

УДК 615.361:612.8—611.73

## РОЛЬ ТИМОЗИНОВ В НЕРВНОЙ И МЫШЕЧНОЙ ТКАНИ

ГАЛЮЯН А. А.

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

Более четверти века известны первичные структуры гормонов иммунной системы, и в частности семьи тимозинов ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ -групп), являющихся стимуляторами созревания Т-лимфоцитов—основных клеточных элементов иммунной системы.

Различные тимозины были изолированы из многих видов животных, начиная от морского ежа до млекопитающих, однако их общепризнанное значение и молекулярные механизмы еще не выяснены. Известно лишь, что тимозин  $\beta_4$  стимулирует активность терминальной дезоксинуклеотидилтрансферазы, ингибирующей миграцию перитонеальных макрофагов как *in vitro*, так и *in vivo*, а также секрецию люлиберина и вызывает фенотипические изменения Molt-4 лейкемических клеток.

Открытие С-модулина 3 в гипоталамусе (тимозин  $\beta_4$  1—39), активирующего  $Ca^{2+}$ -кальмодулинзависимые ферменты без участия  $Ca^{2+}$  и кальмодулина, в частности киназу легкой цепи миозина и сАМРФДЭ мозга, в концентрации  $10^{-9}$ — $10^{-12}$  М, проливает свет на наиболее общие фундаментальные свойства тимозинов  $\beta$ - и  $\alpha$ -группы на метаболизм клетки.

Полученные данные свидетельствуют о том, что тимозины, в частности  $\beta$ -группы (Т $\beta_4$ , Т $\beta_4$  1—39, Т $\alpha_1$ ) являются уникальными внутриклеточными регуляторами активности кальмодулинзависимых ферментов, принимающих участие в процессах фосфорилирования и дефосфорилирования белков и ферментов в цикле сокращения и релаксации гладких мышц, полимеризации и деполимеризации актина, во многих физиологических процессах мозга и т. д.

## 1. Структура и фракция тимозинов

Тимозины впервые были выделены в 1975 г. из тимуса животных и человека в лаборатории Goldstein [1] как полипептиды с регуляторными свойствами в отношении активности Т-лимфоцитов, включая Т-Helper и Т-Suppressor. Ноорег и соавт. [1] обнаружили во фракции 5 пептидных подфракций, выдерживающих обработку при 80° и оказывающих регулирующее влияние на иммунные системы организма. В



полипептида дополнительно дипептида Ala-Lys-OH. Т<sub>β1</sub>-подобные пептиды (вероятно, и другие) были обнаружены у илекопитающих [14, 15]. В частности, в мозгу крупного рогатого скота нами открыт Т<sub>β4</sub> (1—39)), свидетельствующий о наличии ряда структурных аналогов Т<sub>β4</sub> (табл. 1).

Таблица 1

Аминокислотная последовательность тимозина β<sub>1</sub> и тимозина β<sub>1</sub>-подобных пептидов

Тимозин β <sub>1</sub>	5 SDK PDM A E I E K F D K S K L K K T E T Q E K N P L P S	11 K E T I E Q E K Q A G E S	30 39	43
Т <sub>β1</sub> (1—39)	С-модули 3			39
β <sub>4</sub> <sup>Ala</sup> блокированный	A			43
β <sub>9</sub> ацетил	A	I G NS A	T T S E I S	41
β <sub>10</sub> блокированный	A	G C A S A	T T S E I S	42
β <sub>10</sub> блокированный	R	G A S A	T T R S E T S	43

Примечание. Показаны только те тимозин β<sub>1</sub>-подобные пептиды, которые отличаются по аминокислотной последовательности тимозина.

Таким образом, первичная структура Т<sub>β4</sub> отличается от таковой Т<sub>β9</sub> и Т<sub>β10</sub> по следующим показателям: N-концевыми аминокислотами в первом положении Т<sub>β4</sub>, Т<sub>β9</sub> и Т<sub>β10</sub> являются Ser, Ala, Ala соответственно, в 7-м—Ala, Gly, а в 10-м Glu, Asn. В положении же 6 Т<sub>β4</sub> и Т<sub>β10</sub> содержит Met вместо Leu в структуре Т<sub>β4</sub>. Т<sub>β1</sub> и Т<sub>β9</sub> были выделены из тимуса теленка, а Т<sub>β4</sub><sup>Ala</sup> и β<sub>10</sub><sup>Ala</sup> из селезенки кролика.

Все β<sub>1</sub>-подобные пептиды, за исключением Т<sub>β9</sub>, в котором отсутствует Met-остаток, содержат один метионинный остаток; не исключено, что в условиях *in vivo* может существовать и сульфоксидная форма пептида. Изучение Т<sub>β4</sub> в 9 различных тканях возрастных групп белых крыс [13] позволило выявить наибольшую степень его концентрации—733 мкг/г в селезенке и наименьшую в мышце—6—9 мкг/г (табл. 2).

Таблица 2

Концентрация Т<sub>β4</sub> в различных тканях мкг/г ткани у крыс 6-, 60- и 200-дневного возраста

Ткань	Возраст (дни)		
	6	60	200
Селезенка	195±7	452±14	733±36
Тимус	153±12	285±36	
Семенник	208±9	49,2±4,2	44,0±3,1
Легкие	169±11	116±7	202±10
Почки	136±10	597±4,7	81,6±4,2
Мозг	111±7	82,5±2,7	65,8±5,7
Печень	81,7±5,6	86,7±4,0	108±8
Сердца	39,7±4,2	28,5±2,7	25,2±1,1
Мышца	20,2±2,6	11,1±0,7	6,9±0,9





Как видно из табл. 2, содержание иммунореактивного Т $\beta_4$ , находящегося в телах клеток галактоцеребропозитивных олигодентроцитов вокруг миелиновой оболочки мозга составляет в мозгу 6-, 60- и 200-дневных крыс 111, 82 и 65 мкг/г ткани соответственно; Т $\beta_4$  принимает важное участие в процессах регуляции иммунных процессов, демиелинизации, вызванной активацией антигенактивируемых макрофагов [25]. Миелин, тела нейронов, аксоны и астроциты не реагируют с антитимозином  $\beta_4$ .

Окрашивание Т $\beta_4$ -позитивных олигодентроцитов происходит в цитоплазме и это совпадает с окраской основного белка миелина—олигодентроцитов мозга новорожденных. Накоплен значительный материал, свидетельствующий о двусторонних связях ЦНС и иммунной системы. Опиоидные пептиды, АКТГ, Т $\beta_5$  фракции и др., продуцируемые лимфоцитами, могут функционировать в иммуномодуляторных нейроэндокринных процессах.

Т $\alpha_1$  и Т $\beta_4$ , лимфокины, аналог АКТГ, Т $\beta_5$  и  $\beta$ -эндорфины, интерлейкин 1, интерферон, как и другие лимфокинины и цитокинины, являются иммуотрансмиттерами, синтезирующимися преимущественно клетками иммунной системы и превращающими специфические сигналы и информацию к нейронам и другим типам клеток.

Доказательством того, что определенные тимозиновые пептиды могут служить иммуотрансмиттерами, являются данные об их участии в модулировании гипоталамо-гипофизарной-адреналовой системы [26]. Т $\beta_4$ , но не Т $\alpha_1$ , оказывает стимулирующее воздействие на процесс секреции LH-RH из медио-базального гипоталамуса крыс [27]. Это свидетельствует о потенциальной роли пептидов тимуса (а по нашим данным, и гипоталамуса) в ренеративной функции. Наличие Т $\beta_{10}$  продемонстрировано и в развивающемся человеческом мозгу с очевидным участием ретиноловой кислоты как регулятора активности человеческого Т $\beta_{10}$  в нейробластоме [28]. Имеются указания о влиянии тимозина и  $\beta$ -актинина на латерализацию сенсомоторного контроля у крыс [29] и локализации Т $\alpha_1$  [30] в астроцитах человеческого мозга. Присутствие Т $\beta_4$  [31] установлено в нормальном человеческом мозгу, лимфоидных клетках и в олигодентронитах. Его взаимоотношение с нейроэндокринной системой показано Hall и Goldstein [32], причем человеческий эмбриональный мозг экспрессирует высокие уровни полипептидов, идентифицированных методами белковой биохимии и клонированием Т $\beta_{10}$ . Спустя 18 месяцев после рождения в человеческом мозгу отмечается падение содержания Т $\beta_{10}$  до неопределенного уровня, что объясняется атакой гена Т $\beta_{10}$  в развивающемся мозгу. В развивающемся мозгу новорожденных уровень протимозина  $\alpha$  и РНК приблизительно в 8 раз превосходит его содержание в зрелом мозгу [33]. Тем не менее до сих пор остаются не выделенными и не охарактеризованными тимозины из мозга различных животных и человека. Имеющиеся в литературе сведения касаются радиоиммунохимически опре-

данных форм тимозина, главным образом,  $\alpha_1$  и  $\beta_4$  в олигодентроцитах. С другой стороны, информация относительно тимозинов в гипоталамусе и, особенно  $\text{Т}\beta_4$ , полностью отсутствует, хотя имеются данные, что [29] под влиянием тимозина обнаруживаются определенные изменения активности вентромедиальной области гипоталамуса.

Участие нейроэндокринной системы, и, главным образом, нейропептидов, в регуляции иммунной системы не вызывает сомнений, регуляция этого сложного процесса осуществляется как на уровне тимуса, где в основном образуются различные тимозины, так и макрофагов ( $\beta$ -клеток, селезенки, лимфоидных узлов и т. д.), где происходит биосинтез интерлейкина—1,  $\text{Т}\beta_4$  и др. ингибиторов или стимуляторов цитокинов и прочих факторов. Несмотря на это, роль тимозинов в самой ИС пока во многом остается невыясненной.

В литературе накоплен значительный материал, свидетельствующий о нейроэндокринной функции тимуса [34], клетки которого, согласно эмбриологическим исследованиям, являются образованиями эктодермального происхождения, образующимися из нервного креста и мигрирующими в примитивный эктодермальный рудимент этого органа. Они принимают участие, главным образом, в формировании мезенхимы тимуса, эпителиальная часть которого также образуется из нервного креста [35]. По данным Green и соавт. [34], человеческий тимус является местом синтеза в большом количестве вазопрессина и окситоцина, обладающих интерлейкин-2-подобными свойствами, а в эквимолярных количествах—нейрофиззинов, являющихся их предшественниками. Стало известно количество иРНК для этих полипептидов в самом тимусе. Активированные лимфоциты способны продуцировать АКТГ,  $\beta$ -эндорфин и другие активные соединения. Анатомическая связь тимуса с центральными структурами осуществляется посредством парасимпатических волокон, берущих свое начало из ядер вагуса и заканчивающихся в стволе мозга, а также симпатических волокон, идущих из г. *Stellatum* и других ганглиев в грудной цепи.

Подобно другим нейросекреторным клеткам, нейроэндокринные клетки тимуса трансформируют нервный импульс в секрецию нейропептидов, действующих на дифференциацию или пролиферацию Т-лимфоцитов и модулирующих образование лимфокинов типа  $\gamma$ -интерферона, или гормонов, подобных АКТГ и  $\beta$ -эндорфину, принимая таким образом важное участие в формировании адаптационной функции организма. Основные функциональные назначения иммунной системы в значительной степени обуславливаются согласованными эффектами В-клеток (продуцирующих антитела) и Т-клеток.

Последние дифференцируются под регулирующим влиянием эпителиальных клеток тимуса, часть которых, как уже отмечалось, имеет нервное происхождение и действует или прямо (как цитотоксические Т-лимфоциты), или опосредованно через растворимые факторы, известные как лимфокины, являющиеся медиаторами, активирующими различные типы клеток, в частности моноциты и макрофаги, осуществляя взаимодействие между ними. Коммуникация между лейкоцитами

реализуется посредством интерлейкинов при активном включении в эти процессы дифференциации Т-клеток эпителия тимуса, а также участие нескольких гормонов, в том числе тимостина и тимуллина. Первый из них является пептидом с 49-ю аминокислотными остатками, 5 из которых обладают наибольшей степенью активности. Вторым принадлежит к металлопептидам с 9-ю аминокислотными остатками, реализующими процесс нейрональной дифференциации [36].

Центральная роль пептидов в нервах, нейроэндокринных клетках и нейронах, а также в модуляции гематологических и иммунологических функций показана как в опытах *in vitro* на модельных экспериментальных животных, так и у людей [37]. Механизм действия нейропептидов на лейкоциты осуществляется как прямым, так и косвенным путем через выделение иммуоактивных медиаторов и других эффекторов, вызванных неиммунными клетками. Наличие пептидергических нервных волокон и нейроэндокринных клеток в лимфоидной ткани, связанной с мукозой, свидетельствует о потенциальных структурных связях между нервной и иммунной системами [38—40], о чем, в частности, говорит факт обнаружения рецепторов определенных нейропептидов в различных типах иммунных клеток [41]. Примечательно установление присутствия большого количества транскрипта  $T\beta_4$  в отделах мозга, лишенных лимфоцитов. В кишечнике же, содержащем незначительное количество этих элементов крови, наоборот, регистрируется низкий уровень  $T\beta_4$  и иРНК. Наконец,  $T\beta_4$  синтезируется в миоцитах и фибробластах [16].

#### *Тимозины как новый класс активаторов $Ca^{2+}$ -кальмодулин-зависимых ферментов*

Некоторые коронаросуживающие полипептиды, выделенные нами из гипоталамуса, в частности С-модулины (СМ), выступают в качестве стимуляторов базальной активности ряда кальмодулин (КМ)-зависимых ферментов, таких как ФДЭ сАМР, киназа легкой цепи миозина (КЛЦМ), КМ-зависимая протеникиназа, фосфорилаза киназы. Имеется определенное сходство между стимулирующими эффектами С-модулина и КМ с той разницей, что для активирующего действия СМ на деятельность ферментов не требуется участия  $Ca^{2+}$  и КМ с отмеченной целью. Нами разработан метод очистки СМ из состава низкомолекулярных соединений гипоталамуса [42] и достигнута расшифровка первичной структуры одного из СМ [43]. Показана идентичность этого вещества с М, 4618,96 Д с  $T\beta_4$  (1—39). Было предпринято изучение эффекта нативного СМ-3 на активность КЛЦМ скелетной мышцы в сравнении с влиянием  $T\alpha_1$  и фрагмента  $\beta_4$  (16—38). Согласно полученным результатам, все они оказались  $Ca^{2+}$ -независимыми мощными стимуляторами КЛЦМ, причем наибольшей активностью обладает нативный СМ, затем в нисходящей последовательности фрагмент  $T\beta_4$  (16—38),  $КМ + Ca^{2+} > T\alpha_1$ . Активирующие концентрации для СМ-3,  $T\beta_4$  (16—38), а также  $КМ + Ca^{2+}$  составляют  $10^{-12}$  М, а  $T\alpha_1$ — $10^{-9}$  М.

Несмотря на существование определенной научной информации относительно  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимого взаимодействия КМ с пептидами и ферментами-мишенями, его физиологическое значение остается пока мало изученным. Возникает вопрос: является ли КМ единственным белковым регулятором активности ряда ферментов, катализирующих реакции тканевого метаболизма у эукариот, включая процессы мышечного сокращения, деление клеток, обмен циклических нуклеотидов и гликогена, сопровождающиеся изменениями внутриклеточной концентрации  $\text{Ca}^{2+}$ . В связи с этим нами установлено наличие новой группы пептидов в виде  $\text{Ca}^{2+}$ -независимых регуляторов КМ-зависимых ферментов. Эффект их влияния оказывается качественно отличающимся от характера действия некоторых фосфолипидов, жирных кислот и пептидов, не требующих присутствия  $\text{Ca}^{2+}$  для проявления своего влияния на активность фермента. Проведенные наблюдения склоняют нас к мысли о причастности СМ к системе универсальных  $\text{Ca}^{2+}$ -независимых регуляторов активности ферментов. Раскрытие их первичной структуры дает возможность пересмотра механизмов регуляции КМ-зависимых ферментов, свидетельствуя тем самым о существовании нового уровня регуляции активности ферментов. Методы выделения СМ, миозина, определения активности КЛЦМ и КМ в последнее время нашли свое достаточно обстоятельное описание [43—48]. Нами было показано существование в гипоталамусе трех основных пептидов:  $\text{Ca}^{2+}$ -КМ-независимых активаторов КМ-зависимых ферментов (СМ), названных соответственно С<sub>1</sub>, С<sub>2</sub> и С<sub>3</sub> (рис. 1) и после рехроматографии последней фракции было получено индивидуальное вещество, подвергнутое секвенированию (рис. 2). Как выясняется, СМ-3 лишен свободной  $\text{NH}_2$ -группы, а методом лазерного масс-спектрального анализа установлена его величина  $M_r$ , равная 46189 Д. Изучение аминокислотного состава кислотного гидролизата СМ, согласно данным табл. 3, позволило обнаружить в нем присутствие 9 остатков лизина, а также 10 остатков: Glx, Glu и Gln, что, на наш взгляд, является величиной достаточно значительной. Вместе с тем, удалось доказать полное отсутствие в гидролизате валина, чем и обусловлено отличие R-1 от R-2 (СМ-3), а также гистидина, триптофана, аргинина и тирозина. Для определения аминокислотной последовательности белка с закрытым концом и получения пептидной карты был проведен частичный трипсиновый гидролиз, не давший однако желаемого результата. В связи с этим мы предпочли прибегнуть к протеолизу с помощью эндолизина С, вызывающего избирательное расщепление субстрата в местах локализации остатков лизина.

После гидролиза эндолизином С из СМ-3 фракции имеет место образование приблизительно 14 фрагментов. Под влиянием эндолизина С образуется ряд пептидных фрагментов, в том числе, как и следовало ожидать, и полипептида, N-конец которого был заблокирован ацетилированием. Некоторые из них были нами идентифицированы при использовании методов масс-спектрального анализа и микросеквенирования.

Как было отмечено, удалось разделить 14 пептидов после протолиза эндוליзином С. Благодаря электронному масс-спектральному анализу удалось показать величины  $M_r$  интактного полипептида (СМ-3), а также его фрагментов, в том числе 1 и 8 фракций (табл. 4). Наиболее интенсивный пик, полученный хроматографически с  $M_r$ , равной 13029 Д (рис. 1), соответствует I—II участкам тимозина со следующей структурой:

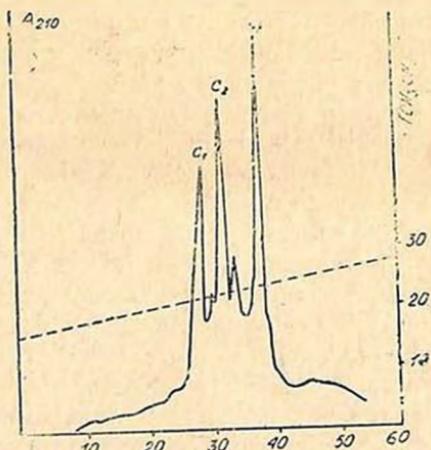
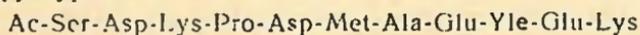


Рис. 1. Очистка С-модулинов ВЭЖХ фракции из II пика лиофилизирована, остаток растворяли в буфере А и проводили обращенно-фазовую ВЭЖХ. Элюция градиентная

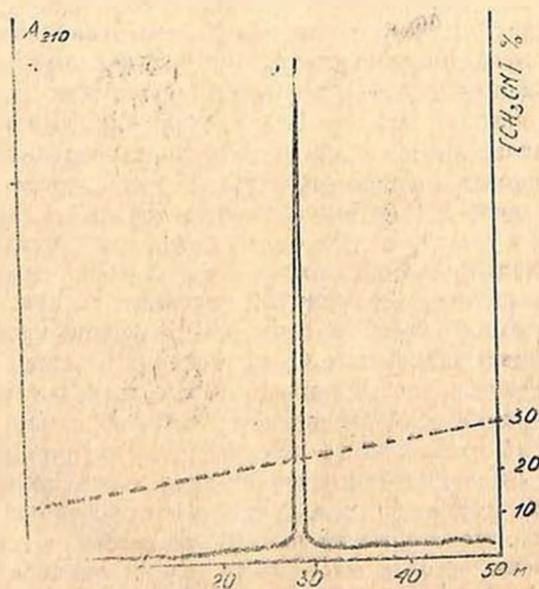


Рис. 2. Рехроматография  $C_3$  на обращенно-фазовой ВЭЖХ

Он не подвергается секвенированию из-за ацетилированности N-конца. Что касается второго пика с  $M_r$  654,8 Д, то, по нашим данным, он соответствует участку 26—31 Т $\beta_4$ .

Таблица 3  
Аминокислотный анализ С-модуля 3

Аминокислота	нономоль	Теоретический для Т $\beta_4$ (1—39)
Asx	4,1	4
Thr	2—8	3
Ser	3,2	3
Glx	9,3	10
Pro	3,0	3
Gly	1,9	0
Ala	1,9	1
Val	0—0	0
Met	0—6	1
Ile	1,8	2
Leu	2,3	2
Tyr	0,2	0
Phe	1,1	1
His	0,4	0
Lys	7,7	9
Trp	0,0	0
Arg	7,0	0

По нашим данным, массы фрагментов 1 и 8 соответствуют массам, рассчитанным по аминокислотной последовательности, которую удалось определить для фрагмента с  $M_r$  655,4 (табл. 4), секвенирование которого показано наличием пентапептида (табл. 5). Согласно компьютерным данным, эти участки находятся в Т $\beta_4$  быка. Суммируя информацию по полученным показателям (величине  $M_r$ , аминокислотному составу, пептидной карте, а также вышеуказанным участкам последовательности аминокислот), можно прийти к заключению об идентичности выделенного нами СМ-3 с Т $\beta_4$  (1—39) быка. Окончательное решение этого вопроса требовало проведения специального сравнения биологических активностей нативного СМ-3 и тимозина, для чего были использованы синтетические фрагменты Т $\beta_4$  (16—38) быка.

$H_2N$ -Lys-Leu-Lys-Thr-Glu-Thr-Gln-Glu-Lys-Asn-Pro-Leu-Pro-Ser-Lys-Glu-Thr-Ile-Glu-Gln-Glu-Lys-OH-Lys-Asn-Pro-Leu-Pro-Ser-Lys и Т $\alpha_1$  теленка.

Таблица 4  
Масс-спектральные данные образца СМ-3 и его фрагментов

Образец	$M_r$ (обнаруженная)	$M_r$ (подсчитанная)	Структура
Интактный СМ-3	4618,9 Д	4619,2 Д	Т $\beta_4$ (1—39)
Фрагмент 1	1303,9 Д	1304,6 Д	Т $\beta_4$ (1—11)
Фрагмент 8	655,8 Д	655,4 Д	Т $\beta_4$ (26—31)

*Примечание.* Образцы были секвенированы на газо-фазном микросеквестраторе, сконструированном в City of Hope (США) [49] и приспособленном к проточному реактору [50]. Фенилтиогидантроны аминокислоты анализированы на обращенной фазе ВЖЭХ, данные определяли на приборе „Perkin—Elmer LSM“ (США) [50].

Таблица 5

Эдмановское микросеквенирование пептида фрагмента 8  
после деградации эндолизиним С-модулина 3

Цикл	Аминокислотный остаток	Выход (нмоль)
1	Asn	9,7
2	Pro	3,9
3	Leu	5,1
4	Pro	5,9
5	Ser	1,2

*Действие Т<sub>3</sub> (1—39) (нативного) фрагмента Т<sub>β</sub> (16—33)  
и α<sub>1</sub> на активность КЛЦМ*

Как уже отмечалось, СМ выступают в роли мощных стимуляторов ряда Са<sup>2+</sup>-кальмодулин-активируемых ферментов—ФДЭ сАМР, КЛЦМ, протеникиназа, фосфорилаза киназа 5 нуклеотидаза и т. д. без участия Са<sup>2+</sup> и КМ. В настоящем исследовании нами изучены эффекты вышеуказанных полипептидов на КЛЦМ и ФДЭ сАМР.

Гомогенный С<sub>3</sub> (Т<sub>β</sub> 1—39) как фракция, полученная ВЭЖХ, обладает мощным стимулирующим действием на КЛЦМ скелетных мышц [43].

При электрофорезе миозина (на 8 М мочевины) на 10%-ных акриламидных гелях фосфорилированные и не фосфорилированные легкие цепи миозина хорошо разделяются. КЛЦМ, элюированная через КМ-сефарозу, не обладает ферментативной активностью в отсутствие КМ и даже при наличии избытка Са<sup>2+</sup>, что свидетельствует об отсутствии в препаратах КЛЦМ эндогенного КМ. При этих условиях не происходит фосфорилирования ЛЦ<sub>2</sub>. Однако наблюдалась противоположная картина при добавлении С<sub>3</sub>, Т<sub>β</sub> (16—38) или Та<sub>1</sub> в отсутствие экзогенного КМ [43] (рис. 3).

В отличие от КМ, указанные эффекты не требуют присутствия Са<sup>2+</sup> для активации фермента. При добавлении в инкубационную смесь 10 М СаСl<sub>2</sub> или 10<sup>-4</sup> М ЭДТА отмечалось повторение тех же результатов. При этом СМ-3 выступает в роли сильного активатора базальной активности КЛЦМ. Были использованы также синтезированные в нашей лаборатории фрагменты СМ Т<sub>β</sub> (11—19, 25—31), фрагменты 5 и 3 лизинового остатка соответственно. Примечательно, что все употребляемые эффекторы обладали в различной степени сильно стимулирующим влиянием на базальную активность этого фермента. Учитывая, что под влиянием эндолизина С происходит образование ряда пептидов, можно предположить важность значения последних в регуляции КЛЦМ, ФДЭ сАМР и т. д. Известна роль КМ, являющегося Са<sup>2+</sup>-связывающим рецепторным белком-активатором ряда ферментов [51, 52], однако пока не ясно, является ли он единственным белком,

наделенным универсальным свойством воздействия на активность ферментов в присутствии  $\text{Ca}^{2+}$ .

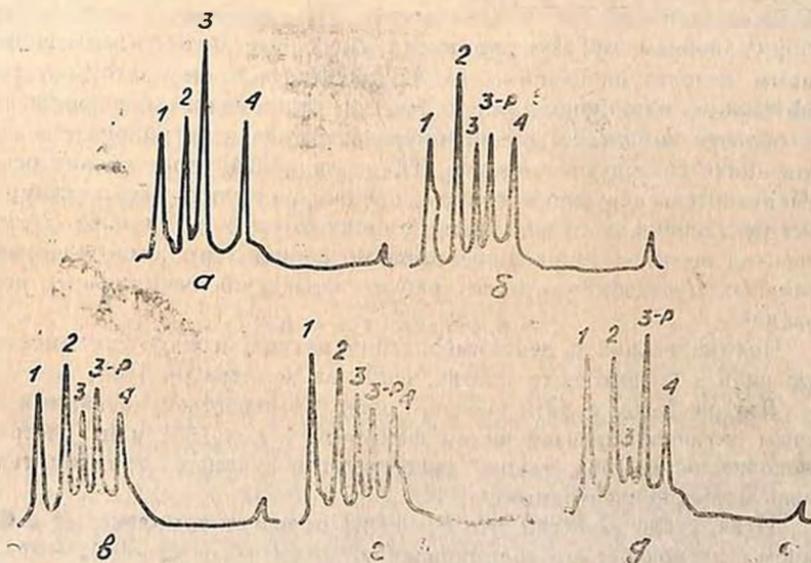


Рис. 3. Фосфорилирование ЛЦ<sub>2</sub> соответствующие: а) парам а. Миозин инкубировали с КЛЦМ, как указано в методах, в отсутствие (а, в, г, д) или в присутствии (б) кальмодулина. Инкубационная смесь: а—без эф-фектора, в—с  $\text{T}\beta_3^{16-38}$ , г—с  $\text{T}\alpha_1$ , д—с  $\text{СМ}_3$  в концентрациях по 50 нмоль. 1—тяжелые цепи миозина скелетной мышцы, 2—щелочные легкие цепи (ЛЦ<sub>1</sub>), 3—легкие цепи миозина (ЛЦ<sub>2</sub>), p—фосфорилированные легкие цепи миозина (ЛЦ<sub>2</sub>-P), f—щелочные легкие цепи (ЛЦ<sub>3</sub>)

СМ известны как уникальные регуляторы активности указанных ферментов в концентрации  $10^{-12}$  М, что является весьма важным доказательством как наличия системы дубликатов  $\text{Ca}^{2+}$ -КМ системы, так и нового уровня регуляции, когда содержание  $\text{Ca}^{2+}$  оказывается совершенно недостаточным для достижения эффекта насыщения КМ.

*Фундаментальность значения С-модулинов и тимозинов в обеспечении функционирования регуляторных механизмов в регуляции клеточного метаболизма*

Изолирование и расшифровка первичной структуры одного из СМ—уникального аллостерического регулятора  $\text{Ca}^{2+}$ -КМ-активируемых ферментов из гипоталамуса открывает новые горизонты изучения химии и биологии заменителей  $\text{Ca}^{2+}$ -КМ системы. Идентичность СМ с  $\text{T}\beta_4$  (1—39) позволяет совершенно по-новому объяснить биологические функции и молекулярные механизмы действия этих полипептидов.

Таким образом, впервые подчеркивается роль тимозинов в сокращении гладкой мускулатуры, а также в активации  $\text{Ca}^{2+}$ -КМ-зависимы-

ми ферментами без участия КМ. Saifer и соавт. [53] был выделен и идентифицирован фактор, предотвращающий полимеризацию G-актина человеческих тромбоцитов. Очищенный  $T\beta_4$  связывается стехиометрически G-актином, образуя комплекс, способный быть идентифицированным неденатурированным ПААГ электрофорезом. Авторы установили полную идентичность  $F_x$  с  $T\beta_4$ .  $T\beta_4$  функционально эквивалентен  $F_x$ , образуя комплекс 1:1 с мономерами актина и ингибируя его полимеризацию. По мнению авторов,  $T\beta_4$ , по крайней мере, служит основным активсеквенирующим белком, предположительно вызывающим эффект релаксации, хотя и в наших опытах *in vitro* и *in vivo* этот полипептид вызывал сокращение гладкой мускулатуры, выяснение молекулярных механизмов которого требует проведения специальных исследований.

Полимеризация и деполимеризация актина играют фундаментальную роль в подвижности клетки, включая хемотоксин [54].

Другой белок с антисеквенирующей активностью, названный мозговым актинполимеризирующим фактором у кур [55] или дестрин у млекопитающих [56], также существует в куриных тромбоцитах в очень малых концентрациях.

Итак, стало известно, что  $F_x$  [ $T\beta_4$ ] образует комплекс 1:1 с G-актином и ингибирует его полимеризацию.

По-видимому, при низкой концентрации ионов кальция происходит переключение  $Ca^{2+}$ -КМ пути регуляции активности кальмодулин-активируемых ферментов на С-модулиновый.

Учеными, открывшими и изучавшими химию и биологию тимозина опубликован ряд обзорных статей [57—72]. Задачей настоящего обзора было привлечь внимание к новым функциям и фундаментальным механизмам действия тимозина на кальмодулин-активируемые ферменты мозга и гладкой мускулатуры.

## ROLE OF THYMOSIN IN NERVE AND MUSCLE TISSUE

GALOYAN A. A.

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

It is more than for a quarter of century the primary structures of hormones of immune system are known, namely of thymosins family ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ -groups), which are stimulators of T-lymphocytes maturation—the main cellular elements of immune system.

Different thymosins were isolated from numerous kinds of animals, beginning from sea-urchin to mammals, nevertheless their general biological significance and molecular mechanisms are not known yet. It is known only that thymosin  $\beta_1$  stimulates the activity of deoxynucleotidyl transferase inhibiting the migration of peritoneal macrophages *in vitro* and *in vivo*, as well as the secretion of luteal phase and induces phenotypical changes of Molt—4 leucemic cell.

Discovery of C-modulin 3 in the hypothalamus ( $T\beta_1^{1-39}$ ) (which activates  $Ca^{2+}$ -calmodulin-dependent enzymes without  $Ca^{2+}$  and calmodulin participation, namely MLCK and cAMP PDE of brain in concentration  $10^{-9}$ — $10^{-12}$  M) illuminates more general fundamental properties of  $T\beta$  and  $T\alpha$  groups for cell metabolism.

The results obtained testify, that thymosins, namely  $\beta$ -groups ( $T\beta_1$ ,  $T\beta_1^{1-39}$ ,  $T\alpha_1$ ), are unique intracellular regulators of calmodulin-dependent enzymes activity, participating in the processes of phosphorylation and dephosphorylation of proteins and enzymes in the cycle of contraction and relaxation of smooth muscles, polymerization and depolymerization of actin in many physiological processes of brain, etc.

#### Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Hooper J. A., McDaniel M. C., Thurman G. B., Cohen G. H., Schulof R. S., Goldstein A. L. Ann. of New York Academy of Sci., v. 249. p. 125—144, 1975.
2. Spangelo B. L., Hall N. R., Goldstein A. L. Ann. of New York Academy of Sci. v. 496, p. 196—204, 1987.
3. Goldstein A. L., Low T. L. K., Matdoo M., McClure J., Thurman G. B., Rosio N., Lai C.—Y., Meinhoffer N. PNAS USA, v. 74, p. 725—729, 1977.
4. Low T. L. K., Goldstein A. L. J. Biol. Chem., v. 254. № 3, p. 987—995, 1979.
5. Low T. L. K., Hu S. K., Goldstein A. L. PNAS USA, v. 78, p. 1162—1166, 1981.
6. Naylor P. H., McClure J. E., Spangelo B. L., Low T. L. K., Goldstein A. L. Immunopharmacology, 7:9, 1984.
7. Hannappel E., Davous J. S., Horecker B. L. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, v. 79, p. 1708—1711, 1982.
8. Hannappel E., Kalbacher H., Voelter W. Arch. Biochem. Biophys., v. 260, p. 546—553, 1988.
9. Ericson-Viitanen S., Riggeri S., Natalina P., Horecker B. L. Arch. Biochem. Biophys., v. 225, p. 407—413, 1983.
10. Ericson-Viitanen S., Ruggiezi S., Natalini P., Horecker B. L. Anal. Biochem., v. 156, p. 390—399, 1983.
11. Shlessinger D. H., Goldstein G., Niall H. D. Biochemistry, v. 14, p. 2214—2218, 1975.
12. Goldstein G., Scheid M., Hammerlin U., Boyse E. A., Schlesinger D. H., Niall H. D. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, v. 72, p. 11—15, 1975.
13. Hannappel E. And. Biochem., v. 134, p. 390—396, 1950.
14. Hannappel E., Leibold W. Arch. Biochem. Biophys., v. 240, № 1, p. 236—241, 1985.
15. Comez-Marquez J., Mercedes D., Segade F. The J. of Immunology, v. 143, p. 2740—2744, 1989.
16. Goodall G. J., Morgan J. I., Horecker B. L. Arch. Biochem. Biophys., v. 221, p. 598, 1983.
17. Weller F. E., Mutchnick M. G., Goldstein A. L., Naylor P. H. J. Biol. Response Mod., 7: 91, 1988.
18. Low TLK, Hu S.—K., Goldstein A. L. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, v. 78, p. 1162—1166, 1981.
19. Makarova T., Grebenshikov N., Egorov C., Vartapetian A., Bogdanov A. FEBS Lett., v. 257, № 2, p. 247—250, 1989.
20. Wotts J. D., Cary P. D., Crane-Robinson C. FEBS Lett., v. 245, p. 17—20, 1989.
21. Eshenfeldt W. H., Manrow R. E., Krug M. S., Berger S. L. J. Biol. Chem. v. 264, p. 7546—7555, 1989.

22. Haritos A. A., Blacher R., Stein S., Carderella J., Harecker B. L. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, v. 82, p. 343-346, 1985.
23. Haritos A. A., Goodall G. J., Horecker B. L. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, v. 81 p. 1008-1011, 1984.
24. Wada S., Naylor P. H., Naylor C. W., Goldstein A. L. Thymus, 12 (4), p. 215-224, 1988.
25. Dalakas M. C., Trapp B. D. Ann. of Neurobiology, v. 19. № 4. p. 349-354. 1986.
26. Hall N. R., McGillic J. P., Spangelo B. L., Goldstein A. G. Immunol., v. 135, 2 suppl., p. 806-811, 1985.
27. Rebar R. W., Miyake A., Low T. L., Goldstein A. L. Science, v. 6. № 214. p. 669-671. 1981.
28. Hall A. K., Hempstad J., Morgan J. C. Mot. Brain, Res., v. 8, p. 129-135, 1990.
29. Добрынин В. П., Федин В. А., Обачевская И. Ю., Погосова Е. П., Непринцева Е. С. Бюл. Эксперим. биол. и мед., т. 108, № 8, с. 139-142, 1989.
30. Su Y. L., Ho K. L., Dalakas M. G. Ann. Neurol., v. 26. № 2. p. 277-280, 1989.
31. Dalakas M. C., Trapp B. D. Ann. Neurology, v. 19. (4). p. 349-355, 1986.
32. Hall N. R., Goldstein A. L., Lymphokine Res., v. 2 (1), p. 1-6, 1983.
33. Dosi M., Freire M., Gomez Marquez J. FEBS Lett., v. 269, № 2. p. 373-376, 1990.
34. Green V., Legros J. J., Francimont P., Defrense M. P., Boniver J., Ivell R., Kichter D. Ann. of New York Acad. Sci., v. 496, p. 56-66, 1987.
35. Le Douarin N. M., Joufreau F. V. Exp. Med., v. 142, p. 17-40, 1975.
36. Bach J. F. Hormones of the Immune System, 1989.
37. Pert C. B., Ruff M. R., Weber R. J., Herkenmaham M. J. Immunol., v. 132, p. 1601-1604, 1984.
38. Payan D. G., Levine J. D., Goetzl E. J. J. Immunol., v. 132, p. 1601-1604, 1984.
39. Felten D. L., Felten S. Y., Carlson S. L., Olschoka J. A., Livnat S. J. Immunol. v. 135, p. 756-765, 1985.
40. Angeletti R. H., Hickey W. F. Science, v. 230, p. 89-90, 1985.
41. Wiedermann C. J. Neuroimmunomodulation. N. H. Spector (ed. Gordon and Breuch).
42. Галоян А. А., Бобрускин И. Д., Гуриц Б. Я., Абрамя Г. Э. Нейрохимия, т. 8, с. 78-86, 1989.
43. Galoyan A. A., Gurbits B. Yu., Shu. a'oya I. A., Michael T., Davic John E., Shively Terry D. Lee. Neurochem. Res., v. 17, № 8, p. 773-777, 1992.
44. Stepkowski D., Szczensien D., Wrotck A., Kakob J. Biochem. et biophys. acta, v. 831, p. 321-329, 1985.
45. Adelstein R. S., Conti M. A., Harhawy D. R., Klee C. B. J. Biochem., v. 253, p. 8347-8350, 1978.
46. Morgan M., Perry S. V., Ottoway J. Biochem. J., v. 157, p. 687-697, 1976.
47. Perrie W. T., Perry S. V. Biochem. J., v. 119, p. 31-38, 1970.
48. Gopa'akrishna R., Anderson W. B. Biochem. Biophys. Res. Commun., v. 104, p. 830-835, 1982.
49. Hawke D. H., Harris D. E., Schively J. E. Anal. Biochem., v. 147, p. 315-330, 1985.
50. Schively J. E., Miller P., Ronk M. Anal. Biochem., v. 163, p. 517-529, 1987.
51. Cheung W. Y. Science, v. 207, p. 19-27, 1980.
52. Klee C. B., Crouch T. H., Richman P. G. Ann. Rev. Biochem., v. 49, p. 489-515, 1980.
53. Saffer D., Elzinga M., Nachmias V. T. J. Biol. Chem., v. 266. № 7, p. 4024-4052, 1991.
54. Bamburg J. R., Bray D. J. Cell. Biol., v. 105, p. 2817-2825, 1987.
55. Nishida E. Biochemistry, v. 24, p. 1160-1164, 1986.
56. Hannappel E. J. Anal. Biochemistry, v. 156, p. 390-396, 1986.

57. Erickson-Viitanen S., Ruggieri S., Natalini P., Horecker B. L. Arch. Biochem. and Biophys., v. 221, p. 570—576, 1983.
58. Wang S. S., Wang B. S. N., Chang J. K., Low T. L. K., Goldstein A. L. Int. J. Peptide Protein Res., v. 18, p. 413—415, 1981.
59. Low T. L. K., Hu S.-K., Goldstein A. L. Proc. Natl. Acad. Sci., USA, v. 78, p. 1167—1166, 1981.
60. Voelter W., Echner H., Kalbacher H., Dinh T. Q., Kapurniotu A., Jahan M., Gräßler G., Link P., Mihelič M., Stock W.—In: Peptides, 1986, (ed. D. Theodoropoulos), Walter de Gruyter, Berlin, New York, p. 581—584, 1987.
61. Grillon G., Rieger K., Bakala J., Schoot D., Morgat J.—L., Hannappel E., Voelter W., Lenfant M. FEBS, v. 274, p. 30—34, 1990.
62. Hannappel E., Davoust S., Horecker B. L. Proc. Natl. Acad. Sci., USA, v. 79, p. 1708—1711, 1982.
63. Hartos A. A., Calderatta J., Horecker B. L. Analytical Biochem., v. 144, p. 436—440, 1985.
64. Panneerselvam C., Clinton M., Wellner D., Horecker B. L., Biochem. and Biophys. Res. Commun., v. 155, p. 539, 1988.
65. Goldstein A. L., Low T. L. K., McAdoo M., McClure J., Thurman G. B., Rosio J. L., Lai C. W., Chang D., Wang S. S., Harvey C., Ramel A. H., Meirhofer J. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, v. 74, p. 725, 1977.
66. Hu S. K., Low T. L. K., Goldstein A. L. Mol. Cell. Biochem. v. 41, p. 49, 1981.
67. Kouttab N., Goldstein A. L., Lu M., Campbell B., Matzel A. A. Immunopharmacol., v. 16, p. 97, 1988.
68. Voelter W., Kapurniotu A. In: Studies in Natural Products Chemistry, v. 8, (ed. Atta-ur-Rahman), Elsevier Publishers, B. V., Amsterdam, p. 433—461, 1991.
69. Voelter W., Kalbacher H., Echner H., Schmid B., Treffer U., Schröder C. Z. Naturforsch., v. 45b, p. 1725—1728, 1990.
70. Gomez-Marquez J., Segade F., Dosil M., Pichel J. G., Bustelo X. R., Freire M. J. Biol. Chem., v. 264, p. 8451, 1989.
71. Conteas C. N., Mutchnick M. G., Palmer K. C., Weller F. E., Luk G. D., Naylor P. H., Erdos M. R., Goldstein A. L., Panneerselvam C., Horecker B. L. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, v. 87, p. 3269, 1990.
72. Galoyan A. A., Gürvits B. X., Shuvalova L. A., Davis M. T., Shively J. E., Lee T. D. Neurochemical Res., v. 7., p. 773—777, 1992.

Посрупула 15, V, 1992