

УДК 677.15.024

Академик АН Армении А. А. Галоян

Кальциум-кальмодулин заменяющие пептидные системы (ККЗПС) гипоталамуса—новый уровень регуляции кальмодулин активированных ферментов

(Представлено 18/VII 1991)

Из гипоталамуса крупного рогатого скота были выделены ряд кардиоактивных пептидов (ККЗПС), регуляторы кальмодулин (КМ) активированных ферментов (фосфодиэстераза циклических нуклеотидов (ФДЭ), киназа легкой цепи миозина (КЛЦМ), киназа фосфорилазы, кальцинейрин и т. д.). Эти пептиды являются регуляторами активности сердца и тонуса гладкой мускулатуры. По метаболической активности ККЗПС можно разделить на три основные группы: 1) факторы, транслоцирующие и освобождающие ионы кальция из саркоплазматического ретикулума (СР) и цитоплазмы кардиомиоцитов во внеклеточное пространство. К таким веществам относятся нейрогормон «С» и его структурные аналоги (^{1, 2}), 2) КМ связывающие Ca^{2+} -независимые активаторы ФДЭ, КЛЦМ (Пф₁—Рф₁) (^{3, 4}). Первичная структура трех пептидов была установлена (Ф. Лочбах, Н. Бархударян, А. Галоян) в 1990 г. Пф₁—VVYRW, Пф₂—VVYRWT, Рф₃—LVVYWT. Они соответствуют 33—37, 33—38, 32—38 фрагментам β-цепи Hb. Удалось выделить из гипоталамуса полипептид, фрагменты которого (ПП₁—ПП₃) имеют следующую структуру: ПП₁—VVAGVANALAHRYII, ПП₂—ASHLPSDFTPAVHAS, ПП₃—HLPSDFTPAVHASLD. Они соответствуют структурным Hb быка 132—145, 110—124 и 112—126 соответственно. Роль последних пептидов в регуляции КМ активированных ферментов изучается. Как нативные Пф₁, Пф₂, Пф₃, так и их синтетические формы, связываясь с КМ Ca^{2+} -независимым образом, активируют КЛЦМ и фосфорилирование ЛЦ₂ увеличивается на 80—100%. При инкубации КМ+ЕГТА+РДЕ ФДЭ+Пф₁₋₃ (когда исключается Ca^{2+} и лишь действует КМ) Пф₁₋₃ активируют ФДЭ более чем в 4 раза; 3) регуляторы КМ активированных ферментов без участия Ca^{2+} и КМ (С-модулины).

Ранее описанными нами методами экстракции, гельевой фильтрации и ионообменной хроматографии, а также ВЭЖХ хроматографии

удалось выделить 5 пептидов, оказывающих мощное стимулирующее влияние на базальную активность ряда КМ-зависимых ферментов (ФДЭ, КЛЦМ и т. д.) в концентрациях 10^{-12} М и ниже (5, 6, 7). То есть нами был открыт новый уровень регуляции КМ активируемых ферментов. В указанных концентрациях Ca^{2+} -КМ система совершенно не действует. Более того, эти пептиды не нуждаются в ионах Ca^{2+} . С-модулины являются Ca^{2+} -независимыми аллостерическими регуляторами активности Ca^{2+} -КМ зависимых ферментов. По-видимому, они являются универсальными заменителями Ca^{2+} -кальмодулиновой системы. Методами масс-спектрального анализа (на Финниган TSQ 700), а также микросеквенирования расшифровали первичную структуру двух из С-модулинов (C_1 , C_3), подвергнув Эдмановской деградации С-модулин 3, N-конец которого был ацетилирован. Поэтому мы подвергли протеолитическому частичному гидролизу С-3 эндолизином-С. Более 14 пептидных фрагментов изолировали ВЭЖХ с использованием ацетонитрил + 0,08% ТФУ (линейный градиент 0—30%). Определяли молекулярные массы как нативного С-3 так и двух его фрагментов (таблица).

Масс-спектральные данные интактного С-3
и фрагментов после расщепления
Эндо-лизином С

Образец	МВ (наблюдаемый)	МВ (вычисленный)
Интактный С-3	4518,9	4619,2
Фрагмент 1	1303,9	1304,6
Фрагмент 8	655,8	655,4

Микросеквенирование показало, что фрагмент 1 соответствует β_4 -тимозину (1—11), фрагмент 8 — $T\beta_4$ (26—31), молекула С-3 является $T\beta_4$ (1—39).

Первичная структура С-3: AcSDKPDMAEIE¹⁰KFDKS¹⁵KLKKT²⁰ETQEK²⁵NPLPS³⁰KETIE³⁵QEKQ³⁹ (А. Галоян, Б. Гурвиц, М. Девис, Т. Ли, Дж. Шайвели, 1990).

Анализ первичной структуры С-3 позволяет полагать, что основные участки молекулы С-3, ответственные за биологическую активность, должны быть в районе 16—38 молекулы С-3. Более того, такими участками оказались участки KFDKSKLKK ($T\beta_4$ ¹¹⁻¹⁹) и KNPLSK ($T\beta_4$ ²⁵⁻³¹). Стимулирующий эффект С-3 на базальную активность КЛЦМ и ФДЭ сравнивали с эффектом $T\beta_4$ ¹⁰⁻³⁸, $T\beta_4$ ²⁶⁻³¹, $T\beta_4$ ¹¹⁻¹⁹, а также КМ + Ca^{2+} и Ta_1 . По моей просьбе М. И. Титов синтезировал $T\beta_4$ ²⁵⁻³¹ и $T\beta_4$ ¹¹⁻¹⁹. Степень стимуляции активности ферментов следующая: С-3 > $T\beta_4$ ¹⁰⁻³⁸ > $T\beta_4$ ¹¹⁻¹⁹, $T\beta_4$ ²⁵⁻³¹, КМ + Ca^{2+} > Ta_1 .

Таким образом, открыт новый коронаросуживающий полипептид в гипоталамусе ($T\beta_4$ ¹⁻³⁹) с совершенно новыми, до сих пор неизвестными функциями.

Будучи уникальным активатором Ca^{2+} -КМ активируемых ферментов без участия Ca^{2+} и КМ (7) тимозины являются фундаментальными регуляторами метаболизма клетки и, вероятно, выполняют ряд других функций наряду со стимулирующей ролью в иммуногенезе (8, 9).

Получен индивидуальный С-модулин I с помощью ВЭЖХ на реверз фазах (C_{18}), а также установлен его первичная структура. Он оказался дипептидом следующей структуры: RF В литературе имеются некоторые сведения о наличии фрагментов Нв и подобных пептидов в мозгу (10). Проводятся исследования по синтезу и изучению биологического действия С-модулина I.

Можно полагать, что С-модулины являются универсальными аллостерическими регуляторами КМ-активируемых ферментов (КЛЦМ, ФДЭ, фосфоорилаза киназа, протени киназа).

Источниками кардиоактивных, метаболически активных, Ca^{2+} -КМ-заменяющих пептидных систем мозга являются нейросекреторные гранулы нейрогипофиза и гипоталамуса, синапсосомы и водорастворимые белки гипоталамуса. С-модулины, а также КМ-связывающие пептиды являются коронаросуживающими агентами, в то время как множественные формы нейрогормона «С» (транслокаторы ионов Ca^{2+} в цитоплазме) — коронарорасширяющими агентами. Эти все выводы подтвердились в опытах *in vivo* и *in vitro*.

На основании накопленного большого экспериментального материала (11, 12) выдвигаются основные пути молекулярных механизмов действия кардиоактивных нейропептидов на цикл сокращения—релаксации гладкой мышцы коронарных сосудов.

Нейрогормон «С» (НС) и его множественные формы являются ингибиторами ФДЭ и КЛЦМ. Они также являются рилизинг (выделяющими) факторами ионов Ca^{2+} из СР и сарколеммы во внеклеточное пространство. Это создает условие разрушения (или необразования) комплекса Ca^{2+} -КМ-КЛЦМ, так как концентрация Ca^{2+} снижается в клетке до 10^{-8} — 10^{-7} М. Вместе с тем прямое ингибирование КЛЦМ нейрогормоном «С», а также увеличение цАМФ в клетке являются дополнительными факторами релаксации гладкой мышцы (и в частности коронарных сосудов). Дефосфорилирование миозина является важным фактором релаксации.

С-модулины или Пф₁₋₅, наоборот, сильно активируют как ФДЭ, так и КЛЦМ, что создает дефицит цАМФ в клетке и увеличивает степень фосфорилирования легкой цепи миозина, являющегося условием сокращения.

Из гипоталамуса мы видели также Тв₁ (убиквитин)-ингибитор ЦАМР и ФДЭ КЛЦМ, вероятно, путем связывания с КМ.

Подлежит глубокому анализу также изучение гормонов иммунной системы на промежуточный обмен клетки и, в частности, на активность КМ-зависимых ферментов и процессов.

Представляет общебиологический интерес изучение становления ККЗПС в онтогенезе животных по сравнению с Ca^{2+} —КМ—системой регуляции.

Институт биохимии им. Г. Х. Бунятыана
Академии наук Армении

Հայաստանի ԳԱ ակադեմիկոս Ա. Ա. ԳԱԼՈՅԱՆ

Հիպոթալամուսի կալցիում-կալմոդուլին փոխադրվող պեպտիդային համակարգությունները՝ նոր մակարդակ կալմոդուլինով ակտիվացնող ֆերմենտների կանոնավորման

Հայտնաբերված է հիպոթալամուսից անջատված 3 կարգի պեպտիդային համակարգությունների հիմնարար նոր հատկությունները: Նրանք ակտիվացնում են կալցիում-կալմոդուլին կախյալ ֆերմենտներին առանց կալցիումի և կալմոդուլինի ներկայությամբ: Պարզված է որոշ նեյրոպեպտիդների քիմիական կառուցվածքը և վերջիններիս կենսաբանական հատկությունները: Քիմոզինների խմբին պատկանող պեպտիդներից մեկը (С-մոդուլին 3-ը) կազմված է 39 ամինաթթուներից և պատկանում է թիմոզին 13₁ ընտանիքի՝ Բացվում են նոր հեռանկարներ իմմունային համակարգության կանոնավորման մոլեկուլյար նոր մեխանիզմների պարզաբանման ուղղությամբ, ինչպես նաև պսակաձև շրջանառության վրա С-մոդուլինների ազդեցության մոլեկուլյար մեխանիզմների վերաբերյալ: Հիպոթալամուսից անջատված է Թβ₁ (ուրիկվիտին), որը ընկճում է նշված ֆերմենտի ակտիվությունը և արտադրում է կալմոդուլինի հետ:

ЛИТЕРАТУРА — ԳՐԱԿԱՆՈՒԹՅՈՒՆ

- 1 А. А. Галоян, Нейрохимия, т. 6, № 1, (1987).
- 2 А. А. Галоян, Нейрохимия, т. 9, № 2, (1990).
- 3 А. А. Галоян, Н. А. Бархударян, К. Валко и др., Нейрохимия, т. 7, № 2, 1988.
- 4 А. А. Galoyan, N. Barkhudaryan, J. Ovadi, Proc. the 7-th USSR—FRG Symposium on chemistry of proteins and peptides, Dilijan, 1989.
- 5 А. А. Галоян, Б. Я. Гурвиц, Нейрохимия, т. 5, № 4 (1987).
- 6 А. А. Галоян, Н. Д. Бабрускин, Б. Я. Гурвиц и др., Нейрохимия, т. 8, № 1, 1989.
- 7 А. А. Galoyan, B. Ya. Gurvitz, N. P. Sharova, Neurochemical Res., v. 11, № 2, (1989).
- 8 А. L. Goldstein e. a., PNAS USA, v. 56 (1966).
- 9 B. L. Spangelo, N. R. Hall, A. L. Goldstein Annales of the New York Academy of Sciences, v. 496, p. 196 (1987).
- 10 A. B. Shally e. a., Polypeptide Hormones, Eds. R. G. Beers, J. and E. G. Bassett, Raven Press, N. Y., p. 169, 1980.
- 11 А. А. Galoyan, Neurochemical Res, v. 11, № 6 (1986).
- 12 А. А. Galoyan, G. Kevoorkian, L. Voskanyan, e. a., Neurochemical Res., v. 13, № 5, 1988.