



О СВЯЗЫВАНИИ КАЛЬМОДУЛИНА С КОРОНАРОСУЖИВАЮЩИМИ ПЕПТИДАМИ ГИПОТАЛАМУСА

БАРХУДАРЯН Н. А., *ХОРВАТ Л., ГАЛОЯН А. А., *ОВАДИ Ю.

Институт биохимии им. Г. Х. Бунятына АН Армении, Ереван

*Институт энзимологии ВАН, Будапешт

Используя метод ферментзависимого иммуносорбентного анализа (ELISA) было обнаружено, что коронаросуживающие пептиды гипоталамуса ингибируют образование иммунного комплекса кальмодулин-антитело путем связывания с кальмодулином, причем по сравнению с известным антагонистом кальмодулина—трифторперазином, исследуемые нейропептиды ингибируют образование иммунного комплекса в концентрации, меньшей на три порядка. Показано, что в присутствии нейропептидов изменяется чувствительность кальмодулина к трифторперазину. Обсуждается вопрос аллостерической регуляции кальмодулина коронаросуживающими пептидами гипоталамуса.

О влиянии кардиоактивных соединений гипоталамуса на активность Ca^{2+} -кальмодулинзависимых ферментов было сообщено Галояном и соавт. впервые в 1976 г. Было показано, что коронарорасширяющий нейрогормон «С» [1] и его множественные формы [2] являются ингибиторами ФДЭ циклических нуклеотидов. Впоследствии из кардиоактивной фракции гипоталамуса были выделены термостабильные пептидные факторы, вызывающие активацию кальмодулинчувствительной ФДЭ без участия Ca^{2+} и кальмодулина [3]. На основании полученных данных А. А. Галоян выдвинул концепцию о существовании в мозгу Ca^{2+} -независимой пептидной системы активации Ca^{2+} -кальмодулинзависимых ферментов [4—5].

Как сообщалось ранее [6], были выделены из гипоталамуса крупного рогатого скота 5 коронаросуживающих пептидных факторов (ПФ) с M_r от 3 до 7 кД. Было обнаружено, что и эти нейропептиды оказывают регуляторное воздействие на активность ряда Ca^{2+} -кальмодулинзависимых ферментов [7—8]. Было высказано предположение о том, что в молекулярном механизме этого воздействия кальмодулин играет важную роль [8]. Для выяснения этого вопроса представлялось целесообразным исследовать взаимоотношение кальмодулина с ПФ, и влияние Ca^{2+} на этот процесс.

Как известно, кальмодулин—это эволюционно консервативный белок—оказался универсальным акцептором Ca^{2+} , он участвует в большинстве регулируемых кальцием процессов в эукариотических клетках. Присоединение Ca^{2+} , приводящее к аллостерической активации кальмодулина, ведет к тому, что ранее свободный кальмодулин связывается в клетке с различными белками-мишенями и играет роль

190

медиатора во многих ферментативных реакциях и системах мембранного транспорта, активируемых Ca^{2+} [10—14].

Показано, что кальмодулин способен Ca^{2+} -зависимым способом связывать некоторые биологически активные пептиды (АКТГ, β -эндорфин, вещество Р и др.) [15—16]. Пептиды в зависимости от их химической структуры связываются с кальмодулином преимущественно через гидрофобные или ионные взаимодействия [17—18]. С кальмодулином связываются различные низкомолекулярные органические соединения, в их числе—лекарственные препараты, связывание которых с кальмодулином препятствует его взаимодействию с различными кальмодулинзависимыми ферментами [19—20] или модифицирует это взаимодействие [21].

В настоящей работе сообщается об исследовании влияния коронаросуживающих нейропептидов гипоталамуса на образование иммунокомплекса кальмодулин-антитело с помощью метода ферментзависимого иммуносорбентного анализа [22], который позволил установить, что коронаросуживающие нейропептиды гипоталамуса связываются с молекулой кальмодулина. Изучено влияние Ca^{2+} на этот процесс. Исследовано одновременное воздействие нейропептидов гипоталамуса и трифторперазина—известного антагониста кальмодулина на процесс образования иммунокомплекса кальмодулин-антитело.

Материалы и методы

Кальмодулин очищали из бычьего мозга до гомогенного состояния, используя аффинную хроматографию на трифторперазин-сефарозе-4В по методу Charbonneau и соавт. [23]. Кролики были иммунизированы 1-фтор-2,4-динитробензоатым производным бычьего кальмодулина по методу Wallace и соавт. [24]. Иммуноглобулиновую фракцию получали из антисыворотки, используя хроматографию на QAE-Сефадексе А-50 по методу Tijssen и соавт. [25]. 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 тщательно промывали 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 были диализованы против Na-бикарбонатного буфера, рН 9,6 и хранили при 4° в присутствии 0,2% NaN_3 .

В эксперименте по определению образования иммунокомплекса кальмодулин-антитело был использован метод непрямого ELISA с некоторыми модификациями по методу Van Eldik и соавт. [26]. Для иммобилизации кальмодулина на платы в лунки плат вносили по 100 мкл смеси раствора кальмодулина в 0,05 М Na-бикарбонатном буфере, рН 9,6 (концентрация раствора 2,5 мкг/мл) и платы инкубировали 18 ч при 4°. Затем после 3-кратного промывания фосфатно-солевым буфером (ФСБ), содержащим 0,05%-ный твин-20 (ФСБ-Т) в лунки плат вносили по 100 мкл смеси, содержащей пептидные факторы и антитела в концентрации 7,5 мкг/мл. Раствор смеси, приготовленный на основе ФСБ-Т, содержал также 0,1%-ную желатину. Платы инкубировали 2 ч при комнатной температуре. Затем, после 3-кратного промывания плат ФСБ-Т в лунки плат вносили по 100 мкл раствора анти-IgG, конъюгированного с пероксидазой хрена в

разведении 1:1000 и платы инкубировали 2 ч при комнатной температуре. Затем, после 3-кратного промывания плат ФСБ-Т в лунки плат вносили по 200 мкл смеси, содержащей H_2O_2 и *o*-фенилендиамина (смесь содержала 17 мг *o*-фенилендиамина и 10 мкл H_2O_2 , объем смеси 25 мл). Платы инкубировали 1 ч в темноте при комнатной температуре. Затем после фиксации содержимого лунок добавлением 50 мкл $2\text{N} \cdot \text{H}_2\text{SO}_4$ наблюдали поглощение при 492 нм. Активность связанного с твердой фазой фермента прямо пропорциональна концентрации антител в исследуемом образце.

В работе использованы следующие реактивы: CNBr-активированная сефароза-4В, QAE-сефадекс А-50 («Pharmacia», Швеция), ЭГТА («Sigma», США), трифторперазин («Chinoin Pharmaceutical Co.», Венгрия).

Результаты и обсуждение

Было изучено влияние ПФ₅ на образование иммунокомплекса кальмодулин-антитело. Эксперименты показали, что ПФ₁₋₄ (рис. 1) в значительной степени (до 90% и более) ингибировали связывание антител с кальмодулином, а ПФ₅ лишь в очень незначительной

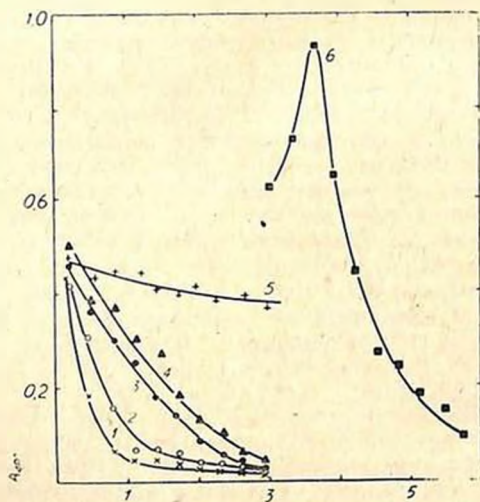


Рис. 1. Влияние пептидных факторов гипоталамуса (ПФ) и трифторперазина (ТФП) на образование иммунокомплекса кальмодулин-антитело. Был использован метод непрямого ELISA с применением кроличьих антител против бычьего кальмодулина. Кальмодулин иммобилизовали на платах в концентрации 2,5 мкг/мл. Антитела вносили в лунки плат в концентрации 7,5 мкг/мл. 1—ПФ₁; 2—ПФ₂; 3—ПФ₃; 4—ПФ₄; 5—ПФ₅; 6—ТФП. По оси абсцисс—концентрация ПФ в мкМ; по оси ординат—поглощение при A_{492} нм

степени подавлял образование иммунного комплекса. Концентрации, при которых ПФ₁₋₄ вызывали 50%-ное ингибирование образования иммунного комплекса (I_{50}), равны 2,5; 4,6; 15,8 и 31,6 нМ для ПФ₁, ПФ₂, ПФ₃ и ПФ₄ соответственно. При сравнении эффекта нейропептидов с эффектом классического антагониста кальмодулина—трифтороперазина (ТФП) видно (рис. 1), что ПФ₁₋₄ являются значительно более эффективными ингибиторами образования иммунного комплекса, чем ТФП [14]; они ингибируют образование иммунного комплекса в концентрации, на три порядка меньшей, чем ТФП. Причем необходимо отметить, что наблюдается определенная корреляция между ингибиторным эффектом ПФ и их величиной M_r . Так, ПФ₁ с M_r 3 кД является наиболее эффективным ингибитором, в то же время ПФ₅ с M_r 7 кД—наименее эффективен.

Были выдвинуты следующие альтернативные объяснения ингибиторного эффекта нейропептидов на образование иммунного комплекса: 1) пептиды связываются с молекулой кальмодулина и препятствуют его связыванию с антителами; 2) ПФ₁₋₄ являются фрагментами молекулы кальмодулина и, связываясь с антителами против бычьего кальмодулина, делают их недоступными для кальмодулина. Для выяснения механизма ингибирования образования иммунного комплекса под влиянием ПФ был проведен эксперимент, в котором вместо кальмодулина на пластах были иммобилизованы антитела против бычьего кальмодулина. Использовали 2 концентрации антител—5 мкг/мл и 10 мкг/мл. Как видно из таблицы, эксперименты с использованием разных концентраций ПФ₂ и ПФ₄ совпадают с контрольными, не содержащими ПФ. В то же время использование в этих экспериментах кальмодулина (таблица) показало ингибирование связывания анти-

Таблица

Влияние нейропептидов и кальмодулина на взаимодействие антител против бычьего кальмодулина с анти-IgG, конъюгированного с пероксидазой хрена

Анализируемые вещества в мкМ	Конц. антител мкг/мл	Разведение анти-IgG	A_{492} нм
—	5	1:2000	—
—	5	1:1000	—
—	5	1:500	—
—	10	1:1000	0,130
—	10	1:500	0,230
Кальмодулин, 0,51	10	1:500	0,165
ПФ ₁ , 0,207	10	1:500	0,230
ПФ ₂ , 0,006	10	1:500	0,230
ПФ ₃ , 0,207	10	1:500	0,230
ПФ ₄ , 0,006	10	1:500	0,225

тел с анти-IgG. Эти данные позволили отклонить выдвинутое предположение о том, что ПФ₁₋₄, возможно, являются фрагментами молекулы кальмодулина. Полученные результаты позволили заключить, что ингибирование образования иммунного комплекса кальмодулин-антителом под воздействием коронаросуживающих пептидов гипоталамуса происходит в результате их связывания с кальмодулином.

Было исследовано влияние Ca^{2+} на связывание нейропептидов с кальмодулином. Следует отметить, что для образования иммун-

комплекса кальмодулин-антитело более благоприятными условиями являются те, когда кальмодулин иммобилизован на платах в присутствии Ca^{2+} , то есть процесс— Ca^{2+} -зависимый.

Нами были проведены две серии экспериментов. В одном случае кальмодулин был иммобилизован на платах в присутствии 1 мМ CaCl_2 . Затем в инкубационную смесь, наряду с ПФ и антителами, добавляли 1 мМ CaCl_2 или 1 мМ ЭГТА (рис. 2, а). Полученные данные показали отсутствие каких-либо различий в ингибировании образования иммунокомплекса под действием нейропептидов. В следующей серии экспериментов кальмодулин был иммобилизован на платах в

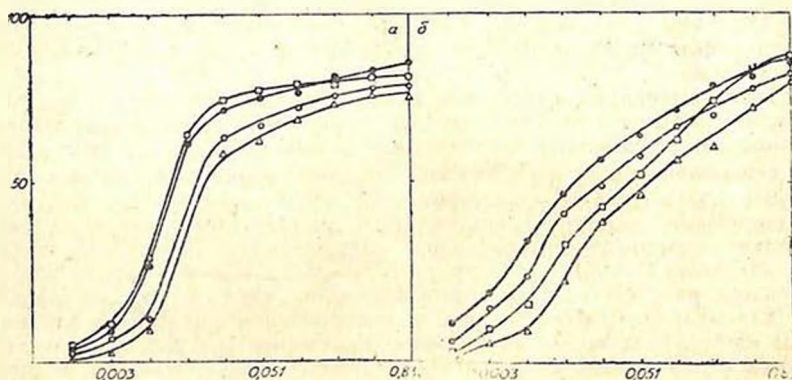


Рис. 2. а. Влияние пептидных факторов гипоталамуса (ПФ) на образование иммунокомплекса кальмодулин-антитело в присутствии 1 мМ CaCl_2 (●—ПФ₁; ○—ПФ₂) и 1 мМ ЭГТА (○—ПФ₂; △—ПФ₃). Кальмодулин был иммобилизован на платах в присутствии 1 мМ CaCl_2 . По оси ординат—% ингибирования связывания антител с кальмодулином; по оси абсцисс—концентрация ПФ в мМ.

б. Влияние пептидных факторов на образование иммунокомплекса кальмодулин-антитело в присутствии 1 мМ CaCl_2 (●—ПФ₁; ○—ПФ₂) и 1 мМ ЭГТА (○—ПФ₂; △—ПФ₃). Кальмодулин был иммобилизован на платах в присутствии 1 мМ ЭГТА. По оси ординат—% ингибирования связывания антител с кальмодулином; по оси абсцисс—концентрация ПФ в мМ.

присутствии 1 мМ ЭГТА. В инкубационную смесь также добавляли в одном случае 1 мМ CaCl_2 , в другом—1 мМ ЭГТА. В том случае, когда иммобилизованный кальмодулин был свободен от Ca^{2+} , наблюдалось связывание нейропептидов с кальмодулином (рис. 2, б). Мы не обнаружили каких-либо изменений в ингибиторной способности нейропептидов, когда инкубационная среда содержала Ca^{2+} или была свободна от них. На основании полученных данных был сделан вывод: хотя сродство нейропептидов гипоталамуса к кальмодулину несколько выше, когда он иммобилизован на платах в присутствии Ca^{2+} , они достаточно хорошо связываются с кальмодулином и в отсутствие ионов кальция.

Полученные данные позволили по-новому осветить Ca^{2+} -независимое регуляторное влияние ПФ₁₋₃ на активность киназы легких цепей миозина (КЛЦМ)— Ca^{2+} кальмодулинзависимого фермента,

ответственного за фосфорилирование легких цепей миоина [27—28].
Нами было обнаружено, что ПФ в концентрации 0,05 мкМ вызывают Ca^{2+} -независимую активацию фермента от 30 до 100% по сравнению с контролем, содержащим 1 мМ ЭГТА и не содержащим ПФ [8—9]. Стимулирующее действие ПФ на активность КЛЦМ имело место только при наличии в инкубационной среде кальмодулина. Данные, полученные с помощью метода ELISA о связывании ПФ с кальмодулином, позволили заключить, что коронаросуживающие пептидные факторы гипоталамуса осуществляют свое воздействие на активность КЛЦМ путем связывания с молекулой кальмодулина и образования комплекса кальмодулин-пептидный фактор, который, связываясь с каталитической субъединицей фермента, вызывает его активацию. Полученные результаты дают основание предположить, что коронаросуживающие нейропептиды гипоталамуса можно причислить к числу Ca^{2+} -независимых регуляторов в клетке, которые и в условиях *in vivo* могут принимать участие в регуляции активности КЛЦМ и, возможно, других Ca^{2+} -кальмодулинзависимых ферментов при низком внутриклеточном уровне содержания Ca^{2+} . В этом случае коронаросуживающие нейропептиды, по-видимому, могут принимать уча-

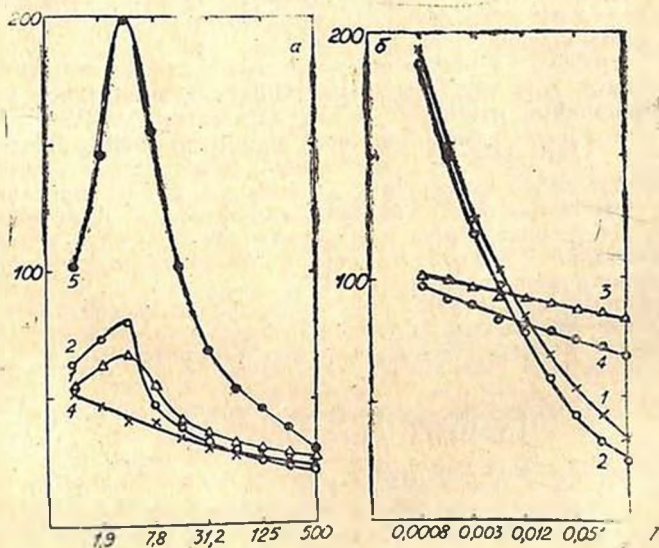


Рис. 3. а. Влияние пептидных факторов (ПФ) гипоталамуса (в концентрации, равной I_{50}) на образование иммунного комплекса кальмодулин-антитело в присутствии различных концентраций трифторперазина. 1—ПФ₁; 2—ПФ₂; 4—ПФ₄; 5—ПФ₅. По оси ординат—% связывания антител с кальмодулином; по оси абсцисс—концентрация трифторперазина в мкМ

б. Влияние пептидных факторов гипоталамуса на образование иммунного комплекса кальмодулин-антитело в присутствии постоянной концентрации трифторперазина, равной 3,9 мкМ. 1—ПФ₁; 2—ПФ₂; 3—ПФ₃; 4—ПФ₄. По оси ординат—% связывания антител с кальмодулином; по оси абсцисс—концентрация ПФ в мкМ

ствие (как и Ca^{2+}) в аллостерической регуляции кальмодулина, приводя его структуру в зависимости от концентрации ПФ (как и в случае Ca^{2+} в различных активные конформационные состояния).

Интересные данные были получены при изучении совместного эффекта нейропептидов гипоталамуса и ТФП на образование иммунокомплекса. В одном случае (рис. 3, а) исследовалось влияние ПФ (в концентрации I_{50}) в сочетании с разными концентрациями ТФП, а в другом (рис. 3, б) — влияние разных концентраций ПФ в присутствии постоянной концентрации ТФП, равной 3,9, которая вызывает увеличение образования иммунокомплекса до 100% и более [14]. Полученные данные показали, что ПФ подавляют активирующий эффект ТФП и только ПФ₅ повторяет эффект ТФП (рис. 3, а). Как видно из рис. 3, б, ПФ₁₋₄ полностью подавляют активирующий эффект ТФП и только при очень низких концентрациях ПФ₅, когда ингибирующий эффект этих нейропептидов не проявлялся или был выражен очень слабо (около 10%), мы наблюдали активирующий эффект ТФП. Очевидно, что ПФ₁₋₄ конкурируют с ТФП за центр связывания с кальмодулином. Как видно из того же рис. 3, б, одновременное связывание ПФ₁ и ТФП с кальмодулином препятствует как проявлению активирующего эффекта ТФП (даже при очень низких концентрациях ПФ), так и ингибирующего эффекта нейропептидов, что, очевидно, также связано с конформационными изменениями в структуре кальмодулина.

Таким образом, на основании полученных данных можно выдвинуть следующую гипотезу: связывание ПФ с кальмодулином вызывает конформационные изменения в его антигенном участке, расположенном в С-концевом домене кальмодулина (последовательность аминокислот 137—143) [29—30], в результате чего теряется чувствительность кальмодулина к антителам, приводящая к ингибированию образования иммунокомплекса кальмодулин-антитело. Конформационные изменения, происходящие в молекуле кальмодулина в результате его связывания с нейропептидами гипоталамуса, изменяют также чувствительность кальмодулина к ТФП.

Дальнейшие исследования будут направлены на изучение влияния комплекса кальмодулин-пептидный фактор гипоталамуса на активность ряда Ca^{2+} -кальмодулинзависимых ферментов.

ABOUT CALMODULIN-BINDING CORONAROCONSTRICTORY HYPOTHALAMIC PEPTIDES

Barkhudaryan N. A., *Horvath L., Galeyan A. A., *Civadi J.

G. Ch. Bunatyan Institute of Biochemistry, Academy of Science of the Armenia, Yerevan

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

Using the technique of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) we found that coronaryconstrictory hypothalamic neuropeptides inhibit the formation of calmodulin—antibody immune complex by binding with calmodulin. As compared with trifluoroperazine, a classic calmodulin antagonist, these neuropeptides inhibit the formation of the immune complex when added at three orders of magnitude lower concentration. It has been demonstrated that the sensitivity of calmodulin to trifluoroperazine changes in the presence of neuropeptides. The problem of allosteric regulation of calmodulin by coronaroconstrictory hypothalamic peptides is discussed.

ЛИТЕРАТУРА

1. Галоян А. А., Гурвиц Б. Я., Погосян М. А. *Вопр. биохимии мозга*. Ереван, Изд-во АН АрмССР, т. 2, с. 117—120, 1976.
2. Галоян А. А., Срапионян Р. М., Карапетян Р. О., Абелян Ж. Г., Саакян Ф. М., Саакян С. А., Абрамян С. С., Григорян Л. А., Одабабян А. Б., Бочко И. Ф. *Нейрохимия*, т. 5, № 4, с. 354—365, 1986.
3. Галоян А. А., Гурвиц Б. Я. *Нейрохимия*, т. 5, № 4, с. 420—422, 1986.
4. Галоян А. А. *Нейрохимия*, т. 6, № 1, с. 3—9, 1987.
5. Галоян А. А., Гурвиц Б. Я., Шарова Н. П. Тезисы докл. X Всесоюзн. конф. по биохимии нервной системы «Фундаментальные достижения нейробиологии в медицине» (под ред. С. Е. Северина) с. 125—126, Горький, 1987.
6. Галоян А. А., Бархударян Н. А., Валко К., Закарян Т. Р. *Нейрохимия*, т. 7, № 4, с. 519—524, 1988.
7. Galoyan A. A., Barkhudaryan N. A., 12th ISN Meeting, Algarve, Portugal, 1989, J. Neurochem., v. 52, suppl., S 74B, 1989.
8. Бархударян Н. А., Закарян Т. Р., Шувалова Л. А., Галоян А. А. Тезисы докл. VI Всесоюзн. конф. по биохимии мышц, Тбилиси, с. 19—20, 1989.
9. Бархударян Н. А., Закарян Т. Р., Шувалова Л. А., Чаалян С. Г., Алексанян А. Р., Галоян А. А. *Нейрохимия*, т. 8, № 4, с. 335—341, 1989.
10. Cheung W. Y. *Science*, v. 207, p. 19—27, 1980.
11. Means A. R., Dedman J. R. *Nature*, v. 285, p. 73—77, 1980.
12. Klee C. B., Crouch T. H., Richman P. G. *Annual Rev. Biochem.*, v. 49, p. 489—515, 1980.
13. Basironi C. O., Wolff D. J. *Biochem. Pharmacol.*, v. 30, № 12, p. 1395—1405, 1981.
14. Ovadi J. *Progress in Drug Research*, v. 33, p. 352—355, 1989.
15. Malenka D. A., Anderson S. R. *Biochemistry*, v. 21, p. 3430—3485, 1982.
16. Malenka D. A., Anderson S. R. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 114, № 1, p. 50—56, 1983.
17. Giedron D. P., Paett D., Ling N., Staros J. V. J. *Biol. Chem.*, v. 258, p. 16—22, 1983.
18. Mauk F., Cox J. A. *Biochemistry*, v. 22, p. 5580—5586, 1983.
19. Levin R. M., Weiss R. *J. Pharmacol.*, v. 13, № 2, p. 690—697, 1977.
20. Weiss P., Prozialeck W., Cimino M. *Adv. Cycl. Nucl. Res.*, v. 12, p. 213—225, 1980.
21. Orose F., Christova T. Y., Ovadi J. *Mol. Pharmacology*, v. 33, p. 678—682, 1988.
22. Engvall E. *Methods in Enzymol.*, v. 70, p. 419—439, 1980.
23. Charbonneau U., Cormier M. J. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 90, p. 1039—1047, 1979.
24. Wallace J. W., Cheung W. J. *J. Biol. Chem.*, v. 254, p. 6564—6571, 1979.
25. Tijssen P., Kurstak E. —In: *Viral Immunodiagnosis* (eds. Kurstak E., Mortisset R.) p. 125. Academic Press, New York, 1974.
26. Van Eldik L. J., Watterson D. M. —In: *Calcium Physiology* (ed. Marme D.), Springer, Berlin, p. 215—226, 1984.
27. Yagi K., Yazawa M., Kakiuchi S., Ohshima M., Uenishi K. *J. Biol. Chem.*, v. 253, № 5, p. 1338—1343, 1978.
28. Blumenthal D. K., Stall J. T. *Biochemistry*, v. 19, p. 5608—5614, 1980.
29. Van Eldik L. J., Watterson D. M. *J. Biol. Chem.*, v. 256, p. 4205—4210, 1981.
30. Zuklys K., Kramer J., Magocsi M., Ovadi J. *Immun. Letter* (in press) 1990.

Поступила 19.III 1990