

УДК 577.112.389.6+612.82

ДЕЙСТВИЕ ПЕПТИДНЫХ ФРАГМЕНТОВ ОСНОВНОГО БЕЛКА МИЕЛИНА НА СВЯЗЫВАНИЕ [³H] ДИЛТИАЗЕМА С СИНАПТИЧЕСКИМИ МЕМБРАНАМИ МОЗГА

ШАНШИАШВИЛИ Л. В., МИКЕЛАДЗЕ Д. Г.

Институт физиологии АН Грузии, Тбилиси

Основной белок миелина (ОБМ) является главным компонентом миелина ЦНС. Этот белок локализован с цитоплазматической стороны миелиновой мембраны и, как предполагают, играет ведущую роль в сборке и формировании миелиновой структуры [1]. Скорость обновления ОБМ довольно высока ($0,9 \cdot 10^{-12}$ моль/с) [2] и зависит от локализации белка в миелиновой оболочке, степени посттрансляционной модификации, а также функционального состояния миелинизированного аксона [3, 4]. ОБМ и его фрагменты являются иммунологически активными и содержат эпитопы, индуцирующие аутоиммунные реакции типа аллергического энцефаломиелита (АЭ) [5]. Они вызывают антигенную активацию рецепторов иммунных клеток [6] и, кроме того, могут взаимодействовать с некоторыми рецепторными системами и приводить к изменению функционального состояния нервных клеток [2, 7]. Учитывая, что активация иммунных клеток и метаболические процессы нейронов регулируются посредством Ca^{2+} -зависимых процессов, целью настоящего исследования являлось выяснение механизмов действия пептидных фрагментов ОБМ на кальциевые каналы плазматических мембран. В работе была изучена модуляция связывания блокатора Ca^{2+} -каналов [³H] дилтиазема пептидами, полученными после триптического гидролиза ОБМ.

Синаптические мембраны выделяли по методу De Robertis и соавт. [8]. Определение связывания [³H] дилтиазема проводили в среде, содержащей 35 мМ трис-НСl, рН 7,4 и 10 нМ [³H] дилтиазема (153 Кп/ммоль, «Amersham», Англия). Инкубирование проводили в течение 60 мин при 20° и смесь фильтровали на фильтре GF/C («Whatman», Англия). Для определения неспецифического связывания использовали 1 мкМ верапамил («Sigma», США). Радиоактивность на фильтрах считали в толуольной сцинтилляционной смеси.

Триптический гидролиз ОБМ проводили по методу Shoji и соавт. [9]. Фрагменты разделяли с помощью жидкостной хроматографии высокого давления (ЖХВД) на колонке Nova Pak C 18 («Millipore-Waters», США) при возрастающих концентрациях ацето-

нитрила. Элюаты (0,5 мл) собирали, лиофилизировали и использовали в опытах по связыванию [^3H]дилтиазема.

В опытах использовали ОБМ фирмы «Sigma» (США). Анализ этого белка электрофорезом в ПААГ показал наличие полос с величинами M_r 14 (20%) и 18,5 кД (80%). После инкубирования ОБМ с протеникиназой С, а также с Ca^{2+} -кальмодулинзависимой и сАМР-зависимой протеникиназами с последующим разделением фрагментов с помощью хроматографий высокого давления и определения аминокислотного состава было обнаружено, что в коммерческом препарате ОБМ около 30% фрагмент 93—135 является эндогенно фосфорилированным.

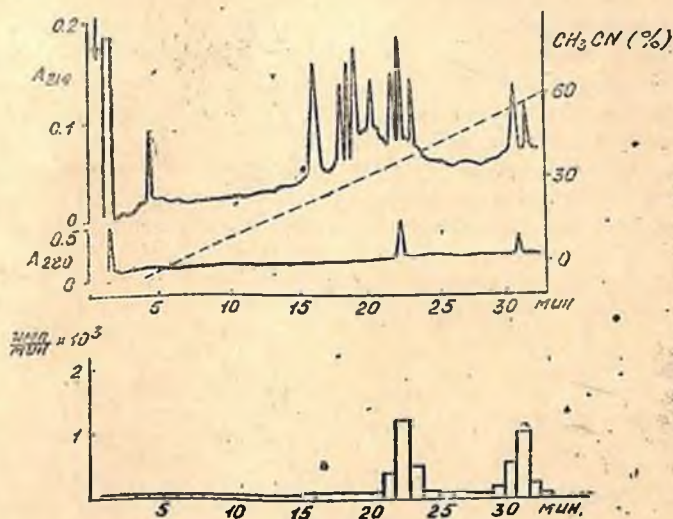


Рис. 1. Жидкостная хроматография высокого давления пептидов основного белка миелина на колонке Nova Pak C18; а—поглощение при 214 и 280 нм, б—специфическое замещение [^3H]дилтиазема с мембранами

Анализ фракций, полученных после хроматографического разделения триптического гидролизата ОБМ показал, что на связывание [^3H]дилтиазема с оннаптическими мембранами влияют две фракции пептидов, выходящие при концентрациях ацетонитрила, равных 44—45% и 55—56% и имеющих поглощение как при 214 нм, так и при 280 нм (рис. 1). Учитывая наличие единственного остатка триптофана в ОБМ, имеющего поглощение при 280 нм, следует заключить, что обе фракции соответствуют пептидному фрагменту 93—135, образующемуся при триптическом расщеплении ОБМ. По данным Shoji и соавт. [9], фрагмент 93—135, являющийся фосфорилированным по Ser-115 пептидом, элюируется с колонки при низких концентрациях ацетонитрила, в то время как более гидрофобная, нефосфорилированная форма пептида выходит в более позднем объеме.

Следует отметить, что действие фосфорилированного пептида на связывание [^3H] дилтиазема носит 2-фазный характер (рис. 2, а). Низкие концентрации этого пептида ингибируют связывание лиганда, тогда как при высоких концентрациях происходит увеличение связывания. В отличие от фосфорилированного, нефосфорилированный пептид вызывал лишь ингибирование связывания [^3H] дилтиазема с характерной кривой зависимости вытеснения лиганда от концентрации замещающего агента (рис. 2, б).

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что фрагмент ОБМ 93—135 вызывает снижение связывания [^3H] дилтиазема с белками кальциевого канала синаптических мембран, тогда как фосфорилированная форма этого фрагмента способна также, при определенных концентрациях, увеличивать связывание. Мы не можем в настоящее время сказать, являются ли эти изменения результатом непосредственного воздействия пептида на дилтиаземсвязывающие белки или они опосредованы механизмами, обусловленными какими-либо другими рецепторными системами нейротрансмиттеров, приводящими к количественному перераспределению кальциевых каналов в клетке. Тем не менее, полученные нами данные, а также ис-

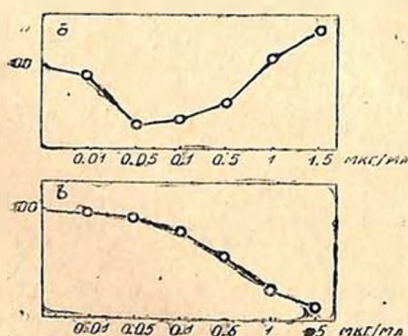


Рис. 2. Зависимость связывания [^3H] дилтиазема с синаптическими мембранами при разных концентрациях пептидов; а—I фрагмент основного белка миеллина, б—II фрагмент основного белка миеллина. По оси ординат—% специфического связывания [^3H] дилтиазема

следования Нye и соавт. [7] свидетельствуют о возможности регуляции определенных рецепторов нервной ткани пептидными фрагментами ОБМ.

Предварительный анализ полученных пептидов, как уже было показано выше, свидетельствует о том, что фрагменты, действующие на [^3H] дилтиаземсвязывающие белки, являются фосфорилированной и дефосфорилированной формами пептида 93—135 ОБМ, несущего основную антигенную детерминанту ОБМ и индуцирующего ЛЭ [5]. Поскольку предполагается, что фосфорилирование пептида по Ser-115 может иметь существенное значение в механизмах индукции ЛЭ [10], полученные нами данные относительно разнонаправленного действия модифицированных и немодифицированных форм пептидов могут свидетельствовать о ключевой роли процессов фосфорилирования ОБМ

в модуляции кальциевых каналов в нейронах и указывать на возможные адекватные механизмы изменения обмена кальция иммунных клеток.

THE ACTION OF PEPTIDE FRAGMENTS OF MYELIN BASIC PROTEIN ON $[^3\text{H}]$ DILTIAZEM BINDING WITH BRAIN SYNAPTIC MEMBRANES

SHANSHASHVILI L. V., MIKELADZE D. G.

Beritashvili Institute of Physiology, Georgian Academy of Sciences, Tbilisi

The action of peptide fragments of myelin basic protein (MBP) on the binding of $[^3\text{H}]$ diltiazem with synaptic membranes was studied. It was shown that binding of $[^3\text{H}]$ diltiazem with membranes was changed only in the presence of two peptides obtained after tryptic hydrolysis of MBP and characterized by absorption at 280 nm. The first of them inhibited the binding of $[^3\text{H}]$ diltiazem with membranes in a concentration-dependent manner while the effect of the other one beared biphasic character. The binding of $[^3\text{H}]$ diltiazem is proposed to be altered under the influence of phosphorylated and nonphosphorylated forms of peptide 93—135 of MBP.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Smith R. *Biochim. et Biophys. acta.*, v. 470, p. 170—184, 1977.
2. Honneggen C. G., Bucher W., Von Hahn H. P.—In: *Myelination and Demyelination* (ed. J. Palo), p. 147—157, New York, London, Plenum Press, 1978.
3. Matthieu J. M., Kuffer A. D.—In: *Myelination and Demyelination* (ed. J. Palo), p. 159—170, New York, London, Plenum Press, 1978.
4. Murray N., Steck A. J. J. *Neurochem.*, v. 43, p. 243—248, 1984.
5. Eylar E. H., Cazzam J., Jackson J. J., Westall F. C., Robinson A. B. *Science*, v. 168, p. 1220—1223, 1970.
6. Burger D. R., Vetto R. M. *Cell Immun.*, v. 70, p. 357—361, 1982.
7. Nye J. S., Voglmaiers S., Martenson R. E., Shider S. H. *J. Neurochem.*, v. 50, № 4, p. 1170—1178, 1983.
8. De Robertis E., De Lores Arnais G. R., Abberici M. *J. Biol. Chem.*, v. 242, p. 3487—3494, 1967.
9. Shoji S., Ohnishi J., Funakoshi T., Kubota Y., Fukunaga K., Miyamoto E., Ueki H. *J. Chromatog.*, v. 319, p. 359—366, 1985.
10. Turner R. S., Chou C.—H. J., Mazzer G. J., Dembure P., Kuo J. F. *J. Neurochem.*, v. 43, p. 1257—1264, 1984.

Поступила 3. I 1991