинейрина

Соединения	Относительная активность, %
Ca ²⁺	18
Кальмодулин + ЭГТА	19
Ca ²⁺ + кальмодулин	100
Ca ²⁺ + кальмодулин + ПФ ₃	21
Ca ²⁺ + кальмодулин + СП ₃	23
Ca ²⁺ + кальмодулин + ТФП	20
Ca ²⁺ + кальмодулин + ПФ ₃ + ТФП	41
Ca ²⁺ + кальмодулин + СП ₃ + ТФП	44

Примечание. Исследуемые соединения применялись в следующей концентрации: кальмодулин—360 нМ, CaCl₂—0,3 мМ, ЭГТА—1 мМ, кальцинейрин—12,5 нМ, ПФ₃—10 нМ, СП₃—10 нМ, ТФП—50 мкМ.

ТФП и пептид инкубировали 10 мин при комнатной температуре вместе с кальцинейрином, затем добавляли субстрат (1 мМ 4-МУФ) и инкубировали 1 ч при 32°.

Как известно, многие антагонисты кальмодулина применяются в качестве лекарственных препаратов: фенотиазины (ТПФ и хлорпромазин) как антипсихотики [30], алкалоиды винбластин и винкристин при химиотерапии опухолей [31]. Эти препараты токсичны и оказывают побочные отрицательные эффекты на организм человека. Поэтому обнаруженный нами факт изменения чувствительности кальмодулина [7, 8], а также Ca²⁺-кальмодулинзависимого фермента—кальцинейрина к ТФП под влиянием коронаросуживающих пептидов (ПФ₃ и СП₃) может иметь и практическое значение при создании менее токсичных препаратов.

Мы предполагаем продолжить и углубить эти исследования с вовлечением более широкого спектра Ca²⁺, кальмодулинзависимых ферментов и более широкого набора антагонистов кальмодулина.

Авторы приносят благодарность д. х. н. Я. В. Возному, (Институт биохимии АН Армении) за предоставление 4-МУФ и 4-МУ и д-ру Ф. Лоттшайху (Институт биохимии им. Макс-Планка, Мюнхен, ФРГ) за предоставление синтетических пептидов.

THE INVESTIGATION OF THE EFFECT OF NATIVE AND SYNTHETIC CORONAROCONSTRICTORY PEPTIDE FACTORS ON Ca^{2+} , CALMODULIN-DEPENDENT PHOSPHOPROTEIN PHOSPHATASE ACTIVITY

BARSEGHIAN K. S., BARKHUDARYAN N. A., GALOYAN A. A.

H. Ch. Buniatian Institute of Biochemistry, Acad. Sci. of Armenia, Yerevan

The influence of native and synthetic coronaroc-onstrictory peptide factors (PF_{1-5}) on the Ca^{2+} , CaM-dependent phosphoprotein phosphatase (calcineurin) activity has been investigated. Phosphatase activity was assayed by spectrophotometric assay using 4-methylumbelliferyl phosphate (4-MUP).

It has been determined that as native as well as synthetic peptides are sensitive inhibitors for calcineurin with K_i $1.8-2.5 \cdot 10^{-9}$ M for native peptides and K_i $2.2-3.1 \cdot 10^{-9}$ M for synthetic ones.

During the investigation of cooperative influence of coronary constrictory peptides and TFP on calcineurin activity it has been discovered that the inhibitory effect of these compounds on calcineurin activity decreases. The possibility for PF_{1-5} participation in the regulation of calcineurin activity *in vivo* is discussed.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Cohen P. Ann. Rev. Biochem., v. 58, p. 453-508, 1969.
2. Cohen P. Proc. R. Soc. London, Ser. B., v. 234, p. 115-141, 1969.
3. Галоян А. А., Бархударян Н. А., Валко К., Закарян Т. Р. Нейрохимия, т. 7, № 4, с. 519-524, 1988.
4. Бархударян Н. А., Закарян Т. Р., Шувалова Л. А., Чацлян С. Г., Алексанян А. Р., Галоян А. А. Нейрохимия, т. 8, № 4, с. 485-491, 1989.
5. Barkhudaryan N., Zakaryan T., Aleksanyan A., Sharova N., Shuvailova L., Chacilyan S., Galoyan A. 8th ESN Meeting, Leipzig, p. 21, 1990.
6. Закарян Т. Р., Бархударян Н. А., Шувалова Л. А., Островская М. В., Шарова Н. П., Галоян А. А. Нейрохимия, т. 9, № 4, с. 444-449, 1990.
7. Hovhagh L., Barkhudaryan N., Galoyan A., Ovadi J. FEBS Lett., v. 276, № 1, 2, p. 197-200, 1990.
8. Бархударян Н. А., Хорват Л., Галоян А. А., Овади Ю. Нейрохимия, т. 9, № 2, с. 190-197, 1990.
9. Martin B. L., Graves D. J.-In: Advances in Protein Phosphatases (eds. W. Merlevede, J. Di Salvo), v. 4, p. 95-125, Leuven University Press, Leuven, 1987.
10. Klee C. B., Crouch T. H., Krinks M. H. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, v. 76, p. 6270-6273, 1979.
11. Gupta R. C., Khandewal R. L., Sulakhe P. V. FEBS Lett., v. 190, p. 104-108, 1985.
12. Klee C. B., Krinks M. H., Manalan A. S., Draetta G. F., Newton D. L.-In: Advances in Protein Phosphatases (eds. W. Merlevede, J. Di Salvo), v. 1, p. 135-146, 1985.
13. Aitken A., Klee C. B., Cohen P. Eur. J. Biochem., v. 139, p. 663-671, 1984.
14. Aitken A., Cohen P., Santikarn S., Williams D. H., Calder A. G., Klee C. B. FEBS Lett., v. 150, p. 314-318, 1982.

15. Kretsinger R. H. CRC, Crit. Rev. Biochem., v. 3, p. 119—174, 1986.
16. Hubbard S. R., Hodgson K. O., Donlach S. J. Biol. Chem., v. 263, p. 4151—4158, 1988.
17. Бархударян Н. А., Келлерман П., Лоттипайх Ф., Галоян А. А. Нейрохимия, т. 10, № 3—4, с. 146—154, 1991.
18. Sharma R. K., Desai R., Waisman D. M., Wang J. H. J. Biol. Chem., v. 254, p. 4276—4282, 1979.
19. Taliani E. A., Wallace R. W., Cheung W. Y. Methods Enzymol., v. 102, p. 241—256, 1983.
20. Laemmli U. K. Nature, v. 227, p. 680—683, 1970.
21. Anthony F. A., Merat D. L., Cheung W. Y. Anal. Biochemistry, v. 155, p. 103—107, 1986.
22. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. J. Biol. Chem., v. 193, p. 265—275, 1951.
23. Glämsa E.-L., Marklund A., Hellman U., Wernstedt G., Terenius L., Nyberg F. Reg. Peptides, v. 34, p. 169—179, 1991.
24. Lantz I., Glämsa E.-L., Taabäck L., Nyberg F. FEBS Lett., v. 287, № 1, 2, p. 39—41, 1991.
25. Bouchaud C., Bosler O. Int. Rev. Cytol., v. 105, p. 233—327, 1986.
26. Leonhardt H.—In: Handbuch der Mikroskopischen Anatomie des Menschen (ed. Oksche A.), p. 177—666, Springer-Verlag, 1980.
27. Risau W., Wolburg H. TINS, v. 13, p. 174—178, 1990.
28. Klee C. B., Cohen P.—In: Molecular Aspects of Cellular Regulation (ed P. Cohen), p.225—248, Elsevier, Amsterdam, N. Y., Oxford, 1988.
29. Klee C. B., Krinks M. H. Biochemistry, v. 17, p. 120—126, 1978.
30. Reid R. E., Gariopy J., Hodges R. S. FEBS Lett., v. 154, p. 60—64, 1983.
31. Vilson L. Life Sci., v. 17, p. 303—310, 1975.
32. Бархударян Н. А., Барсегян К. С., Аветисян Н. А., Закарян Т. Р., Галоян А. А. Нейрохимия, т. 11 № 2, с. 228—234, 1992:

Поступила 15. 11. 1992