НЕЙРОХИМИЯ
т. 11, № 3—4, 1992

УДК 616—008.939.633.2—02.616—008.931:577.152.311

ИССЛЕДОВАНИЕ ПЕРВИЧНОЙ СТРУКТУРЫ КАЛЬЦИЙНЕЗАВИСИМЫХ АКТИВАТОРОВ КАЛЬМОДУЛИНЗАВИСИМЫХ ФЕРМЕНТОВ

ГУРВИЦ Б. Я., АЛЕКСАНЯН С. С., ГАЛОЯН А. А.

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

Одна из биологически активных фракций, выделенных нами ранее из гипоталамуса быка, являющихся активаторами базальной активности кальмодулинзависимой ФДЭ циклических нуклеотидов, была подвергнута очистке до гомогенного состояния с помощью обратно-фазовой ВЭЖХ. Определение первичной структуры выделенного соединения показало, что оно представляет собой пептид, состоящий из 14 аминокислотных остатков, совпадающий по структуре с аминокислотной последовательностью фрагмента (72—85) основного белка миелина мозга, за исключением глутамина (72), которому в расшифрованной нами структуре соответствует глутаминовая кислота. Обсуждается вопрос о структурно-функциональных характеристиках выделенного пептида.

Существование эндогенных кальцийнезависимых активаторов ферментов, стимулируемых кальмодулином (КМ) в присутствии Ca^{2+}, заставляет задуматься о физиологической значимости процессов, происходящих с участием КМ. Это ставит под сомнение предположение о том, что КМ является универсальным специфичным регулятором множества реакций, запускаемых при повышении содержания Ca^{2+} в системе, либо в результате повышения чувствительности ферментов к КМ. К таким процессам относится мышечное сокращение, деление клеток, метаболизм циклических нуклеотидов, гликогена и т. д. Различные биологически активные соединения, такие как фосфолипиды, жирные кислоты, пептиды, лекарственные препараты не требуют присутствия Ca^{2+} для проявления своего влияния на КМ-зависимые ферменты [1—4].

Ранее мы обнаружили, что новые кардиотропные соединения, выделенные нами из гипоталамуса быка [5, 6], являются стимуляторами базальной активности КМ-зависимой ФДЭ циклических нуклеотидов, а также некоторых других КМ-зависимых ферментов, в частности протеинкиназы и киназы легких цепей миозина [7—10]. Эти соединения были нами названы С-модулинами.

В настоящее время мы проводим работы по идентификации первичной структуры С-модулинов и их фрагментов. Исследования их

структурно-функциональных характеристик могут явиться основой для понимания регуляторных эффектов Ca^{2+}, КМ-зависимых и Ca^{2+}, КМ-независимых модуляторов многих процессов, происходящих в организме.

Материалы и методы

Препарат, содержащий кардиотропные соединения, выделенный из гипоталамуса быка [5, 6], подвергали дальнейшей очистке с помощью обратно-фазовой ВЭЖХ [8, 10]. Для этого порошок, полученный в результате лиофилизации хлороформ-этанольного экстракта ткани гипоталамуса [5, 6], растворяли в 0,1%-ной трифторуксусной (ТФУ) кислоте, центрифугировали, супернатант фильтровали и фильтрат подвергали хроматографии в системе обратно-фазовой ВЭЖХ на колонке С-8 (Brownlee, Aguapore PP-300, 4,6×220 мм), или на колонке С-18 «(Altex», 4,6×250 мм). Элюцию С-модулинов осуществляли с помощью линейного градиента (0—30%) ацетонитрила, содержащего 0,08% ТФУ (буфер Б) в 0,1% ТФУ (буфер А) в течение 60 мин. Фракции, детектированные по УФ-поглощению при 210 нм, собирали, лиофилизировали, затем растворяли их в 50 мМ трис-HCl буфере, pH 8,0, и далее исследовали на предмет их влияния на базальную активность КМ-зависимой ФДЭ циклических нуклеотидов из мозга быка [8, 10]. Фракции 1 пика, содержащие активатор этого фермента, объединяли, лиофилизировали и подвергали рехроматографии в той же системе с использованием линейного градиента (10% — 30% Б) в течение 30 мин со скоростью 0,5 мл/мин на колонке С-8. Секвенирование гомогенного пика, полученного в результате рехроматографии, производили на секвенаторе белков фирмы «Knauer», ФРГ.

В работе были использованы ацетонитрил фирмы «Merck», ФРГ, ТФУ фирмы «Pierce», США.

Результаты и обсуждение

Ранее мы сообщали о том, что при хроматографии в системе обратно-фазовой ВЭЖХ гипоталамического экстракта были выделены три пика, обладающие способностью стимулировать базальную активность ФДЭ циклических нуклеотидов из мозга быка [7, 8] (рис. 1). Из рис. 1 следует, что скорость гидролиза [^{3}H]cAMP, использованного в качестве субстрата, возрастает в 6–10 раз в присутствии фракций пиков I, II или III, выделенных при ВЭЖХ. Результаты представлены в относительных единицах активности (ОЕА), рассчитанных по проценту гидролизованного субстрата в минуту с учетом соотношения состояния проб в отсутствие фермента и полного гидролиза субстрата в присутствии избытка фермента.

Рехроматография пика I выявила один доминантный и два минорных пика, элюируемых при 12,8, 14 и 14,6 Б (рис. 2, *а*). Доминатная фракция, выделенная при 14% Б при повторной рехроматографии в той же системе элюировалась в виде хроматографически чистого пика (рис. 2, *б*).

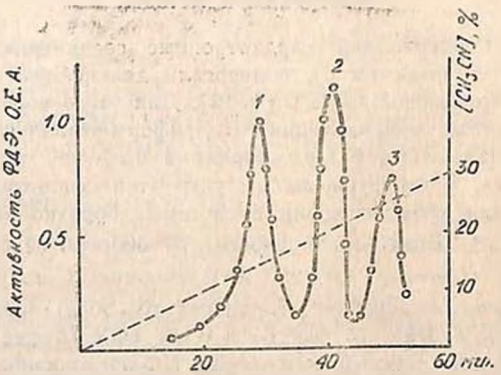

Рис. 1. Профиль активности фосфодиэстеразы циклического АМР в присутствии фракций, выделенных из гипоталамуса быка с помощью обратно-фазовой ВЭЖХ. Фракции (1 мл) собирали, лиофилизировали, растворяли в 50мМ трис-HCl буфере, pH 8.0, и далее исследовали их влияние на активность фермента (см. Материалы и методы).

Этот пик был подвержен секвенированию. Аминокислотная последовательность, полученная в результате секвенирования, оказалась следующей: Glu-Lys-Ala-Gln-Gly-His-Arg-Pro-Gln-Asp-Glu-Asn-Pro-Val (I). Поиск соответствующей структуры белка с помощью банка данных позволил обнаружить аминокислотную последовательность, которая оказалась фрагментом (72—85) основного белка миелина (ОБМ) ЦНС, тоесть белка миелина A_1: AAQKRPSQRS KYLASASTMD HARHGFLPRH RDTGILDSLG RFFGSDRGAP KRGSGKDGHH AARTTHYGSL PQKAQGHRPQ DENPV VHFFK NIVTPRTPPP SQGKGRGLSL SRFSWGAEGQ KPGFGYGGRA SDYKSAHKGL KGHDAQGTLS KIFKLGGRDS RSGSPMARR (II).

Приведенная структура ОБМ из спинного мозга быка, содержащая 169 аминокислотных остатка, была впервые определена в 1971 году [11]. Фрагмент (72—85) полностью совпадает с определенной нами структурой по всем аминокислотам, за исключением глутамина в позиции 72, которому в нашем случае соответствует глутаминовая кислота. Подобная замена могла произойти в результате дезамидирования глутамина при выделении пептида, поскольку на начальных этапах получения исходного экстракта из ткани гипотала-

муса методика предполагает гомогенизацию свежей ткани в кислой среде (растворе 0,25—0,5%-ной уксусной кислоты) [5, 12]. При этом следует отметить, что в определенной нами структуре имеются еще два глутамина, которые, несмотря на указанную обработку, сохранили свою амидированную форму; они полностью совпадают с позициями 75 и 80 в последовательности ОБМ (структура II). Однако ранее было показано, что дезамидированию подвергаются остатки глутамина и аспарагина, которые соседствуют с остатками основных аминокислот, например, с лизином или аргинином [13]. В нашем случае за глутамином (72) следует именно лизин (73).

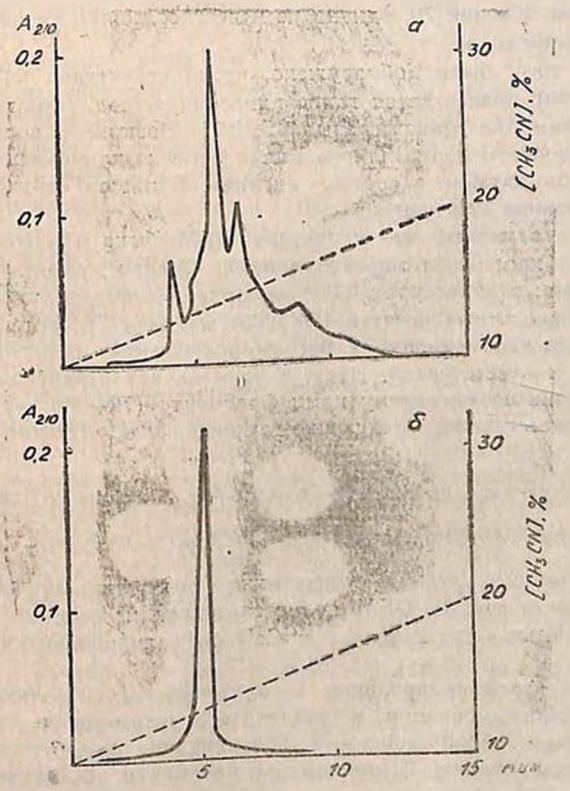

Рис. 2. а. Фракционирование С-модулинов с помощью обратно-фазовой ВЭЖХ. Фракции пика I (см. рис. 1) собирали, лиофилизировали, растворяли в 0,1% ТФУ и подвергали ВЭЖХ на колонке С-8 с использованием линейного градиента ацетонитрила в 0,1% ТФУ (10%—30% Б). *б.* Рехроматография пика C_1 (рис. 2) с помощью ВЭЖХ на колонке С-8

ОБМ является одним из доминирующих структурных белков миелина. Свойства, заложенные в структуре ОБМ, могут определять его функции в качестве акцепторного белка для фосфолипидов. Основные аминокислоты распределены беспорядочно, без какой-либо заметной периодичности, они могут взаимодействовать с фосфатными группами фосфолипидов. В нашем пептиде, содержащем 14 аминокислотных остатков, имеются лизин, гистидин и аргинин, которые могут участвовать в подобного рода взаимодействиях.

ОБМ подвергается также метилированию под действием ферментов мозга и других тканей. Ранее было показано [14], что мишенью является лишь аргинин (106). В пептиде (72—85) имеется аргинин в положении 79, однако не известно, может ли он быть объектом метилирования.

Кроме того, было обнаружено, что в структуре ОБМ остаток треонина (98) подвергается гликозилированию под действием N-ацетилгалактозаминил трансферазы [15, 16]. Возникает вопрос, происходят ли процессы гликозилирования и дегликозилирования ОБМ при его функционировании в составе миелина. В нашем пептиде (72—85) остатки треонина отсутствуют.

Следует отметить, что структура ОБМ быка (1—169) присуща также ОБМ кролика и морской свинки. Однако существуют некоторые различия: в структурах ОБМ кролика и морской свинки отсутствуют аминокислотные остатки Gln (75) и His (77) соответственно, а также обнаружена замена на Ser аминокислотных остатков Ala (74) и Pro (79) соответственно. Итак, в этом случае структуры ОБМ, соответствующие исследуемому нами фрагменту (72—85), представляют собой, соответственно, следующие аминокислотные последовательности:

—Gln-Lys-Ser-Gly-His-Arg-Pro-Gln-Asp-Glu-Asn-Pro-Val- (III)

—Gln-Lys-Ala-Gln-Gly-Arg-Ser-Gln-Asp-Glu-Asp-Pro-Val- (IV)

Подобная замена весьма существенна для структуры белка, поскольку, как известно, ОБМ является одним из лучших субстратов cAMP-зависимых протеинкиназ и Ca^{2+}-фосфолипидзависимых протеинкиназ.

Участки фосфорилирования в природных субстратах, а также центры фосфорилирования в различных синтезированных пептидах под действием cAMP-зависимых протеинкиназ подвергались интенсивному исследованию. Условием осуществления фосфорилирования, естественно, является доступность акцепторов фосфатного остатка— серина или треонина действию фермента. В некоторых случаях белки становились субстратами протеинкиназ лишь после денатурации [17] или химической модификации [18]. Участки фосфорилирования формируются также определенными аминокислотными остатками, соседствующими с сериновыми и треониновыми акцепторными остатками. Для установления закономерностей в структуре участков фосфорили-

рования определяли последовательность аминокислот в пептидах, содержащих фосфатный остаток, а также фрагментов белков—продуктов фосфотрансферазной реакции, полученных в результате гидролиза протеолитическими ферментами. В частности, оказалось, что в ОБМ из мозга быка фосфорилированию подвергается серин в положении (12), а в ОБМ мозга крысы—в положении (110). В ОБМ из мозга человека фосфорилируется остаток треонина (34) [19, 20].

Была обнаружена некоторая закономерность, присущая участкам фосфорилирования различных белков (гистонов, тропонина I, протамина, ОБМ). Она заключается в том, что вблизи остатка Ser, подвергающегося фосфорилированию, располагается группа основных аминокислотных остатков— Lis, Arg, His. Это обнаружено, например, на тропонине I из скелетной мышцы [21] и из сердца кролика [22], а также на ОБМ [19, 20].

Структуры приведенных выше фрагментов ОБМ мозга кролика (III) и морской свинки (IV), возможно, подтверждают эту закономерность. Вблизи N-конца остатка Ser в структуре III расположен остаток Lys, в структуре IV—Arg, а вблизи С-конца остатка Ser в структуре III находятся остатки His и Arg. Это превращает пептиды III и IV в весьма вероятные субстраты фосфорилирования под действием cAMP-зависимых протеинкиназ. Определенная нами последовательность ОБМ (72—85) не содержит аминокислотных остатков, подвергающихся фосфорилированию. Акцептором фосфатного остатка в молекуле ОБМ мозга (1—169) является Ser в положении 12 [19, 20].

По всей вероятности, пептид (72—85) образовался в результате протеолитического расщепления ОБМ, что позволяет предположить наличие соответствующих протеолитических ферментов в гипоталамусе быка, а также в мозгу кролика и морской свинки. Сопоставление структуры I со структурами III и IV может с большой вероятностью свидетельствовать о том, что пептид с аминокислотной последовательностью I является функционально значимым.

Как было сказано выше, ОБМ фосфорилируется также под действием Ca^{2+}-фосфолипидзависимой протеинкиназы [23, 24]. Из числа исследованных белков и пептидов ее лучшими субстратами оказались ОБМ (K_m=0,3 мкмоль) и гистон H_1 (K_m=0,6 мкмоль). Фосфорилирование под действием этого фермента из сердца быка приводило к включению 5-и и 2-х моль фосфата в первый и второй субстраты соответственно. При этом центры включения фосфатного остатка отличались от тех, которые были найдены при фосфорилировании этих субстратов под действием cAMP-зависимых протеинкиназ. Сродство Ca^{2+}-фосфолипидзависимой протеинкиназы к ОБМ оказалось в 20 раз больше, чем у cAMP-зависимой протеинкиназы. По-видимому, ОБМ является главным физиологическим субстратом Ca^{2+}-фосфолипидзависимой протеинкиназы, так как в мозгу активность этого фермента значительно больше, чем в других тканях [25].

Важным фактом явилось обнаружение участия ОБМ в процессе индукции экспериментального аллергического энцефаломиелита. При определении иммунопатологической роли ОБМ выяснилось, что пептидные фрагменты ОБМ также обладают иммуногенными свойствами [26, 27]. Было показано, что фрагмент ОБМ морской свинки (114—123), включающий остаток Trp, а именно: Phe-Ser-Trp-Gly-Ala-Glu-Gly-Gln-Lys-Pro, является наиболее эффективным из числа исследованных пептидов индуктором болезни. В структуре ОБМ кролика подобным свойством обладают фрагменты (114—123) и (44—89). Аминокислотная последовательность (44—89) содержит участок (68—74), имеющий структурное сходство с фрагментом (114—123). Было обнаружено также, что энцефалогенной активностью обладают и отдельные аминокислоты—триптофан, глутамин и лизин. Следует отметить, что исследуемый нами пептид обогащен в достаточной степени остатками глутамина, глутаминовой кислоты, в его структуру входит также лизин. Подобная структура может определять иммуногенную активность данного пептида.

Весьма вероятно, что при определенных условиях под действием протеаз мозга могут образовываться различные пептидные фрагменты ОБМ, в том числе и пептид, являющийся объектом нашего рассмотрения, обладающие энцефалитогенной активностью. Изучение функциональных свойств подобных пептидов позволит познать патогенез этого заболевания и предложить методы терапии.

При изучении С-модулиноподобных нейропептидов с кардиотропной активностью нам удалось выделить также в индивидуальном виде некоторые пептиды, условно названные 15р и 41 рс. Вместе с T. Lee (США) удалось методом масс-спектрального анализа установить их величины M_r, равные 15603, 19875 и 1895 Д соответственно. Они не подвергаются эдмановской деградации, что свидетельствует о блокировании N-концевых аминокислот указанных полипептидов. Впервые из так называемого ВПГ—3—4 порошка [5] удалось в индивидуальном виде выделить относительно высокомолекулярные биологически активные белки из гипоталамуса. Удалось также выделить белки с M_r 15749 и 15883 Д, которые, вероятно, являются дериватами вещества 41 р.

Учитывая, что вещество 15 р ингибитор ФДЭ cAMP, мы не исключаем возможности, что 15 р является носителем одного из коронарорасширяющих гормонов, ранее изолированных из гипоталамуса (например, нейрогормон С). Однако для подтверждения этого необходимы дополнительные экспериментальные данные.

ON THE INVESTIGATION OF THE PRIMARY STRUCTURE OF CALCIUM-INDEPENDENT ACTIVATORS OF CALMODULIN-DEPENDENT ENZYMES

GURVITS B. Ya., ALEXANYAN S. S., GALOYAN A. A.

H. Kh. Bunatian Institute of Biochemistry, Natl. Acad. Sci. of Rep. Armenia, Yerevan

We have previously isolated from bovine hypothalamus few biologically active compounds which proved to be stimulators of the calmodulin-dependent cyclic nucleotide phosphodiesterase basal activity. One of these stimulators has been purified to homogeneity by reverse phase HPLC. Amino acid sequence analysis established that the sample was indeed a peptide containing 14 amino acid residues, which proved to be an exact match for residues 72—85 of myelin basic protein, with one exception: Glu was found in place of Gln (72). Structure-functional characteristics of this peptide are discussed.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Wolff D. J., Brostrom C. O.* Arch. Biochem. and Biophys., v. 173, p. 720—731, 1976.
2. *Amer M. S.*—In: Cyclic Nucleotides and Therapeutic Perspectives, p. 36—75, Pergamon Press, N. Y., 1978.
3. *Wang J. H., Desai R.* Biochem. and Biophys. Res., Commun., v. 72, p. 926—932, 1976.
4. *Kanamori T., Creveling C. R., Daly J. W.* Biochem. et Biophys. acta, v. 582, p. 431—447, 1979.
5. *Галоян А. А.* Некоторые проблемы биохимии гипоталамической регуляции. Айастан, Ереван, 1965.
6. *Galoyan A. A.* Neurochem. Res., v. 11, p. 769—787, 1986.
7. *Галоян А. А., Гурвиц Б. Я.* Нейрохимия, т. 5, с. 420—422, 1986.
8. *Галоян А. А., Бобрускин И. Д., Гурвиц Б. Я., Абрамян Г. Э.* Нейрохимия, т. 8, с. 78—86, 1989.
9. *Galoyan A. A., Gurvits E. Ya., Sharova N. P.* Neurochem. Res., v. 14, p. 1213—1221, 1989.
10. *Galoyan A. A., Gurvits B. Ya., Shuvalova L. A., Davis M. T., Shively J. E., Lee T. D.* Neurochem. Res., v. 17, p. 773—777, 1992.
11. *Eylar E. H., Brostoff S. W., Hashim G., Caccam J., Burnett P.* J. Biol. Chem., v. 246, p. 5770—5784, 1971.
12. *Галоян А. А.* Докл. АН АрмССР, т. 4, с. 109—111, 1962.
13. *Robinson A., Mc Kerrow J., Cary P.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, v. 66, p. 753—760, 1970.
14. *Brostoff S. W., Eylar E. H.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, v. 68, p. 765—769, 1971.
15. *Hagopian A., Eylar E. H.* Arch. Biochem. and Biophys., v. 129, p. 515—521, 1969.
16. *Hagopian A., Westall F. C., Whitehead J. S., Eylar E. H.* J. Biol. Chem., v. 246, p. 2519—2521, 1971.
17. *Humble E., Berglund L., Titanji V.* et al. Biochem and Biophys. Res. Commun., v. 66, p. 614—621, 1975.
18. *Bylund D. B., Krebs E. G.* J. Biol. Chem., v. 250, p. 6355—6361, 1975.

19. *Carnique P. R., Dunkley P. R., Kemp B. E., Murray A. W.* Nature, v. 249, p. 147—150, 1974.
20. *Carnique P. R., Kemp B. E., Dunkley P. R., Murray A. W.* Biochem. J., v. 135, p. 569—572, 1993.
21. *Huang T. S., Byland D. B., Stull J. T., Krebs E. G.* Febs lett., v. 42, p. 249—252, 1974.
22. *Carlson G. M., Bechtel J. P., Graves D. I.*—In: Advances in Enzymol. (eds. Meister A. et al.), v. 50, p. 41—110, 1979.
23. *Takai Y., Kishimoto A., Iwasa Y. et. al.* J. Biol. Chem., v. 254, p. 3692—3695, 1979.
24. *Wise B. C., Raynor R. L., Kuo J. F.* J. Biol. Chem., v. 257, p. 8481—8488, 1982.
25. *Wise B. C., Glass D. B., Jen Chou C.—H.* J. Biol. Chem., v. 257, p. 8489—8495 1982.
26. *Eylar E. H., Salk J., Beveridge G., Brown L.* Arch. Biochem. and Biophys., v. 132, p. 34—42, 1969.
27. *Westall F., Robinson A., Caccam J., Jackson J., Eylar E. H.* Nature, v. 229, p. 22—27, 1971.

Поступила 27. VII. 1992