

НОВЫЕ ДАННЫЕ О СВЯЗЫВАНИИ КОРОНАРОСУЖИВАЮЩИХ ПЕПТИДНЫХ ФАКТОРОВ ГИПОТАЛАМУСА С КАЛЬМОДУЛИНОМ

БАРХУДАРЯН Н. А., *ОРОС Ф., *ЛИЛИОМ К., БАРСЕГЯН К. С.,
*ОВАДИ Ю., ГАЛОЯН А. А.

Институт биохимии им. Г. Х. Бунятыана АН Армении, Ереван
*Институт энзимологии ВАН, Будапешт

Используя метод ферментзависимого иммуносорбентного анализа (ELISA), изучили взаимодействие коронаросуживающих пептидных факторов гипоталамуса (ПФ₁₋₅) с N- и C-концевыми триптических фрагментами кальмодулина (1-77 и 78-148). Обнаружено, что ПФ₁₋₅ связываются (аналогично трифторперазину и меллитину) как с N-, так и с C-концевыми доменами кальмодулина, обладая, однако, более высоким сродством к N-концевому домену. Определение величины кажущейся K_d для комплексов кальмодулин-ПФ ($K_d=2-10$ нМ), N-концевой фрагмент кальмодулина-ПФ ($K_d=15-100$ нМ), C-концевой фрагмент кальмодулина-ПФ ($K_d=300-1000$ нМ) показало, что ПФ₁₋₅ обладают наибольшим сродством к лативной молекуле кальмодулина. Этот факт позволил сделать предположение о существовании внутримолекулярного взаимодействия между N- и C-концевыми доменами кальмодулина при его связывании с ПФ₁₋₅. ПФ₁₋₅ являются, по-видимому, аллостерическими регуляторами кальмодулина, приводя его структуру в зависимости от своей концентрации в различные конформационные состояния.

Известно, что кальмодулин способен связывать различные соединения, отличающиеся как по структуре, так и по фармакологическим свойствам. К их числу относятся такие лекарственные соединения, как производные фенотиазина (трифторперазин, хлорпромазин и др.) [1, 2], некоторые алкалоиды (винбластин, винкристин) [3], антибиотики (адреаминин) [4]. Связывание этих веществ, так называемых антагонистов кальмодулина, препятствует его взаимодействию с различными кальмодулинзависимыми ферментами [5, 6] или модифицирует это взаимодействие [7].

Показано также, что кальмодулин способен Ca²⁺-зависимым способом связывать некоторые биологически активные пептиды и белки (АКТГ, β-эндорфин, вещество Р, гистоны, основной белок миелина и др.) [8-11]. Все эти соединения, в зависимости от их структуры, связываются с кальмодулином преимущественно через гидрофобные или ионные взаимодействия [12-13]. Хотя в настоящее время детально изучена структура кальмодулина и некоторых его антагонистов, нет достаточных знаний о механизмах взаимодействия каль-

модулина с его антагонистами. Тем не менее известно, например, что классический антагонист кальмодулина—трифторперазин (ТФП), а также меллитин (токсин, выделенный из пчелиного яда и состоящий из 26 аминокислотных остатков) связываются как с N-, так и с C-концевыми доменами кальмодулина [14, 15].

Ранее мы сообщили, что коронапаросуживающие пептидные факторы гипоталамуса (ПФ₁₋₅) [16] вызывают Ca²⁺-независимую активацию некоторых Ca²⁺-кальмодулинзависимых ферментов (киназа легких цепей миозина (КЛЦМ), кальмодулинчувствительная ФДЭ с АМР) путем Ca²⁺-независимого связывания с кальмодулином [17—19], что было показано с помощью метода непрямого ELISA [19]. Оказалось, что ПФ₁₋₅ ингибируют образование комплекса кальмодулин-антитело путем связывания с кальмодулином как в присутствии, так и в отсутствие Ca²⁺. На основании экспериментальных данных нами была выдвинута следующая гипотеза: связывание ПФ с кальмодулином вызывает конформационные изменения в его антигенном участке, расположенном в C-концевом домене кальмодулина (последовательность аминокислот 137—143) [19] в результате чего теряется чувствительность кальмодулина к антителам, что приводит к ингибированию образования иммунного комплекса.

В данной работе была предпринята попытка для получения более точных данных о связывании ПФ₁₋₅ с кальмодулином. С этой целью, используя метод Drabikowski и соавт. [20], согласно которому в присутствии Ca²⁺ трипсин расщепляет кальмодулин на два больших фрагмента (1—77 и 78—148), изучили воздействие ПФ₁₋₅ на N- и C-концевые триптические фрагменты кальмодулина.

Материалы и методы

ПФ₁₋₅ выделяли по методу Галояна и соавт. [16] из гипоталамуса быка. Кальмодулин очищали из бычьего мозга до гомогенного состояния, используя аффинную хроматографию на трифторперазин-сефарозе-4В по методу Charbonneau и соавт. [21]. Кролики были иммунизированы 1-фтор-2,4-динитробензоатным производным бычьего кальмодулина по методу Wallace и соавт. [22]. Иммуноглобулиновую фракцию получали из антисыворотки с помощью хроматографии на QAE-Сефараксе А-50 по методу Tijssen и соавт. [23]. Моноспецифические антитела против бычьего кальмодулина были получены с помощью аффинной хроматографии на кальмодулин-сефарозе-4В. Иммуноглобулиновая фракция была проведена несколько раз через колонку с кальмодулин-сефарозой, затем колонку промыли 0,05 М трис-солевым буфером, рН 8,0. Антитела элюировали с колонки 0,2 М глицин-НСl буфером, рН 2,7 и сразу же нейтрализовали 0,2 М трис-НСl буфером, рН 8,0. Затем антитела диализовали против Na-бикарбонатного буфера, рН 9,6 и хранили при 4° в присутствии 0,2%-ного NaN₃.

Для определения образования иммунного комплекса кальмодулин-антитело использовали метод непрямого ферментзависимого иммуносор-

белкового анализа (ELISA) [24]. 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 иммунного комплекса 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 *o*-фенилендиамина), содержащее лунок фиксировали добавлением 2 н. H_2SO_4 и измеряли поглощение при 492 нм.

Гидролиз кальмодулина (2 мг/мл) трипсином был проведен по методу Drabikowski и соавт. [20] в присутствии 0,1 М $CaCl_2$. N- и C-концевые фрагменты кальмодулина были выделены из гидролизата в гомогенном виде по методу Guepin и соавт. [25] с использованием ВЭЖХ в обращенной фазе на колонке LiChrosob 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—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: CNBr-активированная сефароза-4В, QAE-сефадекс А-50 («Pharmacia», Швеция), ЭГТА («Sigma», США), трифторперазин, меллитин («Chinoïn Pharmaceutical», Венгрия), ацетонитрил («Merck», ФРГ).

Результаты и обсуждение

С помощью метода Drabikowski и соавт. [20] был проведен ограниченный гидролиз кальмодулина в присутствии 0,1 М $CaCl_2$, приведший к образованию двух больших фрагментов (1—77 и 78—148), которые затем были выделены в гомогенном состоянии с помощью ВЭЖХ в обращенной фазе. Как видно из рис. 1, после 60 мин ограниченного гидролиза трипсином кальмодулин полностью распадается на 2 фрагмента. Время удерживания С-концевого фрагмента 15,5 мин, N-концевого фрагмента—17,4 мин, а время удерживания кальмодулина—17,8 мин. N- и С-концевые фрагменты кальмодулина были лиофилизированы и их гомогенность была проверена при электрофорезе в ПААГ (12,5%) в присутствии 8 М мочевины.

Была поставлена следующая задача: связываются ли ПФ с N- и С-концевыми фрагментами кальмодулина. Для этой цели было решено использовать метод непрямого ELISA, с помощью которого ранее мы установили факт связывания ПФ с интактной молекулой кальмодулина [17—19].

Как указывалось выше, ТФП и меллитин связываются как с N-, так и с С-концевыми фрагментами кальмодулина [14, 15]. Было целесообразно использовать метод непрямого ELISA и для демонстрации связывания ТФП и меллитина с N- и С-концевыми фрагментами кальмодулина с целью сравнительного анализа полученных данных.

В первой серии экспериментов было изучено воздействие ТФП на процесс связывания антител с иммобилизованным, на платах в одном случае интактным кальмодулином, в другом—С-концевым фрагментом кальмодулина, а в третьем—смесью N- и С-концевых трипептидных фрагментов.

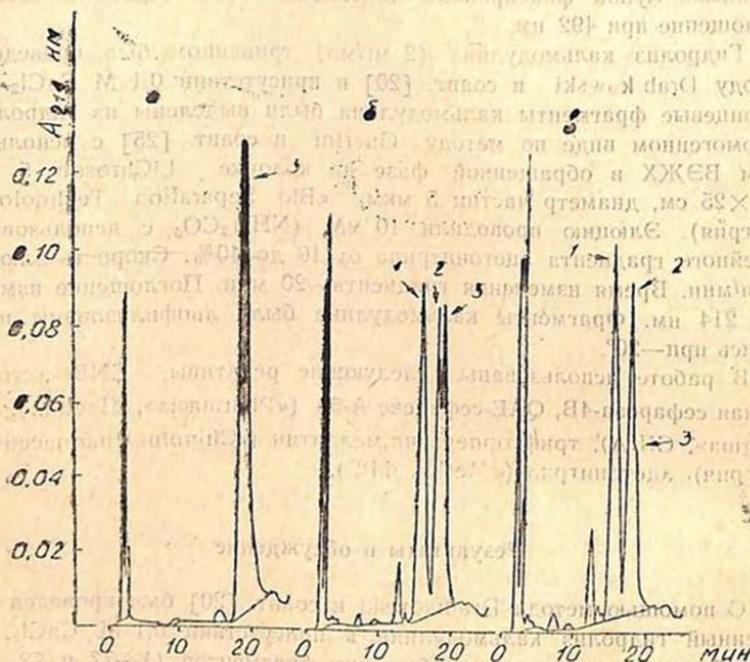


Рис. 1. Очистка N- и С-концевых фрагментов кальмодулина с помощью ВЭЖХ в обращенной фазе из колонки LiChrosorb 5 RP-18 (0,4×25 см), с использованием градиента концентрации ацетонитрила 10—40%, содержащего 10 мМ $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$. Скорость элюции 1 мл/мин. Время изменения градиента—20 мин. а—а—ВЭЖХ трипсинового гидролизата кальмодулина через 0, 30 и 60 мин гидролиза соответственно. Пики были идентифицированы как кальмодулин (3), его N-(2) и С-концевой (1) фрагменты

Необходимо отметить, что образование иммунного комплекса не регистрировалось в случае, когда на платах был иммобилизован N-концевой фрагмент кальмодулина, так как он не содержал антигенного участка. Как видно из рис. 2, ТФП при низких концентрациях (максимальный эффект наблюдается при концентрации 3,9 мкМ) стимулировал образование иммунного комплекса, а при высоких концентрациях около

500 мкМ) вызывал значительное ингибирование образования иммунокомплекса. Этот факт свидетельствовал о четко выраженном дозозависимом эффекте ТФП на процесс образования иммунокомплекса кальмодулин-антитело. Нами было высказано предположение, что при высоких концентрациях ТФП связывается с С-концевым доменом

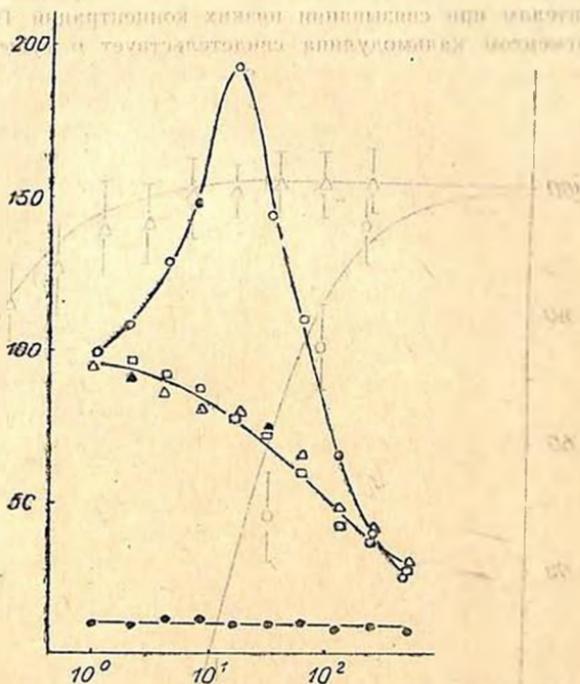


Рис. 2. Влияние трифторперазина (ТФП) на образование иммунокомплекса. Кальмодулин (○) был иммобилизован на платах в концентрации 2,5 мкг/мл, его С- (△) и N-концевой (⊖) фрагменты были иммобилизованы на платах в концентрации 3,6 мкг/мл. —□—) иммобилизация на платах смеси N- и С-концевых фрагментов кальмодулина. Антитела вносили в лунки плат в концентрации 7,5 мкг/мл. По оси абсцисс — концентрация ТФА в мкМ; по оси ординат — % образования иммунокомплекса

кальмодулина (где расположен антигенный участок кальмодулина — последовательность аминокислот 137—143 [26]), вызывая такие конформационные изменения в его молекуле, которые приводят к потере сродства кальмодулина к антителам, а при низких концентрациях ТФП, по-видимому, связывается с N-концевым доменом кальмодулина, вызывая другие конформационные изменения в его молекуле, которые приводят к повышению сродства кальмодулина к антителам.

Как видно из рис. 2, когда на платах был иммобилизован С-концевой фрагмент кальмодулина или смесь триптических фрагментов, ТФП терял способность стимулировать образование иммунокомплекса.

Это свидетельствует о следующем: 1) предположение о том, что ТФП при низких концентрациях связывается с N-концевым доменом, что приводит к повышению сродства кальмодулина к антителам, не лишено оснований; 2) для проявления стимулирующего эффекта ТФП на образование иммунного комплекса необходимо наличие нативной структуры кальмодулина; 3) повышение сродства кальмодулина к антителам при связывании низких концентраций ТФП с N-концевым фрагментом кальмодулина свидетельствует о существовании внутри-

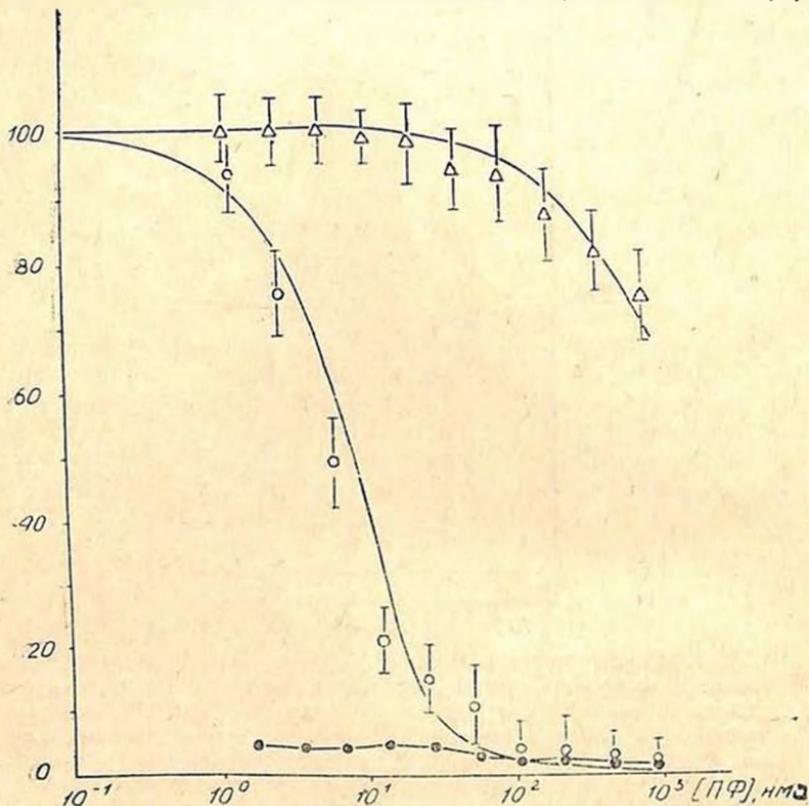


Рис. 3. Влияние пептидного фактора (ПФ₁) на образование иммунного комплекса. Кальмодулин был иммобилизован на платах в концентрации 2,5 мкг/мл (-o-), его С- (—Δ—) и N-концевой (●) фрагменты были иммобилизованы в концентрации 3,6 мкг/мл. Антитела вносили в лунки плат в концентрации 7,5 мкг/мл. По оси абсцисс—концентрация ПФ₁ в нМ; по оси ординат—% образования иммунного комплекса.

молекулярного взаимодействия между N- и С-концевыми доменами нативного кальмодулина, поскольку присоединение ТФП к N-концевому домену, очевидно, вызывает определенные конформационные изменения в его С-концевом домене, где расположен антигенный участок молекулы кальмодулина.

Во второй серии экспериментов аналогичные исследования были проведены с ПФ₁₋₅. Как видно из рис. 3, когда на платах был иммобилизован кальмодулин, под воздействием ПФ происходит значительное (более чем на 90%) ингибирование образования иммунокомплекса. Когда же на платах иммобилизован С-концевой триптический фрагмент кальмодулина, наблюдается ингибирование образования иммунокомплекса лишь на 30%. Полученные данные свидетельствовали о необходимости наличия нативной структуры кальмодулина для его эффективного связывания с ПФ. В то же время эти данные косвенно указывали на то, что N-концевой домен кальмодулина также принимает участие в связывании ПФ. На рис. 3 приведены данные относительно ПФ₁. Тот же эффект был получен при использовании других ПФ.

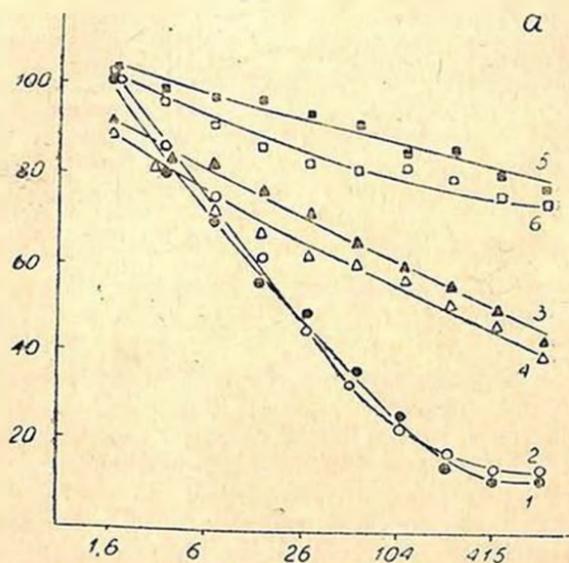


Рис. 4. а влияние пептидных факторов (ПФ₁ и ПФ₂) на образование иммунокомплекса кальмодулин-антитело в отсутствие и в присутствии в инкубационной смеси N-концевого фрагмента (NФ) кальмодулина. 1—ПФ₁; 2—ПФ₂; 3—ПФ₁+0,05 мкМ NФ; 4—ПФ₂+0,05 мкМ NФ; 5—ПФ₁+3,2 мкМ NФ; 6—ПФ₂+3,2 мкМ NФ. По оси абсцисс—концентрация ПФ в нМ; по оси ординат—% связывания антител с кальмодулином.

Как указывалось выше, в случае, иммобилизации на платах N-концевого фрагмента кальмодулина, из-за отсутствия в его структуре антигенного участка образование иммунокомплекса не регистрировалось. Поэтому для выяснения вопроса связываются ли ПФ₁₋₅ с N-концевым доменом были проведены следующие эксперименты. В инкубационную смесь вместе с антителами вносили N-концевой триптический фрагмент кальмодулина (были использованы 2 постоянные концентрации N-концевого фрагмента—0,05 мкМ и

3,2 мкМ и ПФ (в диапазоне концентраций от 1,6 нМ до 0,08 мкМ). Как видно из рис. 4, а добавление в инкубационную смесь N-концевого фрагмента в концентрации 0,05 мкМ приводило к снижению ингибиторного эффекта ПФ на процесс образования иммунокомплекса на 30%. Добавление же в инкубационную смесь N-концевого фрагмента в концентрации 3,2 мкМ приводило к снижению ингибиторного эффекта ПФ на 70%. Как видно из того же рисунка в случае, когда инкубационная смесь не содержала N-концевого фрагмента, под воздействием ПФ происходило ингибирование образования иммунокомплекса до 90%.

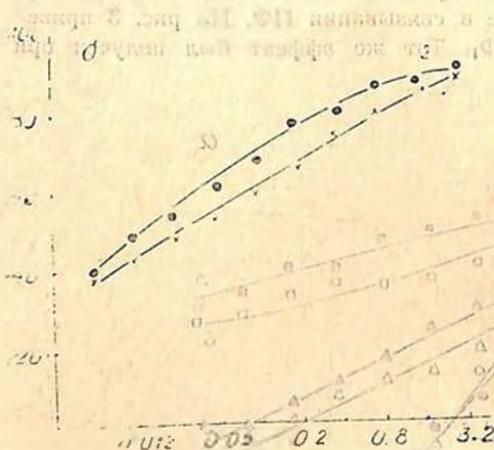


Рис. 4, б. Влияние различных концентраций N-концевого фрагмента кальмодулина на образование иммунокомплекса в присутствии постоянных концентраций пептидных факторов (ПФ₁ и ПФ₂). 1—ПФ₁ (50 нМ); 2—ПФ₂ (50 нМ). По оси абсцисс—концентрация N-концевого фрагмента в мкМ; по оси ординат—% связывания антител с кальмодулином.

В других экспериментах в инкубационную смесь вместе с антителами добавляли различные концентрации N-концевого фрагмента при постоянной концентрации ПФ (50 нМ). Эта концентрация ПФ в значительной степени (до 60%) подавляла образование иммунокомплекса кальмодулин-антител. Как видно из рис. 4, б с повышением концентрации N-концевого фрагмента происходило снижение ингибиторного эффекта ПФ на процесс образования иммунокомплекса.

Полученные данные однозначно указывали на связывание ПФ с N-концевым фрагментом кальмодулина, что приводило к образованию комплекса N-концевой фрагмент—ПФ и резкому уменьшению концентрации несвязанных ПФ в инкубационной смеси. Это, в свою очередь, в значительной степени уменьшало возможность образования комплекса кальмодулин—ПФ и приводило к тому, что иммобилизованный на платах кальмодулин становился более доступным для антител.

С помощью нелинейного регрессионного анализа данных, полученных методом непрямого ELISA, были определены величины K_d для комплексов, образуемых ПФ с кальмодулином и его N- и C-концевыми фрагментами. Для комплексов кальмодулин-ПФ и C-концевой

фрагмент кальмодулина—ПФ величина K_d была определена по формуле:

$$K_d = C_{SD} (qS_{AR} - qS_D - pS_{AB}) / S_D \quad (1)$$

где C_{SD} и S_D — это концентрация ПФ в инкубационной смеси и концентрация ПФ, связанного с твердой фазой соответственно; q — число эпитопов на молекулу кальмодулина; p — число эпитопов, связанных с молекулой антитела; S_{AR} — концентрация кальмодулина или его С-концевого фрагмента, связанных с твердой фазой; S_{AB} — концентрация антител, связанных с твердой фазой.

При определении величины K_d для вышеуказанных комплексов были учтены и следующие параметры:

$$C_0 = C_s + (F/V) S_{AB} \quad (2)$$

$$D_0 = C_{SD} + (F/V) S_D \quad (3)$$

где C_0 — общая концентрация антител; C_s — концентрация антител в растворе; D_0 — общая концентрация ПФ; F — реакционная площадь; V — объем реакционной смеси.

При определении величины K_d для комплекса N-концевой фрагмент-ПФ было использовано иное выражение, характеризующее общую концентрацию ПФ (D_0):

$$D_0 = C_{SD} + (C_{SD} - N) + (F/V) [(qS_D - qS_{AR}) + (qS_{AR} - qS_D - pS_{AB})] \quad (4)$$

где N — это концевой фрагмент кальмодулина.

Вышеприведенные формулы (1—4) были выведены на основе работ Nuggen и соавт. [27—29].

Итак, согласно полученным данным, величины K_d для комплексов кальмодулин-ПФ, N-концевой фрагмент кальмодулина-ПФ и С-концевой фрагмент кальмодулина-ПФ были равны 2—10 нМ; 5—100 нМ; 300—1000 нМ соответственно. Как видно, ПФ₁₋₅ обладают наибольшим сродством к интактной молекуле кальмодулина, что позволяет высказать предположение о существовании внутримолекулярного взаимодействия между N- и С-концевыми доменами кальмодулина при его связывании с ПФ.

В третьей серии экспериментов было подтверждено связывание меллитина как с N-, так и с С-концевым фрагментом кальмодулина. Как видно из рис. 5 меллитин ингибирует образование иммунокомплекса как в случае иммобилизации на платах кальмодулина, так и в случае иммобилизации на платах его С-концевого фрагмента. Добавление же в инкубационную смесь N-концевого фрагмента (как и в случае ПФ₁₋₅) приводит к нейтрализации ингибиторного эффекта меллитина на процесс образования иммунокомплекса.

При сравнении данных, представленных на рисунках 2, 3, 5 можно заметить, что ПФ₁₋₅ ингибируют образование иммунокомплекса кальмодулин-антитело в концентрации на три порядка меньшей, чем ТФП и на два порядка меньшей, чем меллитин.

Таким образом, на основании полученных данных можно заключить, что ПФ₁₋₅ связывается как с N-, так и с C-концевыми доменами кальмодулина, что типично для таких известных антагонистов кальмодулина, как ТФП и меллитин [14, 15]. Недавно установленная нами первичная структура для 3-х из ПФ₁₋₅ (VVVUPW; VVUPWT; LVVUPWT) [30] дала достаточно оснований высказать мнение о том, что эти пептиды связываются с кальмодулином преимущественно через гидрофобные взаимодействия, что также типично для многих антагонистов кальмодулина.

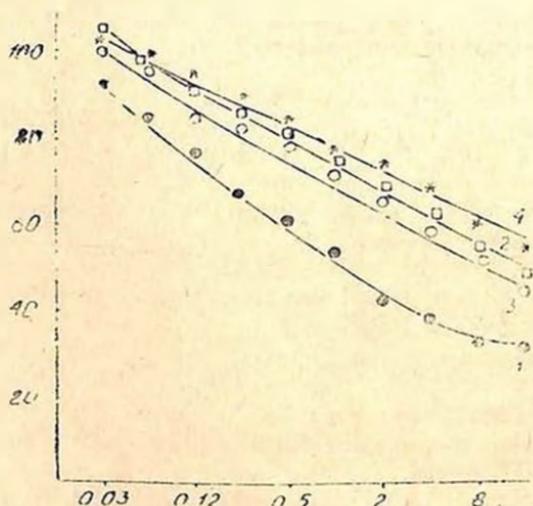


Рис. 5. Влияние меллитина на образование иммунокомплекса в отсутствие в окислительной смеси — концевой фрагмента кальмодулина (НФ). Кальмодулин был иммобилизован на платах в концентрации 2,5 мкг/мл, а его С-кислотный фрагмент (3) — в концентрации — 3,6 мкг/мл. Антигена вносили в лунки плат в концентрации 7,5 мкг/мл. 2 — 1 + 3,2 мкМ НФ; 4 — 3 + 3,2 мкМ НФ. По оси абсцисс — концентрация меллитина в мкМ; по оси ординат — % образования иммунокомплекса

Полученные результаты представляют для нас особую ценность, так как они дали возможность объяснить обнаруженный нами дозозависимый эффект ПФ₁₋₅ на активность КЛЦМ (ПФ₁₋₅ в концентрации 10^{-9} — 10^{-7} М вызывают Ca^{2+} -независимую активацию КЛЦМ, а при концентрации 10^{-6} М и выше этот эффект не наблюдается). Мы думаем, что можно следующим образом объяснить это явление: поскольку ПФ₁₋₅ обладают более высоким сродством к N-концевому фрагменту кальмодулина, то, по-видимому, при концентрации 10^{-9} — 10^{-7} М ПФ₁₋₅ связываются с N-концевым доменом кальмодулина и вызывают такие конформационные изменения в молекуле кальмодулина, которые приводят к активации КЛЦМ. При концентрации 10^{-6} М и выше ПФ₁₋₅ по-видимому, связываются после-

довательно с N-, и с C-концевыми доменами кальмодулина и вызывают другие конформационные изменения кальмодулина, при которых он уже не способен активировать фермент.

Вышеизложенное позволяет нам еще раз высказать мнение о существовании внутримолекулярного взаимодействия между N- и C-концевыми доменами кальмодулина при его связывании с PF_{1-5} которые, вероятно, можно причислить к аллостерическим регуляторам кальмодулина.

NEW DATA ON BINDING HYPOTHALAMIC CORONARO-CONSTRICTORY PEPTIDE FACTORS WITH CALMODULIN

FAKHUDARYAN N. A., *OROSZ F., *LILJOM K., BARSEGIAN K. S.,
OVADI J., GALOYAN A. A.

G. Ch. Bunatyan Institute of Biochemistry, Academy of Sciences
of Armenia, Yerevan

*Institute of Enzymology, B. R. C. Hungarian Academy of Sciences,
Budapest

Using the technique of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) the interaction of coronar-constrictory peptide factors (PF_{1-5}) with two main fragments of calmodulin obtained by limited trypsin digestion (1-77 and 78-148) was investigated. It was found that PF_{1-5} bound with N- as with C-terminal domain of calmodulin demonstrating higher affinity to N-terminal domain. The determination of K_d for calmodulin-PF (K_d 2-10 nM), N-terminal fragment-PF (K_d 15-100 nM), C-terminal fragment-PF (K_d 3.0-100 nM) complexes has revealed that PF_{1-5} show higher affinity to intact calmodulin. This fact lets us make a suggestion about the existence of interactions between N- and C-terminal domains within the native calmodulin structure, when PF_{1-5} bind with calmodulin. The problem of allosteric regulation of calmodulin by PF_{1-5} is discussed.

ЛИТЕРАТУРА

1. Levin R. M., Weiss B. *Mol. Pharmacol.*, v. 13, p. 690-697, 1977.
2. Reid R. E., Gariepy J., Hodges R. S. *FEBS Lett.*, v. 154, p. 60-64, 1983.
3. Gietzen K., Wurris Bader H. *Mol. Pharmacol.*, v. 22, p. 413-419, 1982.
4. Poutogalis B. D., Minocherhomjce A. M., Al-Jobori A. *Can. Biochem. Cell. Biol.*, v. 61, p. 927-933, 1983.
5. Prozialek W. G., Weiss B. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, v. 222, p. 509-516, 1982.
6. Weiss B., Prozialek W., Cimino M. *Adv. Cycl Nucl. Res.*, v. 12, p. 213-225, 1980.
7. Drozd E., Christova T. Y., Ovadi J. *Mol. pharmacol.*, v. 33, p. 678-682, 1988.
8. Malenich D. A., Anderson S. R. *Biochemistry*, v. 21, p. 3450-3456, 1982.
9. Malenich D. A., Anderson S. R. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 114, p. 50-51, 1983.

19. *Grand R. J. A., Perry S. V.* Biochem. J., v. 181, p. 227-241, 1980.
11. *Fello S., Bello H., Granados F.* Biochemistry, v. 21, p. 451-465, 1982.
12. *Giedroc D. P., Pueli D., Ling N., Sturos J. V.* J. Biol. Chem., v. 258, p. 16-22, 1983.
13. *Mautel Y., Cox J. A.* Biochemistry, v. 22, p. 5630-5685, 1983.
14. *Levin R. M., Weiss B. J.* J. Pharmacol. Exp. Ther., v. 208, p. 454-459, 1979.
15. *Steiner R. F., Marshall L. and Needleman P.* Arch. Biochem. Biophys., v. 246, p. 286-300, 1986.
16. *Галоян А. А., Бархударян Н. А., Валко К., Закарян Т. Р.* Нейрохимия, т. 7, № 4, с. 519-524, 1988.
17. *Barhударян Н., Zakaryan T., Aicksanyan A., Sharova N., Shatalova L., Chalyan S., Galoyan A.* 8th ESN Meeting, Leipzig, p. 214, 1990.
18. *Horvath L., Barhударян Н., Galoyan A., Ozadi J.* FEBS Lett., v. 276, p. 197-200, 1990.
19. *Бархударян Н. А., Хорват Л., Галоян А. А., Овади Ю.* Нейрохимия, т. 9, № 2, с. 190-197, 1990.
20. *Drabikowski W., Kurnichi J., Grabarak Z.* Biochim. et biophys. acta, v. 485, p. 124-133, 1977.
21. *Charbonneau U., and Cormier M.* Biochem. Biophys. Res. Commun., v. 90, p. 1039-1047, 1979.
22. *Wallace R. W., Chung W. Y.* J. Biol. Chem., v. 254, p. 6564-6571, 1979.
23. *Tijssen P., Kurstak E.* In:—Viral Immunodiagnosis (Kurstak E. and Morisset R., eds.), p. 125. Academic Press, New York, 1974.
24. *Van Eldik L. J., Watterson D. M.* In: Calcium and Cell Physiology (Marme D., ed.), p. 215-226, Springer Berlin, 1984.
25. *Guerini D., Krebs J., Casafoli E.* J. Biol. Chem., v. 259, p. 15172-15177, 1984.
26. *Ovadi J.* Prog. Drug. Res., v. 33, p. 353-395, 1989.
27. *Nygren H., Stenberg M.* J. Immunol. Methods, v. 80, p. 15-21, 1985.
28. *Nygren H., Kartinen M., Stenberg M.* J. Immunol. Methods., v. 92, p. 219-224, 1986.
29. *Stenberg M., Stibler L., Nygren H. J.* Theor. Biol., v. 120, p. 129-138, 1986.
30. *Закарян Т. Р., Бархударян Н. А., Шувалова Л. А., Остовская М. В., Шарова Н. П., Галоян А. А.* Нейрохимия, т. 9, № 4, с. 44-449, 1990.

Поступила 25. I. 1991

Л И Т Е Р А Т У Р А