

УД 577.112:577.152

ИЗМЕНЕНИЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ КАЛЬМОДУЛИНА К ЕГО АНТАГОНИСТАМ ПОД ВЛИЯНИЕМ КОРОНАРОСУЖИВАЮЩИХ ПЕПТИДНЫХ ФАКТОРОВ ГИПОТАЛАМУСА

БАРХУДАРЯН Н. А., БАРСЕГЯН К. С., АВЕТИСЯН Н. А.,
ЗАКАРЯН Т. Р., ГАЛОЯН А. А.

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

За последние несколько лет нами накоплен большой фактический материал, свидетельствующий о том, что коронаросуживающие пептидные факторы гипоталамуса (ПФ₁₋₅) [1] связываются с молекулой кальмодулина (как в присутствии, так и в отсутствие Ca²⁺) [2, 3], и таким путем оказывают регуляторное воздействие на активность некоторых Ca²⁺-кальмодулинзависимых ферментов [4]. Недавно было установлено, что ПФ₁₋₅ связываются как с N-, так и с C-концевыми доменами кальмодулина, что типично для таких известных антагонистов кальмодулина, как трифторперазин (ТФП) и меллитин [5, 6]. Ранее при исследовании кооперативного эффекта ПФ₁₋₅ и ТФП на процесс образования иммунокомплекса кальмодулин-антитело нами было установлено, что ПФ₁₋₅ изменяют чувствительность кальмодулина к ТФП [2, 3]. ТФП, связываясь с кальмодулином, препятствует его взаимодействию с различными Ca²⁺-кальмодулинзависимыми ферментами [7—9] и тем самым оказывают воздействие на ряд важнейших метаболических процессов, протекающих в клетке.

Представляло значительный интерес изучение действия ТФП, а также других антагонистов кальмодулина при сочетании с ПФ₁₋₅ на образование иммунокомплекса кальмодулин-антитело.

В данной работе сообщается об исследовании кооперативного воздействия ПФ₁₋₅ и таких антагонистов кальмодулина, как ТФП, хлорпромазин, N-(6-аминогексил)-5-хлоро-1-нафтален-сульфонамид (W-7), вибластин, винкристин [10—12] на процесс образования иммунокомплекса кальмодулин-антитело.

ПФ₁₋₅ выделяли из гипоталамуса быка по методу Галояна и соавт. [1].

Для определения образования иммунокомплекса кальмодулин-антитело использовали метод непрямого ферментзависимого иммуно-

сорбентного анализа (ELISA) с некоторыми модификациями по методу Van Eldik и соавт. [10]. Кальмодулин в концентрации 2,5 мкг/мл был иммобилизован на платах при 4° в течение 18 ч. Антитела вносили в лунки плат в концентрации 7,5 мкг/мл и платы инкубировали 2 ч при комнатной температуре. В экспериментах по определению кооперативного воздействия ПФ в концентрации, равной I_{50} , и антагонистов кальмодулина (использовали различные концентрации антагонистов кальмодулина от 0,8 до 500 мкМ) на процессе образования иммунокомплекса кальмодулин-антитело, исследуемые соединения вносили в лунки плат вместе с антителами. Анти-IgG, конъюгированный с пероксидазой хрена, вносили в лунки плат в разведении 1:1000, и платы инкубировали 2 ч при комнатной температуре. Через 60 мин после добавления субстрата (H_2O_2 и *o*-фенилендиамина) содержимое лунок фиксировали добавлением 2 н. H_2SO_4 и измеряли поглощение при 492 нм.

Гидролиз кальмодулина (2 мг/мл) трипсином был проведен в присутствии 0,1 М $CaCl_2$ по методу Grabikowski и соавт. [13]. Фрагменты кальмодулина (1—77 и 78—148) были выделены из гидролизата в гомогенном виде по методу Olegini и соавт. [14] с использованием ВЭЖХ в обращенной фазе на колонке Li Chromorb 5 RP—18 (0,4—25 см. диаметр) частиц—5 мкм; «Bio Separation Technologies», Венгрия). Элюцию проводили 10 мМ $(NH_4)_2CO_3$ с использованием линейного градиента ацетонитрила от 10 до 40%. Скорость элюции составляла 1 мл/мин. Время изменения градиента—20 мин. Поглощение измеряли при 214 нм. Фрагменты кальмодулина были лиофилизированы и хранились при —20°.

В работе использованы следующие реактивы: кальмодулин, антитела против бычьего кальмодулина, анти-IgG, конъюгированный пероксидазой хрена («Sigma», США), ТФП, винбластин, винкристин, W-7, хлорпромазин («Chinoin Pharmaceutical», Венгрия), ацетонитрил («Merck», ФРГ).

Исследования, проведенные с помощью метода ELISA выявили, что антагонисты кальмодулина—ТФП, хлорпромазин, W-7, винбластин, винкристин в зависимости от своей концентрации могут оказывать двоякое воздействие на процесс образования иммунокомплекса кальмодулин-антитело. Как можно заметить из рис. 1, а, при низких концентрациях эти соединения стимулируют, а при высоких концентрациях—подавляют процесс образования иммунокомплекса кальмодулин—антитело.

Овади и соавт. [15, 16] на примере изучения воздействия ТФП на процесс образования иммунокомплекса кальмодулин-антитело высказали предположение, что при высоких концентрациях ТФП связывается с С-концевым доменом кальмодулина (где расположен антигенный участок кальмодулина—последовательность аминокислот 137—143), вызывая такие конформационные изменения в его молекуле, которые приводят к потере сродства кальмодулина к анти-

лам, а при низких концентрациях ТФП, по-видимому, связываются с N-концевым доменом, вызывая иные конформационные изменения в молекуле кальмодулина, вероятнее всего, в С-концевом домене, которые приводят к повышению сродства кальмодулина к антителам. Высказанное предположение указывает также на существование внутримолекулярного взаимодействия между N- и С-концевыми до-

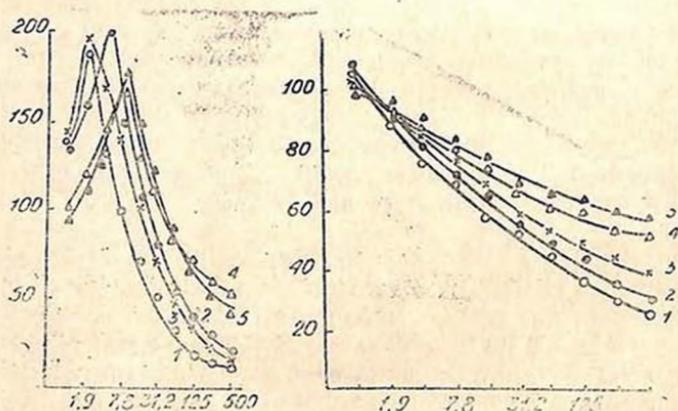


Рис. 1. а. Влияние антагонистов кальмодулина на образование иммунокомплекса кальмодулин-антитело. Был использован метод непрямого ELISA с применением кроличьих антител против бычьего кальмодулина. Кальмодулин был иммобилизован на платах в концентрации 2,5 мкг/мл. Антитела вносили в лунки плат в концентрации 7,5 мкг/мл. 1—трифторперазин; 2—хлорпромазин; 3—W-7; 4—винбластин; 5—винкристин. По оси абсцисс—концентрации антагонистов кальмодулина в мкМ, по оси ординат—% образования иммунокомплекса кальмодулин-антитело б. Влияние антагонистов кальмодулина на образование иммунокомплекса С-концевой фрагмент кальмодулина-антитело. С-концевой фрагмент кальмодулина (последовательность аминокислот 78-148) был иммобилизован на платах в концентрации 3,6 мкг/мл. Антитела вносили в лунки плат в концентрации 7,5 мкг/мл. 1—трифторперазин; 2—хлорпромазин; 3—W-7; 4—винбластин; 5—винкристин. По оси абсцисс—концентрация антагонистов кальмодулина в мкМ, по оси ординат—% образования иммунокомплекса

менами кальмодулина при связывании его с ТФП. Нами были проведены эксперименты, подтверждающие высказанную гипотезу. Основываясь на полученных результатах, мы предположили, что дозозависимый эффект хлорпромазина, W-7, винбластина и винкристина на процесс образования иммунокомплекса можно, по-видимому, также объяснить вышеприведенной гипотезой. Для проверки этого предположения на платах вместо интактного кальмодулина был иммобилизован его С-концевой фрагмент [78—148].

Как видно из рис. 1, б, в случае, когда на платах был иммобилизован С-концевой фрагмент кальмодулина, все исследуемые соединения теряли способность стимулировать образование иммунокомплекса, что, очевидно, обусловлено связыванием антагонистов кальмодулина с его N-концевым фрагментом.

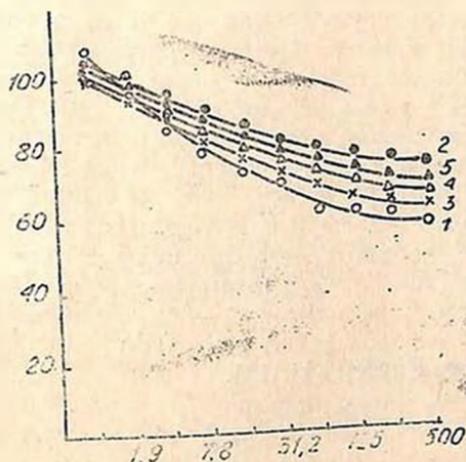


Рис. 2. Кооперативное воздействие антагонистов кальмодулина и коронаросуживающего пептидного фактора (ПФ₃) в концентрации, равной I₅₀ (15,8 нМ) на образование иммунокомплекса кальмодулин-антитела. Кальмодулин был иммобилизован на платах в концентрации 2,5 мкг/мл. Антитела вносили в лунки плат в концентрации 7,5 мкг/мл. 1—ПФ₃+трифторперазин; 2—ПФ₃+хлорпромазин; 3—ПФ₃+W-7; 4—ПФ₃+винбластин; 5—ПФ₃+винкристин. По оси абсцисс—концентрация антагонистов кальмодулина в мкМ, по оси ординат—% образования иммунокомплекса

Учитывая вышеприведенные данные, мы исследовали кооперативное воздействие антагонистов кальмодулина и коронаросуживающих пептидных факторов гипоталамуса (ПФ₁₋₅) на процесс образования иммунокомплекса кальмодулин-антитела. Ранее нами было обнаружено, что ПФ₁₋₅ в значительной степени (до 90%) ингибировали [2, 3] связывание антител с кальмодулином в концентрации, меньшей на три порядка, чем ТФП. Концентрации, при которых ПФ₁₋₅ вызывали 50%-ное ингибирование образования иммунокомплекса (I₅₀), находились в диапазоне от 2,5 до 31,6 нМ для различных ПФ. В проведенных экспериментах были использованы постоянные концентрации ПФ₁₋₅ равные I₅₀ и различные концентрации антагонистов кальмодулина от 0,8 до 500 мкМ. ПФ в сочетании с различными антагонистами кальмодулина оказывает один и тот же эффект на процесс образования иммунокомплекса. Во-первых, происходит исчезновение стимулирующего эффекта антагонистов кальмодулина на процесс образования иммунокомплекса. Во-вторых, наблюдается снижение ингибиторного эффекта, характерного для высоких концентраций антагонистов кальмодулина на про-

песс образования иммунокомплекса (для хлорпромазина—на 42%, для ТФП—на 32%, для W-7, вибластина и винокристина—на 15–20%). Антагонисты кальмодулина, в свою очередь, также изменяют чувствительность кальмодулина к ПФ_{1–5}; происходит снижение ингибиторного эффекта ПФ_{1–5} [2, 3] на процесс образования иммунокомплекса на 45% и более.

Известно, что кальмодулин связывает фенотиазины (ТФП, хлорпромазин) по двум классам центров. Один класс центров (для ТФП характерно 24–27 таких центров, а для хлорпромазина—17) обладает низким сродством к фенотиазинам (с K_d для ТФП, равной 500 мкМ, а для хлорпромазина—130 мкМ), независящим от наличия Ca^{2+} . Другой класс центров обладает высоким сродством к фенотиазинам: для ТФП характерно 2 таких центра с K_d —1,5 мкМ, а для хлорпромазина имеется 3 подобных центра с K_d —5 мкМ; связывание фенотиазинов с этим классом центров происходит Ca^{2+} -зависимым способом [10, 15]. W-7 связывается с кальмодулином Ca^{2+} -зависимым способом с K_d , равной 11 мкМ, а алкалоиды вибластина и винокристина связываются с кальмодулином с K_d равной 2 мкМ, также Ca^{2+} -зависимым путем [11, 12].

Недавно проведенные нами исследования [16] показали, что ПФ_{1–5} связываются как с N-(K_d —15–100 нМ), так и с C-концевыми (K_d —50–1000 нМ) доменами кальмодулина, обладая более высоким сродством к N-концевому домену. Установленная нами первичная структура для 3-х из ПФ_{1–5} (VVYRW; VVYRW; LVVYRW) [17] дала основание предположить, что эти пептиды связываются с кальмодулином преимущественно через гидрофобные взаимодействия, что типично для многих антагонистов кальмодулина.

Исходя из полученных данных и имеющейся в литературе информации, мы выдвинули следующую гипотезу, объясняющую кооперативный эффект ПФ_{1–5} и антагонистов кальмодулина на процесс образования иммунокомплекса. ПФ_{1–5}, обладая высоким сродством к N-концевому домену кальмодулина (величина K_d для комплекса N-концевой фрагмент кальмодулина—ПФ меньше, чем величина K_d для комплекса кальмодулин-антагонист кальмодулина), в первую очередь, связываются с ним, вызывая такие конформационные изменения, которые препятствуют связыванию антагонистов кальмодулина с N-концевым доменом. Поэтому мы не наблюдаем активирующего эффекта антагонистов кальмодулина на процесс образования иммунокомплекса, который, как было показано выше, был обусловлен связыванием антагонистов кальмодулина с его N-концевым доменом. Связывание же ПФ_{1–5} с C-концевым доменом кальмодулина происходит почти одновременно или последовательно с антагонистами кальмодулина. Об этом свидетельствуют близкие величины K_d для комплексов C-концевой фрагмент кальмодулина—ПФ и кальмодулин-антагонист кальмодулина. В результате образуется комплекс кальмодулин-ПФ-антагонист кальмодулина с присущей ему определенной конформацией и в таком модифицированном со-

стоянии молекула кальмодулина изменяет свою чувствительность как к ПФ₁₋₅, так и к его антагонистам.

Известно, что фенотиазины применяются в качестве нейролентиков, W-7 используется в качестве сосудорасширяющего агента [18], а алкалоиды винбластин и винкристин применяются при химиотерапии опухолей [19]. При этом средство всех этих лекарственных соединений к кальмодулину коррелирует с их фармакологической активностью.

Учитывая обнаруженный нами факт изменения чувствительности кальмодулина к его антагонистам под влиянием ПФ₁₋₅, представляется целесообразным проведение фармакологических исследований кооперативного воздействия антагонистов кальмодулина и ПФ₁₋₅ с использованием специфических тестов. Не исключено, что ПФ₁₋₅, изменяя чувствительность кальмодулина к этим лекарственным препаратам, могут найти возможное применение при создании менее токсичных препаратов.

THE CHANGES OF SENSIBILITY OF CALMODULIN AGAINST ITS ANTAGONISTS UNDER THE INFLUENCE OF HYPOTHALAMIC CORONARY CONSTRICTORY PEPTIDE FACTORS

BARKHUDARYAN N. A., BARSEGIAN K. S., AVETISYAN N. A.,
ZAKARYAN T. R., GALOYAN A. A.

И. Сб. Бунятян Institute of Biochemistry, Acad. Sci. of Armenia, Yerevan

Using the technique of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) the cooperative influence of calmodulin (CaM-) antagonists and coronar-constrictory peptide factors (PF₁₋₅-) on the formation of CaM-antibody immunocomplex has been investigated.

It has been shown that PF₁₋₅, having higher affinity with CaM, changes the CaM sensibility against its antagonists. CaM antagonists in their place decrease the inhibition of the formation of CaM-antibody immunocomplex under the influence of PF₁₋₅ more than for 45%.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Галоян А. А., Бархударян Н. А., Валко К., Закарян Т. Р. Нейрохимия, т. 7, № 4, с. 519—524, 1988.
2. Бархударян Н. А., Хорват Л., Галоян А. А., Овади Ю. Нейрохимия, т. 9, № 2, с. 190—197, 1990.
3. Horvath L., Barkhudaryan N., Galoyan A., Ovadi J. FEBS Lett., v. 276, № 1—2, p. 197—200, 1990.
4. Barkhudaryan N., Zakaryan T., Aleksanyan A., Sharova N., Shuzh'ova L., Chailyan S., Galoyan A. 8th ESV Meeting, Leipzig, DDR, p. 21, № 4, 1991.
5. Levin R. M., Weiss B. J. Pharmacol. Exp. Ther., v. 213, p. 451—459, 1979.
6. Steiner R. F., Marshall L., Neddeman D. Arch. Biochem. Biophys. v. 246, p. 296—300, 1986.
7. Prozialek W. C., Weiss B. J. Pharmacol. Exp. Ther., v. 222, p. 509—516, 1982.

8. Weiss P., Prozia'cek W., Cimino M. Adv. Cycl. Nucl. Res., v. 12, p. 213-225, 1960.
9. Moir A. J. G., Ordidge M., Grand R. J. A., Trayer I. P., Perry S.-V. Biochem. J., v. 209, p. 417-426, 1983.
10. Reid R. E., Gariepy J., Hodges R. S. FEBS Lett., v. 154, p. 60-64, 1983.
11. Hidaka H., Yamaki T., Naka M., Tanaka T., Hayashi H., Kobayashi R. Mol. Pharmacol., v. 17, p. 66-72, 1980.
12. Watanabe K., West W. L. Fed. Proc. v. 41, p. 2292, 1982.
13. Drabikowski W., Kuznicki J., Grabarak Z. Biochim. et Biophys. acta, v. 485, p. 124-133, 1977.
14. Querini D., Krebs J., Carafoli E. J. Biol. Chem., v. 259, p. 15172-15177, 1984.
15. Ovadi J. Prog. Drug. Res. v. 33, p. 353-395, 1989.
16. Бархударян Н. А., Орос Ф., Лилиом К., Барсегян К. С., Овади Ю., Галоян А. А. Нейрохимия, т. 10 № 3-4, с. 155-166, 1991.
17. Бархударян Н. А., Келлерман Я., Логинайх Ф., Галоян А. А. Нейрохимия, т. 10, № 3-4, с. 146-154, 1991.
18. Nishikawa M., Hidaka H. J. Chlm. Invest., v. 69, p. 1348-1355, 1982.
19. Wilson L. Life Sci., v. 17, p. 303-310, 1975.

Поступила 15. II. 1992