

УДК 577.1527277:612.8.015

Академик А.А. Галоян, Н.О. Мовсесян, Н.Х. Алчуджян

Регуляторное влияние пептидов гипоталамуса на процессы посттрансляционной модификации белков синаптических мембран мозга

(Представлено 23/XI 1999)

Ранее нами из растворимой фракции гипоталамуса крупного рогатого скота были выделены пептиды и ряд белков, которые являются первичными активаторами Ca^{2+} -кальмодулин-зависимых ферментов-фосфодиэстеразы циклических нуклеотидов, киназы легких цепей миозина (цАМФ ФДЭ, КЛЦМ и т.д.), так как в концентрациях 10^{-12} - $10^{-9}M$ активируют вышеуказанные ферменты без участия ионов кальция и кальмодулина (CaM). Удалось расшифровать их полную первичную структуру [1]. Ими оказались тимозин β_4 (1-39), или С-модулин 3, который согласно литературным данным принимает участие в механизмах межклеточной сигнализации, иммунитета и эндокринной регуляции [2], и дипептид *Arg-Phe* (RF), который повышает в 2-3 раза уровень норадреналина, стимулируя симпатические нервные окончания [3]. Таким образом, впервые были открыты фундаментальные биохимические механизмы действия тимозинов ($T\beta_4$, 1-39, $T\beta_9$).

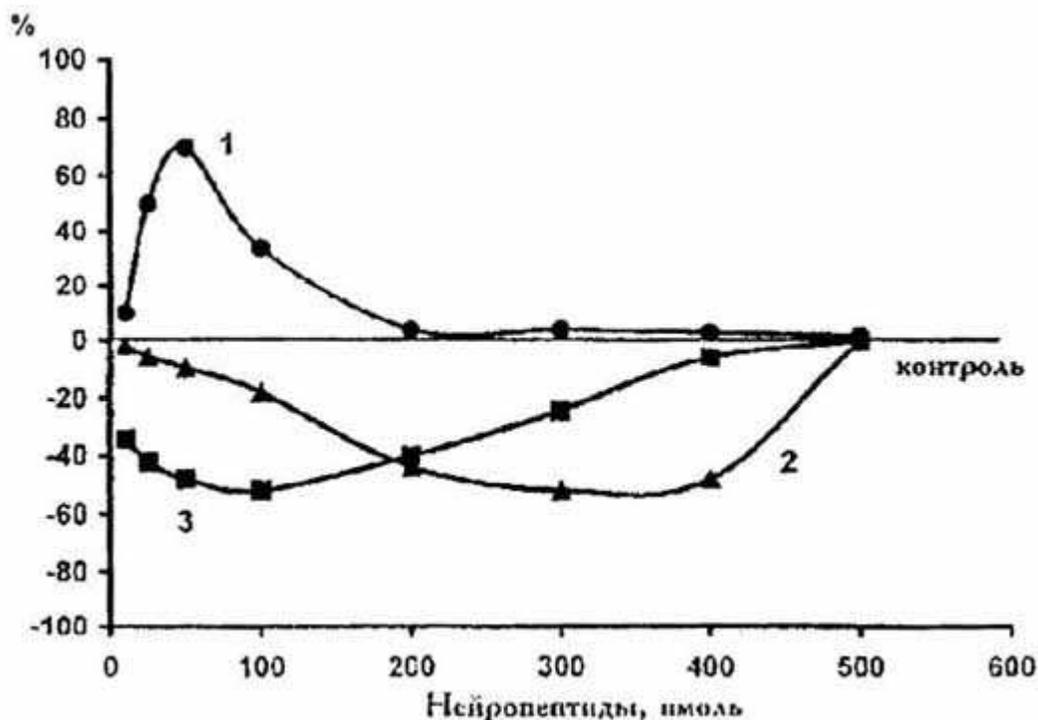
Представляет интерес выяснить эпиптопы в структуре С-модулина-3 ($T\beta_4$, 1-39) в отношении АДФ-рибозилирования, ответственные за биологическую активность молекулы. А.А. Галоян выдвинул идею о том, что фрагменты С-модулина-3, содержащие наибольшее количество лизиновых остатков (в составе $T\beta_4$, 1-39 имеется 9 лизиновых остатков) являются носителями активности. Опыты показали, что 25-31 и 11-19 фрагменты С-модулина-3 (*Lys-Asn-Pro-Leu-Pro-Ser-Lys* (KNPLPSK) и *Lys-Phe-Asp-Lys-Ser-Lys-Leu-Lys-Lys* (KFDKSKLKK), содержащие 2 и 5 лизиновых остатка, воспроизводят активирующее влияние целой молекулы на цАМФ ФДЭ, КЛЦМ без участия ионов кальция и CaM и участвуют в регуляции сократительных процессов [4].

Учитывая важное значение С-модулина-3 в нейротрансмиссии, регуляции иммунной системы мозга, его роли в биосинтетических процессах циклических нуклеотидов, принимающих участие в реакциях фосфорилирования и дефосфорилирования, представляет интерес изучить влияние указанных фрагментов, а также *Arg-Phe* на процессы посттрансляционной модификации белков нейрональных мембран, в частности АДФ-рибозилирования, так как фосфорилирование и АДФ-рибозилирование являются реципрокными системами. МоноАДФ-рибозилирование, модифицируя киназу фосфорилазы, подавляет процессы фосфорилирования цАМФ-зависимыми и цАМФ-независимыми киназами [5], в то же время АДФ-рибозилирование обратимо подавляет активность АТФ-азы G-актина и полимеризацию мышечного и неммышечного G-актина [6], а взаимодействие $T\beta_4$ с актином препятствует полимеризации последнего [3]. Исходя из вышеизложенного нами было сделано предположение, что указанные нейропептиды могут реализовывать свое влияние на гладкую мускулатуру, иммунный ответ и

выполнять те или иные функции, воздействуя на АДФ-рибозилирование соответствующих белковых субстратов. В настоящей работе получены экспериментальные данные, свидетельствующие в пользу этой гипотезы.

Опыты проводили на самцах белых беспородных крыс массой 150-200 г. Синаптосомы выделяли из коры больших полушарий мозга по методу Витаккера, подвергали осмотическому шоку в воде при 0–25° С и получали синаптические мембраны (СМ) по методу Абита, как было описано нами ранее [7]. Уровень эндогенного АДФ-рибозилирования определяли по включению меченого АДФ-рибозильного остатка *NAD* в белки СМ. Состав инкубационной смеси: 50 мМ *Tris-HCL*, рН 7,5; 84 пмоль [*Adenin*¹⁴C] *NAD* 0,5 мМ дитиотрейтол; 150 мкг белка СМ. В инкубационную смесь добавляли синтезированные гипоталамические пептиды - RF, KFDKSKLKK и KNPLPSK, содержание которых в пробе варьировали от пикомолярных количеств до 400 нмоль (общий объем пробы - 0,35 мл). Пробы инкубировали при 26° С 120 мин, реакцию останавливали 25% ТХУ. Осадок наносили на фильтры ("Millipore" США, размер пор 0,65 мкм) и последовательно промывали 10 мл 25% ТХУ и 15 мл этанолом. Фильтры высушивали, помещали в сцинтиляционные флаконы, растворяли в 0,45 мл диметилсульфоксида и инкубировали при 37° С 60 мин, радиоактивность образцов измеряли, используя сцинтиллятор Брея на сцинтилляционном счетчике SL-4221 ("ntertechnique", Франция). Белки определяли по методу Бредфорда [8]. Статистическая обработка результатов проводилась по *t*-критерию Стьюдента.

Ранее нами было показано, что в СМ коры больших полушарий мозга крыс имеют место реакции эндогенного ферментативного полиАДФ-рибозилирования, а также аргинин, цистеин и гистидин специфического моноАДФ-рибозилирования, неферментативного АДФ-рибозилирования обнаружено не было [7]. В данной работе исследовалось влияние гипоталамических пептидов (дипептид-RF и 11-19 и 25-31 фрагменты $T\beta_4$ (нонапептид, KFDKSKLKK, и гептапептид, KNPLPSK) на процессы ферментативного АДФ-рибозилирования белков СМ мозга крыс. Нейропептиды и СМ инкубировали в присутствии меченого *NAD*. Пикомолярные количества не оказывали никакого воздействия на АДФ-рибозилирование - при повышении дозы пептидов эффект также нивелировался.



Дозозависимое изменение включения меченых АДФ-рибозильных остатков в акцепторные

белки синаптических мембран церебрального кортекса крыс под влиянием нейропептидов (1 - гептапептид, 2 - нонапептид, 3 - дипептид). По оси абсцисс - содержание в пробе пептидов в нмоль, по оси ординат - эндогенное АДФ-рибозилирование белков СМ в процентах по отношению к контролю ($n=6$. $p < 0,05$, $M \pm m$).

На рисунке представлены кривые доза-эффект при содержании в пробе 50-100 нмоль исследуемых нейропептидов. Дипептид и нонапептид, содержащий 5 остатков лизина, подавляют эндогенное АДФ-рибозилирование, причем максимальное ингибирование до 50% достигалось при добавлении в пробу 300 нмоль дипептида или 100 нмоль нонапептида. В отличие от них гептапептид, содержащий лишь 2 остатка лизина, стимулировал АДФ-рибозилирование, повышая включение метки до 66% при 50 нмоль в пробе. Ингибирование эндогенного АДФ-рибозилирования дипептидом, возможно, связано с тем, что последний содержит остаток аргинина, а значит, может служить субстратом для аргинин-специфической АДФ-рибозилтрансферазы и конкурировать с акцепторными белками СМ. Нонапептид не содержит акцепторных аминокислот для моноАДФ-рибозилтрансферазы, но его 5 остатков лизина - акцепторы для полиАДФ-рибозилирования. Гептапептид, содержащий лишь два остатка лизина, оказывает на общее эндогенное АДФ-рибозилирование противоположное действие.

Выявленное нами дозозависимое разнонаправленное действие гипоталамических нейропептидов на эндогенное АДФ-рибозилирование белков синаптических мембран клеток мозга указывает на возможные молекулярные механизмы их влияния на синаптические процессы. Воздействуя на полиАДФ-рибозилирование, они могут влиять также на пролиферацию и дифференциацию иммунокомпетентных Т-лимфоцитов [9]. Влияя же на моноАДФ-рибозилирование, нейропептиды могут регулировать

концентрацию внутриклеточного кальция, так как аргинин- и цистеин-специфические АДФ-рибозилтрансферазы, взаимодействуя с G-белками, влияют на проведение внешних сигналов от рецепторов к таким эффекторным системам, как аденилатциклаза, фосфолипазы C, A₂ и D, а также ионные каналы [10], кроме того моноАДФ-рибозилирование ингибирует глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназу, подавляя самосборку триад в саркоплазматическом ретикулуме и выброс Ca²⁺[11], понижает уровень Ca²⁺ в диплоидных фибробластах человека [10].

По мнению А.А. Галояна, действие гипоталамических пептидов реализуется через сложный механизм взаимовлияния последних в системе актин-актомиозин, а также активирования процессов посттрансляционной модификации - эндогенного АДФ-рибозилирование. Дальнейшие исследования прольют свет на реципрокную связь Ca²⁺-зависимых и Ca²⁺-независимых путей регуляции внутриклеточных процессов, лежащих в основе важнейших физиологических реакций организма.

Институт биохимии им. Г.Х. Бунятына НАН РА

Литература

1. Galoyan A.A. Biochemistry of Novel Cardioactive Hormones and Immunomodulators of the Functional System Neurosecretory Hypothalamus- Endocrine Heart. Moscow: Nauka Publishers, 1997.
2. Safer D., Erlinga M., Nachimas V.T. - J. Biol. Chem. 1991. V. 266. № 7. P. 4029-4039.
3. Thiemerman C., Al-Damluji S., Hecker M., Vane J.R. - Biochem. Biophys. Res. Commun. 1990. V. 172. № 3. P. 705-708.
4. Галоян А.А., Бабрускин И.Д., Гурвиц Б.Я., Абрамян Г.Е. - Нейрохимия. 1989. Т. 8. № 1. С. 78-86.
5. Tsuchiya M., Tanigawa Y., Ushiroyama T., Matsuura R., Shimoyama M. - Eur. J. Biochem. 1990. V. 147. № 1. P. 33-40.
6. Just I., Geipel H., Wegner A., Actories K. - Eur. J. Biochem. 1990. V. 192. № 5. P. 723-727.
7. Мовсесян Н.О., Бурназян Л.Б., Арутюнян А.В. - Нейрохимия. 1992. Т. 11. № 1. С. 41-47.
8. Bradford M.M. - Anal. Biochem. 1976. V. 72. № 2. P. 248-254.
9. Spagelo B.L. - Front Neuroendocrinology, 1987. V. 16. № 1. P. 122.
10. Ui M. In: ADP-ribose transfer reaction/ Ed. Jacobson M.K., Jacobson E.L. New York: Springer-Verlag, 1989. P. 386-389, 414-457.
11. Dimmler S., Lottspeich F., Brune B. - J. Biol. Chem. 1992. V. 267. № 24. P. 16771-16774.

Ակադեմիկոս Ա. Ա. Գալոյան, Ն. Հ. Մովսիսյան, Ն. Խ. Ալշուջյան

Հիպոթալամուսի պեպտիդների կարգավորիչ ազդեցությունը ուղեղի սինապտոսոմային թաղանթների սպիտակուցների հետտրանսլյացիոն մոդիֆիկացիայի վրա

Հետազոտվել է խոշոր եղջերավոր անասունների հիպոթալամուսից անջատած պեպտիդների ազդեցությունը առնետի գլխուղեղի սինապտոսոմային թաղանթների սպիտակուցների էնդոգեն ԱԿՖ-ռիբոզիլացման վրա: Կալմոդուլին-կախյալ ֆերմենտների Ca^{2+} -անկախ խթանիչներ *Arg-Phe* դիպեպտիդը և թիմոզին β_4 -ի 11-19 և 25-31 ֆրանգմենտները ազդում են ՆԱԴ-ի նշված ԱԿՖ-ռիբոզիլային մնացորդների ներառմանը սինապտոսոմային թաղանթների ակցեպտորային սպիտակուցներում: Ցույց է տրվել դոզակախյալ ազդեցությունը՝ հեպտապեպտիդը խթանում է 66%, իսկ նոնապեպտիդը և դիպեպտիդը արգելակում են (50%) էնդոգեն ԱԿՖ-ռիբոզիլացումը: Քննարկվում են նեյրոպեպտիդների ազդեցության հնարավոր մեխանիզմները: