УДК 577.112.6:547.963

ГЕМОГЛОБИН—ПРЕДШЕСТВЕННИК КОРОНАРОСУЖИВАЮЩИХ ПЕПТИДНЫХ ФАКТОРОВ

БАРХУДАРЯН Н. А., *КЕЛЛЕРМАН Н., *ЛОТШПАЙХ Ф., ГАЛОЯН А.А.

Институт биохимии им. Г. Х. Буниатяна АН Армении, Ереван
*Институт биохимии им. Макс-Планка, Мюнхен

Исследованы свойства синтетических пептидов – VVYPWT, LVVYPWT, LVVYPWTQ, LVVYPWTQRF, полученных методом твердофазного синтеза на основе изученной первичной структуры гипоталамических коронаросуживающих пептидных факторов, 3 из которых, как было установлено нами, оказались фрагментами 33-37, 33—38 и 32—38 β-цепи гемоглобина. Исследуя воздействия синтетических пептидов на тест-системы, специфичные для нативных коронаросуживающих пептидных факторов, обнаружили идентичность свойств синтетических и нативных пептидов. Обсуждается вопрос об образовании коронаросуживающих пептидных факторов в условиях *in vivo*.

В 1988 г. мы сообщили о выделении и очистке 5 коронаросуживающих пептидных факторов ($ПФ_{1-5}$) из гипоталамуса крупного рогатого скота [1]. Нами было установлено, что $ПФ_{1-5}$ вызывают Ca^{2+}-независимую активацию ряда Ca^{2+}-кальмодулинзависимых ферментов [2—4], таких как киназа легких цепей миозина (КЛЦМ), кальмодулинчувствительная ФДЭ cAMP, путем Ca^{2+}-независимого связывания с кальмодулином [5—7]. Было выдвинуто предположение, что $ПФ_{1-5}$ являются аллостерическими регуляторами кальмодулина, приводящими его структуру, в зависимости от своей концентрации, в различные активные конформационные состояния [5—6]. Дальнейшие исследования показали, что $ПФ_{1-5}$ стимулируют процесс агрегации тромбоцитов (от 25 до 30%) и сокращение изолированной аорты кролика (от 20 до 25%) [2, 3]. Стимуляция обоих этих процессов связана с активацией КЛЦМ комплексом кальмодулин—ПФ [4]. В данном случае $ПФ_{1-5}$ выполняют функцию ионов кальция, являясь, по-видимому, его эндогенными заменителями. На основании полученных данных мы пришли к заключению, что коронаросуживающие пептидные факторы гипоталамуса можно причислить к числу Ca^{2+}-независимых регуляторов в клетке, которые, возможно, и в условиях *in vivo* могут принимать участие в регуляции активности КЛЦМ, ФДЭ cAMP и, вероятно, других Ca^{2+}-кальмодулинзависимых систем (при низком внутриклеточном уровне содержания Ca^{2+}).

В недавно проведенных исследованиях по выяснению первичной структуры $ПФ_{1-5}$ было обнаружено, что 3 из них являются фрагментами 33—37, 33—38 и 32—38 β-цепи гемоглобина [4, 8].

Интересно отметить, что в литературе имеются данные о том, что сама молекула гемоглобина обладает коронаросуживающими свойствами [9, 10]. Кроме того, оказалось, что еще в 1980 г. Чангом и соавт. [11] из гипоталамуса свиньи были выделены 2 пептида, которые являлись фрагментами 32—40 и 31—40 β-цепи гемоглобина. Однако биологическая активность этих пептидов не была установлена. Оказалось также, что геморфины—пептиды, полученные в результате протеолитического распада гемоглобина и обладающие сильными опиоидными свойствами, являются фрагментами 34—37 и 34—38 β-цепи гемоглобина [12].

На основании полученных нами данных, а также имеющейся в литературе информации было сделано предположение, что остальные 2 коронаросуживающих ПФ с невыясненной пока первичной структурой также являются фрагментами β-цепи гемоглобина, отличающиеся от структуры вышеуказанных коронаросуживающих ПФ лишь длиной пептидной цепи.

Для проверки указанного предположения, а также с целью исследования свойств синтетических пептидов (П), полученных согласно выявленной структуре нативных коронаросуживающих ПФ, были синтезированы 4 пептида, представляющие фрагменты 32—39 ($П_1$), 32—41 ($П_2$), 32—38 ($П_3$) и 33—38 ($П_4$) β-цепи гемоглобина.

Данная статья посвящена изучению воздействия синтетических пептидов на тест-системы, специфичные для нативных $ПФ_{1-5}$ с целью сравнения активности и механизма действия синтетических и нативных пептидов.

Материалы и методы

Коронаросуживающие пептидные факторы гипоталамуса выделяли по методу Галояна и соавт. [1].

Автоматический твердофазный синтез был осуществлен на синтезаторе «Applied Biosystems Model 430A», с использованием Fmoc-защитных групп [13].

Для определения образования иммунокомплекса кальмодулин-антитело был использован метод непрямого ферментзависимого иммуносорбентного анализа (ELISA) с некоторыми модификациями по методу Van Eldik и соавт. [14]. 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 влияния ПФ на образование иммунокомплекса ПФ вносили в лунки плат вместе с антителами. Использовали различные концентрации ПФ (от 0,8 мкМ до 1,6 нМ). 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 *о*-фенилендиамин) содержимое

лунок фиксировали добавлением 2 н. H_2SO_4 и измеряли поглощение при 492 нм.

Высокоочищенные препараты КЛЦМ получали по методу Dabrowska и соавт. [15—16] из желудков кур. Фосфорилирование легких цепей (ЛЦ) миозина гладкой мускулатуры желудка кур с M_r 20 кД проводили в течение 25 мин при 25° в инкубационной среде, содержащей 70 мкг очищенного миозина, 20 мМ фосфатного буфера, pH 8,0, 12,5 мМ $MgCl_2$, 0,1 мМ $CaCl_2$, 5 мМ АТР, 1,5 мкМ КЛЦМ и 4,5 мкМ кальмодулина. Включение фосфата в ЛЦ миозина регистрировали при электрофорезе в ПААГ в присутствии 8 М мочевины по методу Perrie и соавт. [17]. Относительное содержание фосфорилированных ЛЦ в миозине определяли при анализе денситограмм гелей электрофореза, окрашенных Кумасси R-250.

Количество белка определяли по методу Lowry и соавт. [18]. Эксперименты на изолированной аорте кролика проводили по методу Kanamori и соавт. [19].

Агрегацию тромбоцитов исследовали на агрегометре «Payton» (США) с использованием в качестве агреганта 5 мкМ ADP. Исследования проводили на крови здоровых доноров. Богатую тромбоцитами плазму получали центрифугированием крови при 2000 g в течение 10 мин по методу Born [20].

В работе были использованы следующие реактивы: АТР, ADP («Sigma», США), CNBr—активированная сефароза 4B, сефакрил S-300, сефадекс G-10, фенил-сефароза («Pharmacia», Швеция), $MgCl_2$, $CaCl_2$, ацетонитрил («Merck», ФРГ), ЭГТА, Кумасси R-250, акриламид, бисакриламид, TEMED, персульфат аммония, Dowex 50W×8 («Serva», ФРГ), остальные реактивы марок х.ч. и о.с.ч. («Союзхимреактив»).

Результаты и обсуждение

Одним из наиболее чувствительных тестов для $ПФ_{1-5}$ является их способность ингибировать образование иммунокомплекса кальмодулин-антитело путем Ca^{2+}-независимого связывания с кальмодулином [5—7]. Поэтому прежде всего было изучено влияние синтетических пептидов на образование иммунокомплекса кальмодулин-антитело с помощью метода ELISA.

На рис. 1 представлены данные относительно влияния нативных $ПФ_3$ и $ПФ_4$ и соответствующих им по структуре синтетических пептидов ($П_3$ и $П_4$), на образование иммунокомплекса. Как видно из рис. 1, $П_3$ и $П_4$ подобно $ПФ_3$ и $ПФ_4$ в значительной степени ингибируют образование иммунокомплекса. Концентрации, вызывающие 50%-ное ингибирование образования иммунокомплекса (I_{50}), равны 5,4; 12,8; 21,8; 33,4 нМ для $ПФ_3$, $ПФ_4$, $П_3$ и $П_4$ соответственно. Для $П_1$ и $П_2$ величины I_{50} были равны 24,6 и 29,5 нМ соответственно. Принимая во внимание тот факт, что для $ПФ_{1-5}$ величины I_{50} находятся в диапазоне концентраций от 2,5 до 31,6 нМ [5, 6], мы можем зак-

лючить, что синтетические пептиды обладают таким же сродством к кальмодулину, как и нативные. Тем не менее, нужно отметить, что $ПФ_3$ и $ПФ_4$ были несколько более активны, чем $П_3$ и $П_4$.

Как было указано выше, гипоталамические $ПФ_{1-5}$ вызывают Ca^{2+}-независимое активирование некоторых Ca^{2+}-кальмодулинзависимых ферментов [2—4]. В этом аспекте более детально нами было изучено воздействие $ПФ_{1-5}$ на активность КЛЦМ, выделенной из скелетной и гладкой мускулатуры. В частности, было установлено,

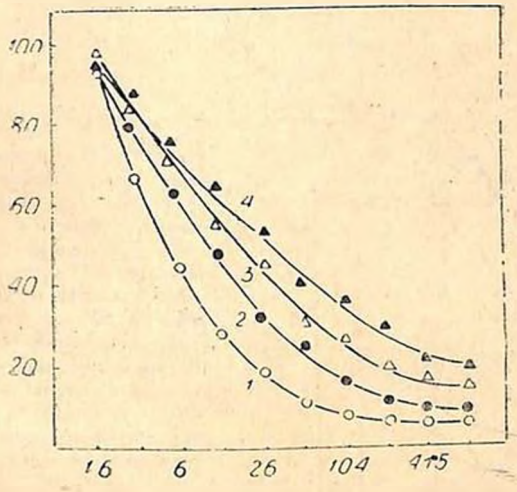

Рис. 1. Влияние нативных коронаросуживающих пептидных факторов ($ПФ_3$—1; $ПФ_4$—2) и синтетических пептидов ($П_3$—3; $П_4$—4) на образование иммунокомплекса кальмодулин-антитело. Кальмодулин был иммобилизован на платах в концентрации 2,5 мкг/мл, а антитела использовали в концентрации 7,5 мкг/мл. По оси абсцисс—концентрации пептидов в нМ. По оси ординат—% связывания антител с кальмодулином

что $ПФ_{1-5}$ осуществляют свое воздействие на активность КЛЦМ путем Ca^{2+}-независимого связывания с молекулой кальмодулина и образования комплекса кальмодулин-пептидный фактор, который, связываясь с каталитической субъединицей фермента, вызывает его активацию (от 30 до 100% для КЛЦМ скелетной мышцы и от 80 до 100% и более для КЛЦМ гладкой мускулатуры). С учетом этих данных представлялось целесообразным изучить воздействие синтетических пептидов на активность КЛЦМ.

Исследования показали, что синтетические пептиды, также как $ПФ_{1-5}$ вызывают Ca^{2+}-независимое активирование КЛЦМ гладкой мускулатуры от 80 до 100% (таблица), причем для проявления их

активирующего действия необходимо, как и в случае $ПФ_{1-5}$ обязательное наличие кальмодулина в инкубационной среде. Этот факт свидетельствовал о том, что механизм действия синтетических пептидов аналогичен механизму действия $ПФ_{1-5}$ на активность КЛЦМ: происходит Ca^{2+}-независимое связывание пептидов с молекулой кальмодулина и образование активного комплекса кальмодулин-пептид. В данном случае синтетические пептиды, как и $ПФ_{1-5}$ выполняют по-видимому, функцию ионов кальция.

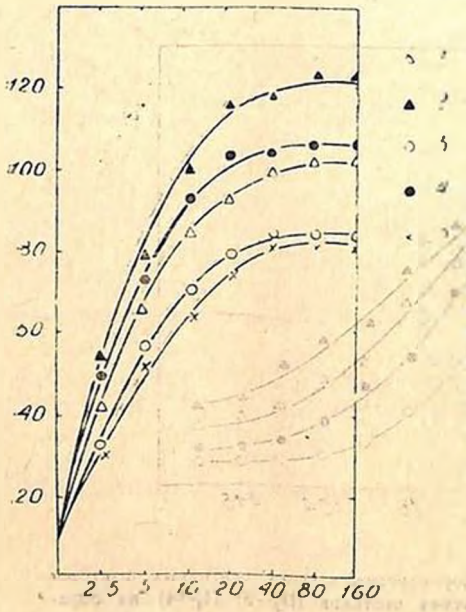

Рис. 2. Ca^{2+}-независимое активирование киназы легких цепей миозина (КЛЦМ) под воздействием пептидных факторов гипоталамуса ($ПФ_3$—1; $ПФ_4$—2) и синтетических пептидов ($П_3$—3; $П_4$—4; $П_2$—5). По оси абсцисс—концентрации пептидов в нМ, по оси ординат—относительная активность КЛЦМ в %. За 100%-ную активность фермента принимали такое его количество, которое вызывало в течение 25 мин при 25° фосфорилирование легких цепей миозина на 50%

Было изучено также воздействие различных концентраций $П_2$, $П_3$, $П_4$ и $ПФ_3$, $ПФ_4$ на активность КЛЦМ (рис. 2). Оказалось, что концентрации, необходимые для полумаксимальной активации КЛЦМ равны 3,9, 3,2, 2,7, 3,0, 2,6 нМ для $П_2$, $П_3$, $П_4$, $ПФ_3$, $ПФ_4$ соответственно. Полученные данные позволили заключить, что и в данном случае синтетические и нативные пептиды обладают почти одинаковой активностью.

Как было сказано выше, $ПФ_{1-5}$ (в концентрации 0,1 мкг/мл) стимулировали сокращение изолированной аорты кролика в K^+-деполяризующем растворе, содержащем 40 мМ KCl от 20 до 25%. $ПФ_{1-5}$ в той же дозе стимулировали также процесс агрегации тромбоцитов, вызванный 5 мкМ ADP от 25 до 30% [2, 3]. Проведенные эксперименты показали, что синтетические пептиды (в дозе 0,1 мкг/мл) стимулировали процесс сокращения изолированной аорты кролика в K^+-деполяризующем растворе (рис. 4) и процесс агре-

гации тромбоцитов, вызванный 5 мкМ ADP (рис. 5) почти в той же степени, что и $ПФ_{1-5}$. Известно, что такие антагонисты кальмодулина, как W-7 и его структурные аналоги в условиях *in vitro* ингибируют процесс агрегации тромбоцитов и обеспечивают релаксацию гладкой мускулатуры путем Ca^{2+}-зависимого связывания с кальмодулином, что в свою очередь ингибирует активность Ca^{2+}-кальмодулинзависимых систем и, в частности, активность КЛЦМ [21]. Синтетические пептиды, как и $ПФ_{1-5}$ стимулируют эти процессы, по-видимому, также путем связывания с молекулой кальмодулина, но Ca^{2+}-независимым способом, являясь, по существу, эндогенными заменителями Ca^{2+}.

Таблица

Активирование киназы легких цепей миозина (КЛЦМ), выделенной из гладкой мускулатуры желудка кур, под воздействием коронаросуживающих пептидных факторов гипоталамуса (ПФ) и синаптических пептидов ($П_1$, $П_2$, $П_3$, $П_4$)

Соединения	Относительная активность, %
Ca^{2+}	0
Ca^{2+} + кальмодулин	100
Ca^{2+} + П (1, 2, 3, 4, 5)	0
ЭГТА + кальмодулин	0
ЭГТА + кальмодулин + $ПФ_1$	100
ЭГТА + кальмодулин + $ПФ_3$	80
ЭГТА + кальмодулин + $ПФ_2$	100
ЭГТА + кальмодулин + $ПФ_4$	100
ЭГТА + кальмодулин + $ПФ_5$	85
Ca^{2+} + П (1, 2, 3, 4)	0
ЭГТА + кальмодулин + $П_1$	80
ЭГТА + кальмодулин + $П_2$	90
ЭГТА + кальмодулин + $П_3$	85
ЭГТА + кальмодулин + $П_4$	100

Примечание. Исследуемые соединения использовали в следующих концентрациях: кальмодулин—4,5 мкМ, $CaCl_2$—0,1 мМ, ЭГТА—1 мМ, КЛЦМ—1,5 мкМ, $ПФ_{1-5}$—0,05 мкМ, $П_{1-4}$ —0,05 мкМ. За 100%-ную активность фермента принимали такое количество КЛЦМ, которое вызывало в течение 25 мин при 25° фосфорилирование легких цепей миозина на 50%.

Таким образом, изучение воздействия синтетических пептидов на тест-системы, специфичные для нативных $ПФ_{1-5}$, показало, что синтетические пептиды обладают всеми свойствами нативных $ПФ_{1-5}$: активность синтетических пептидов во всех рассмотренных тестах была близка к активности нативных коронаросуживающих пептидов, а механизм их действия аналогичен механизму действия $ПФ_{1-5}$. Полученные результаты подтвердили наше предположение о том, что остальные два коронаросуживающих ПФ с невыясненной пока структурой также являются фрагментами β-цепи гемоглобина, отличающимися от структуры вышеуказанных коронаросуживающих ПФ лишь длиной пептидной цепи, и не исключено, что они представляют собой фрагменты 32—39 и 32—41 β-цепи гемоглобина.

Существует ли ПФ в условиях *in vivo* или они—артефакт и образуются в результате частичного аутолиза в ходе очистки. Мы

полагаем, что $ПФ_{1-5}$ существуют *in vivo* поскольку: 1—различное время хранения гипоталамуса в незамороженном состоянии после забоя животных (от 1 до 6 ч) не изменило существенно состав основных пиков в профиле хроматограмм после последней стадии очистки с использованием метода ВЭЖХ; 2—одни и те же пептиды были получены при использовании различных модификаций методов очистки. На примере проопиомеланокортина, который является предшественником β-липотропина, эндорфинов, β-МСГ, показано, что природа предпочитает синтезировать пептиды с разной биологической активностью в составе общего предшественника, из которого затем они образуются в результате ограниченного протеолиза. В частности, показано, что эндорфины образуются из β-липотропина под воздействием внутриклеточной протеиназы [22—24]. В этом случае ограни-

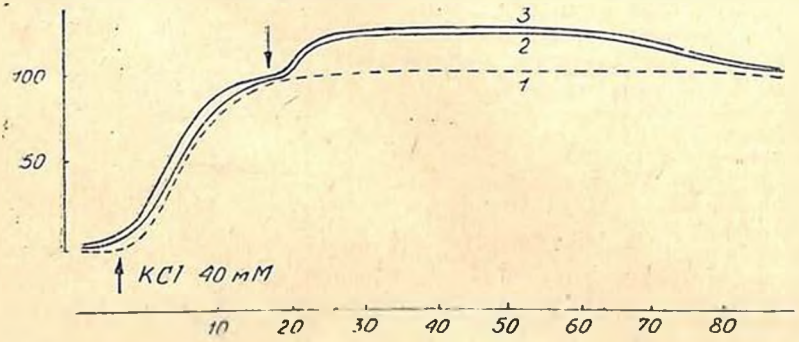

Рис. 3. Влияние пептидного фактора гипоталамуса ($ПФ_3$—3) и синтетического пептида ($П_3$—2) на сократительную способность изолированной аорты кролика в К+-деполяризующем растворе. По оси ординат—степень сокращения аорты в %. Максимальное сокращение, вызываемое 40 мМ KCl, принимали за 100%. Воздействие пептидов исследовали при достижении максимума сокращения. *1*—контроль, не содержащий пептидов

ченный протеолиз приводит к образованию соединений с новыми биологическими свойствами. Тот факт, что фрагмент 32—41 β-цепи гемоглобина содержит пептиды с разной биологической активностью (геморфины и коронаросуживающие ПФ), свидетельствует о том, что эти пептиды могут синтезироваться в мозгу в составе общего предшественника—гемоглобиноподобного белка и затем образоваться в результате ограниченного протеолиза этого белка при различных физиологических и патологических состояниях организма.

С другой стороны, поскольку гипоталамус принадлежит к тем участкам головного мозга [25—27], где ГЭБ наиболее уязвим и возможен свободный обмен биологически активными пептидами и гормонами между нервными окончаниями и кровью, не исключена возможность, что именно гемоглобин является предшественником этих пептидов, которые могут образоваться в результате его ограничен-

ного протеолиза также при различных физиологических и патологических состояниях организма и затем проникнуть в нервные клетки гипоталамуса и принять участие в метаболитических процессах нервной клетки.

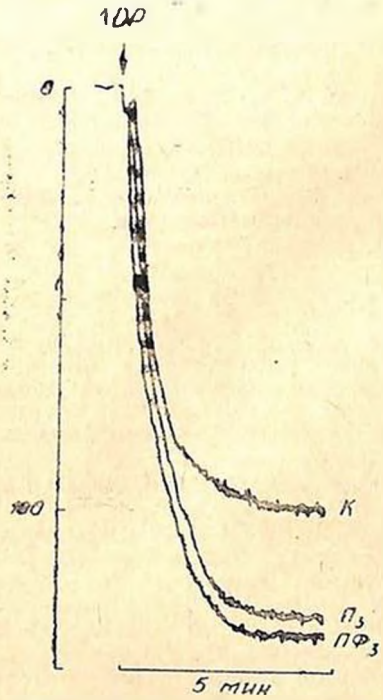

Рис. 4. Влияние коронаросужпвающего пептидного фактора ($ПФ_1$) и синтетического пептида ($П_3$) на степень агрегации тромбоцитов, вызванной 5 мкМ ADP. К—контроль, не содержащий пептидов. Тромбоциты были преинкубированы с пептидами (0,1 мкг/мл) при 37° в течение 3 мин в кювете агрегометра до стимуляции, вызванной 5 мкМ ADP. По оси ординат—степень агрегации тромбоцитов в %

Высказанные нами две различные точки зрения для объяснения присутствия $ПФ_{1-5}$ в ткани гипоталамуса являются лишь нашими предположениями и для четкого ответа на этот вопрос требуется проведение углубленных исследований в этом направлении.

HEMOGLOBIN, THE PRECURSOR OF CORONARO-CONSTRICTORY PEPTIDE FACTORS

BARKHUDARYAN N. A., *KELLERMANN J., *LOTTSPEICH F., GALOYAN A. A.

G. Ch. Bunyatyan Institute of Biochemistry, Academy of Sciences of the Armenia, Yerevan.

*Max-Planck Institute of Biochemistry, Munich

The properties of synthetic peptides—VVYPWT, LVVYPWT, LVVYPWTQ, LVVYPWTQRF (obtained by solid phase peptide synthesis on the basis of the revealed primary structure of hypothalamic coronaro-constrictory peptide factors) were investigated. It was established that 3 of coronaro-constrictory peptide factors represent fragments 33—37, 33—38, 32—38 of the β-chain of hemoglobin. Using test systems specific

for native coronaro-constrictory peptide factors the identify of the properties of synthetic peptides and native coronaro-constrictory peptide factors was established. The possibility of the formation of the hypothalamic coronaro-constrictory peptides in vivo are discussed.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Галоян А. А., Бархударян Н. А., Валко К., Закарян Т. Р.* Нейрохимия, т. 7, № 4, с. 519—524, 1988.
2. *Бархударян Н. А., Закарян Т. Р., Шувалова Л. А., Чаилян С. Г., Алексанян А. Р., Галоян А. А.* Нейрохимия, т. 8, № 4, с. 485—491, 1989.
3. *Barkhudaryan N., Zakaryan T., Aleksanyan A., Sharova N., Shuvalova L., Chailyan S., Galoyan A.* 8th ESN Meeting, Leipzig, p. 21, 1990.
4. *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.
5. *Бархударян Н. А., Хорват Л., Галоян А., Овади Ю.* Нейрохимия, т. 9, № 2, с. 188—195, 1990.
6. *Horvath L., Barkhudaryan N., Galoyan A., Ovadi J.* 20th Meeting FEBS, Budapest, Hungary, p. 27, 1990.
7. *Horvath L., Barkhudaryan N., Galoyan A., Ovadi J.* FEBS Lett. v. 276, № 1, 2, p. 197—200, 1990.
8. *Barkhudaryan N., Oberthuer W., Lottspeich F., Galoyan A.* Neurochemical Res., 1991 (in press).
9. *Vogel W. M., Dennis R. C., Cassidy G., Apstein C. S., Valeri C. R.* Am. J. Physiol., v. 251, p. H413—H420, 1986.
10. *Vogel W. M., L., Hsia J. C., Briggs L. Er S. S., Cassidy G., Apstein C. S., Valeri C. R.* Life Sci., v. 41, p. 89—93, 1987.
11. *Chang R. C., Huang W. Y., Redding T. W., Arimura A. A., Coy D. H., Shally A. V.* Biochim. et biophys. acta, v. 625, p. 256—263, 1980.
12. *Brantl V., Gramsch C., Lottspeihe F., Mertz R., Jaeger K.—H., Herz A.* Eur. J. Pharmacol., v. 125, p. 309—310, 1986.
13. *Meierhofer J. M., Waki E. P., Hermer T. J., Lambros R. C., Makofske C.—D. Chang R. C.* Int. J. Pept. Res. v. 13, p. 35—39, 1979.
14. *Van Eldik L. J., Watterson D. M.*—In: Calcium Physiology (ed. Marme D.)-Springer Berlin, p. 215—226, 1984.
15. *Dabrowska R., Aromatorio D., Sherry J. M. F., Hartshorne D. J.* Biochem. Biophys. Res. Commun., v. 78, p. 1263—1272, 1977.
16. *Dabrowska R., Sherry J. M. F., Aromatorio D., Hartshorne D. J.* Biochemistry, v. 17, p. 253—258, 1978.
17. *Perrie W. T., Perry S. V.* Biochem. J., v. 119, p. 31—38. 1979.
18. *Lowry O. H., Rosebrough H. J., Farr L. A., Randall C. I.* J. Biol. Chem. v. 193, p. 265—275. 1971.
19. *Kanamori M., Naka M., Asano M., Hidaka H.* J. Pharmac. Exper. Therap. v. 217, p. 494—499. 1981.
20. *Born G. V. R.* Nature, v. 194, p. 927—929, 1962.
21. *Hidaka H., Asano M., Tanaka T.* Mol. Pharmacol., v. 20, p. 571—578, 1981.
22. *Graf L., Kenessey A.* FEBS Lett., v. 69, p. 255—260, 1976.
23. *Graf L., Kenessey A., Berzetei I., Ronai A.* Biochim. Biophys. Res. Commun., v. 78, p. 1114—1123, 1977.
24. *Graf L., Kenessey A., Patty A., Grynbaum A., Mark N., Lajtha A.* Arch. Biochem. et biophys., v. 193, p. 101—109, 1979.
25. *Bouchaud C., Bosler O.* Int. Rev. Cytol., v. 105, p. 283—327, 1986.
26. *Leonhardi H.* In: Handbuch der Mikroskopischen Anatomie des Menschen (ed. A. Oksche), p. 177—606, Springer-Verlag, 1980.
27. *Risau W., Wolburg H.* TINS, v. 13, p. 174—178, 1990.

Поступила 20. I. 1991