

## ПОИСК ЭНДОГЕННЫХ ПЕПТИДНЫХ ЛИГАНДОВ БЕНЗОДИАЗЕПИНОВЫХ РЕЦЕПТОРОВ: ВЫДЕЛЕНИЕ И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

БРУСОВ О. С., ЯКОВЛЕВ А. Г., ПЛОТНИКОВ В. В., \*БАРАМ Г. И.,  
\*ГРАЧЕВ М. А., \*\*КУМАРЕВ В. П., КУДРЯКОВА Т. Б.,  
\*\*БОРОВКОВ А. А., \*\*КОБЗЕВ В. Ф.

ВНЦ психического здоровья АМН СССР, Москва;

\*НИИ биоорганической химии СО АН СССР, \*\*НИИ цитологии и генетики  
СО АН СССР, Новосибирск

Разработана схема разделения индивидуальных пептидов, включающая высокоэффективную твердофазную экстракцию и микроколоночную хроматографию. На основе этого перехода из гипофиза быка был выделен в гомогенном виде пептидный ингибитор специфического связывания диазепам, который был нами назван пептид 2-2-1. Он обладает высоким сродством к бензодиазепиновым (БЗ) рецепторам и содержится в значительной концентрации в ткани гипофиза. Предпринята попытка идентифицировать ген пептидного ингибитора специфического связывания <sup>3</sup>H-диазепам.

Обнаружение высокоаффинных мест специфического связывания психотропных препаратов и последующее открытие эндогенных опиоидных пептидов—лигандов морфинорецепторов привело к предположению о возможности существования эндогенных лигандов к основным группам лекарственных рецепторов. Во многих лабораториях с начала 80-х годов были начаты систематические работы по выделению подобных лигандов. Наибольшие усилия были направлены на поиск лигандов к бензодиазепиновым рецепторам. Однако до настоящего времени эти усилия не увенчались успехом.

В связи с этим рассмотрим какие же проблемы приходится решать при проведении такого поиска. Обратимся с этой целью к понятию эндогенного лиганда нейронного рецептора. Эндогенными лигандами принято обозначать гипотетические природные соединения, синтезирующиеся в физиологических условиях и попадающие в место действия в количествах, достаточных для реализации психотропного эффекта в результате взаимодействия с соответствующими лекарственными рецепторами ЦНС. Очевидно, что стратегия поиска лигандов должна включать этапы изучения химической структуры ингибиторов специфического связывания психотропного препарата, а также доказательства участия обнаруженных ингибиторов в модуляции *in vivo* активности лекарственных рецепторов ЦНС и, как следствие, в регуляции психического статуса человека и животных. Какая часть этой обширной программы уже выполнена? В настоящее время в биологических объектах выявлен ряд соединений различной структуры, способных снижать специфическое связывание диазепам [1]. Однако до сих пор не установлено, способны ли эти ингибиторы модулировать в физиологических условиях активность нейронов путем взаимодействия с БЗ-рецепторами. Поэтому вопрос о существовании эн-

догенных лигандов к этим рецепторам остается все еще открытым. На наш взгляд, дальше других в этом направлении удалось продвинуться группе сотрудников, руководимых д-ром Costa в США, которые обнаружили, выделили в гомогенном виде и частично охарактеризовали структуру пептида-ингибитора специфического связывания диазепама, названного ими DBI [2]. В опытах на животных этот пептид обладал выраженным анксиогенным действием, которое снималось введением диазепама или антагониста бензодиазепиновых рецепторов—соединения Ro-15-1788. Изучение распределения этого пептида в головном мозгу показало, что он локализован в основном в пределах ГАМК-ергических структур. На этом основании была выдвинута гипотеза о том, что DBI является котрансмиттером ГАМК, модулирующим *in vivo* функциональную активность ГАМК-рецепторов в пределах ГАМК-бензодиазепинового рецепторного комплекса [3, 4].

При трипсинолизе этого пептида был выделен активный, содержащий 18 аминокислот фрагмент, способный связываться с БЗ-рецепторами и обладающий сходной фармакологической активностью [3, 4]. Однако микромолярное средство DBI и его фрагментов к БЗ-рецепторам заставляет сомневаться в участии этих пептидов в регуляции ГАМК-ергической нейротрансмиссии *in vivo*.

*Выделение пептидного ингибитора специфического связывания <sup>3</sup>H-диазепама из ткани гипофиза теленка.* Во Всесоюзном научно-исследовательском центре психического здоровья АМН СССР совместно с Новосибирским научно-исследовательским институтом биоорганической химии СО АН СССР был также предпринят поиск эндогенных лигандов БЗ-рецепторов в пределах класса нейропептидов. Мы исходили из того, что биоактивные нейропептиды представляют собой нейромодуляторы, то есть взаимодействуют с нейронными структурами наподобие психотропных соединений. Кроме того, такие эксперименты дают непосредственный выход на структуры соответствующих генов и открывают большие возможности для молекулярно-генетических и биотехнологических исследований. С этой целью была разработана схема разделения индивидуальных пептидов, включавшая высоксоэффективную твердофазную экстракцию на предварительных этапах и микроколоночную хроматографию на конечных стадиях их выделения. Это позволило резко сократить время и повысить эффективность разделения индивидуальных пептидов и снизить вероятность образования артефактных продуктов. На основе этого подхода из гипофиза быка был выделен в гомогенном виде пептидный ингибитор специфического связывания диазепама, обладающий высоким сродством к бензодиазепиновым рецепторам и содержащийся в ткани гипофиза в значительной концентрации. Этот пептид в дальнейшем будем обозначать как пептид 2-2-1.

На рис. 1 приведена общая схема выделения пептидного ингибитора из гипофиза быка. Ипользованный нами метод Барама и соавт. [5] для выделения индивидуальных пептидов из гипофиза является общим по отношению ко всем пептидам с величиной  $M_r$  до 10 кД. Он заклю-

чается в кислотной экстракции пептидов из гомогенатов ткани, концентрировании их на обращенной фазе и каскада обратнoфазных хроматографий в градиенте ацетонитрила в трис-фторацетатном буфере при нейтральном значении рН (рН 7) с последующим рехроматографированием выделенных пиков при рН 2 в градиенте ацетонитрила, содержащего 0,1% трифторуксусной кислоты. Разделение проводили при вы-

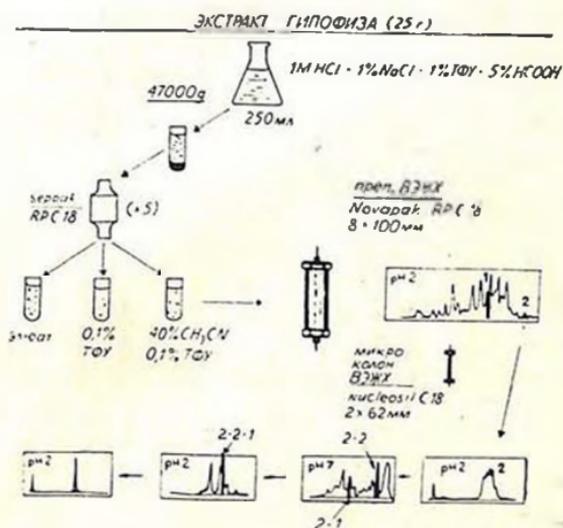


Рис. 1. Схема очистки из ткани гипофиза теленка пептидного ингибитора специфического связывания <sup>3</sup>H-диазепама

сокой нагрузке на колонку, а последние хроматографические этапы выполняли на микроколонках объемом 200 мкл. Значительное изменение селективности, вызванное изменением рН и природы ион-парного реагента, позволило полностью разделять компоненты фракций после препаративной колонки. Использование микроколоночной хроматографии дало возможность избежать потерь материала, которые обычно происходят в случае разбавленных растворов. Во всех хроматографических экспериментах проводили 2-волновую детекцию: при 210 и 280 нм, используя многоволновой детектор типа «Милихром» (СССР) с объемом проточной кюветы 1,5 мкл [6]. Это давало возможность выявлять содержание ароматических аминокислот и оценивать гомогенность выделяемых пептидов. Ингибирующую активность фракций по отношению к связыванию <sup>3</sup>H-диазепама с мембранами коры больших полушарий головного мозга теленка определяли по методу Mohler, Okada [7].

После разделения экстракта на препаративной колонке был получен хроматографический профиль, представленный на рис. 2. Видно, что в анализируемом материале содержалось 2 фракции, ингибирующие специфическое связывание диазепама. Дальнейшей очистке подвергал только 2-й пик, так как он был менее загрязнен примесями.

Данный материал наносили на микрокололку в кислой среде (кололка  $2 \times 62$  мм, Nucleosil 5C18, элюция линейным градиентом ацетонитрила от 0 до 50%, содержащего 0,1% трифторуксусной кислоты с рН 2 со скоростью 50 мкл/мин в течение 20 мин). Было обнаружено, что исходная фракция элюировалась в виде группы соединений, близких по хроматографической подвижности. При этом вся ингибирующая активность была локализована в пределах этой группы пиков (данные не показаны).

В связи с этим, для повышения эффективности разделения была

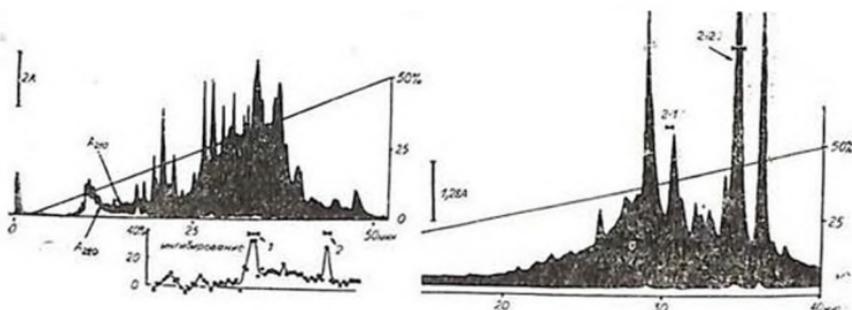


Рис. 2. Профиль элюции кислотного экстракта ткани гипофиза теленка (2,5 г) после обращеннофазовой хроматографии на полупрепаративной колонке ( $8 \times 100$  мм) с сорбентом NovaPack 5C18. Колонку элюировали линейным градиентом ацетонитрила от 0 до 50%, содержащим 0,1% трифторуксусной кислоты, со скоростью 2 мл/мин в течение 50 мин. Собрали 50 фракций объемом 0,5 мл, каждую из которых тестировали на способность ингибировать специфическое связывание  $^3\text{H}$ -диазепама. В верхней части рисунка представлен профиль УФ-поглощения материала при 210 нм (верхний профиль) и 280 нм (нижний профиль). В нижней части рисунка представлена ингибирующая способность фракций в % от контроля

Рис. 3. УФ-профиль поглощения (210 и 280 нм) при элюции активного материала, полученного после микрокололочной хроматографии Nucleosil 5C18 при рН 2, при рехроматографии в нейтральных условиях. Колонку ( $2 \times 62$  мм) с сорбентом Nucleosil 5C18 элюировали линейным градиентом ацетонитрила от 0 до 50%, содержащим 0,1%-ный трис-трифторацетатный буфер рН 7, со скоростью 50 мкл/мин в течение 40 мин. Фракции, ингибирующие специфическое связывание  $^3\text{H}$ -диазепама, выделены на рисунке и обозначены как 2-1 и 2-2

изменена селективность колонки посредством изменения рН и природы ион-парного реагента. Активный материал после предыдущей хроматографии был объединен и рехроматографирован в этих новых условиях. Нанесенный материал разделился на большое число пиков (рис. 3). Анализ полученных фракций показал наличие ингибирующей активности в пределах фракций, обозначенных на рис. 3 как фракции 2-1 и 2-2, которые затем были рехроматографированы в кислой среде. Фракция 2-1 после хроматографии разделилась на ряд пиков, при этом вся ингибиторная активность ассоциировалась только с одним из этих пиков (данные не по-

казаны). К сожалению, количество вещества в этом пике было недостаточно для его дальнейшего анализа. Фракция 2-2 после рехроматографии также разделалась на ряд УФ-пиков (рис. 4). Ингибирующая активность была ассоциирована с 3-мя фракциями. Максимальная активность была локализована в 1-й фракции. Поэтому дальнейший анализ проводили именно с этой фракцией. Для контроля чистоты этой фракции ее вновь хроматографировали в тех же условиях (рис. 5). Отношение величин поглощения при 210 и 280 нм оставалось постоянным вдоль всего его профиля, что указывает на гомогенность этой фракции.

Для доказательства пептидной природы выделенного пика он был подвергнут трипсинолизу. На рис. 6 представлен профиль элюции триптических фрагментов выделенного соединения. В верхней части рис. 6 изображен соответствующий профиль элюции материала, полученного после инкубации трипсина с буфером в аналогичных условиях, что является контролем на возможное загрязнение материала продуктами гидролиза самого трипсина. В области локализации исходного соединения пики от-

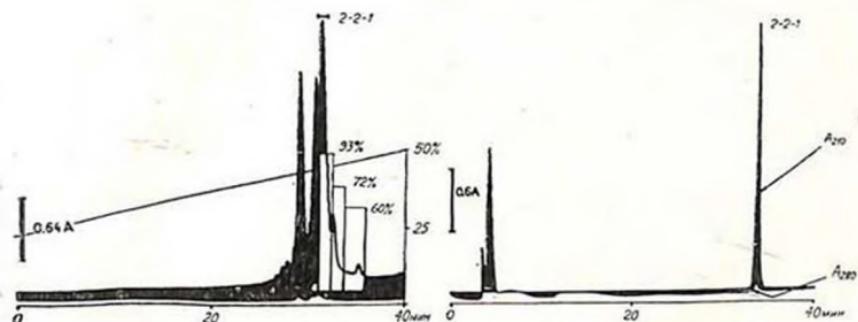


Рис. 4. Профиль элюции фракции 2-2 после рехроматографии на микроколонке при pH 2. Колонку (2×62 мм) с сорбентом Nucleosil 5C18 элюировали линейным градиентом ацетонитрила с 20 до 50%, содержащим 0,1% трифторуксусной кислоты pH 2, со скоростью 50 мкл/мин в течение 40 мин. Открытыми столбиками обозначено ингибирование специфического связывания  $^{3}H$ -диазепама активными фракциями в %. Для дальнейшего анализа была взята фракция, ингибирующая связывание на 93% (фракция пептида 2-2-1)

Рис. 5. Профиль элюции фракции пептида 2-2-1 после рехроматографии на микроколонке при pH 2. Условия хроматографии приведены на рис. 4

сутствуют. Эти данные однозначно показывают, что выделенное вещество являлось пептидом. Поскольку триптическая карта достаточно проста, величина  $M_r$  выделенного пептида (пептид 2-2-1), по-видимому, невелика. Следует заметить, что количество триптических фрагментов в пептиде 2-2-1 оказалось значительно меньше, чем в пептиде DBI (2—4).

В таблице приведено сравнение некоторых характеристик пептида 2-2-1 и пептида DBI. Исходя из среднестатистических значений длины триптического фрагмента, находящихся в пределах 10—20 аминокислот и количества фрагментов пептида 2-2-1 можно оценить величину  $M_r$  этого

пептида, которая будет порядка 4—8 кД. При этом мы предполагаем, что пептид не имеет аномальной аминокислотной последовательности. Если предположить, что пептид 2-2-1 конкурентно взаимодействует с БЗ-рецепторами, то можно оценить величину сродства пептида к последним, которая будет на 1-2 порядка больше, чем у пептида DBI (2-4). Кроме того, величины отношения оптических плотностей при 210 и 280 нм, экспериментально установленные для пептида 2-2-1 и рассчитанные для пептида DBI, достоверно различаются. Таким образом, можно предположить,

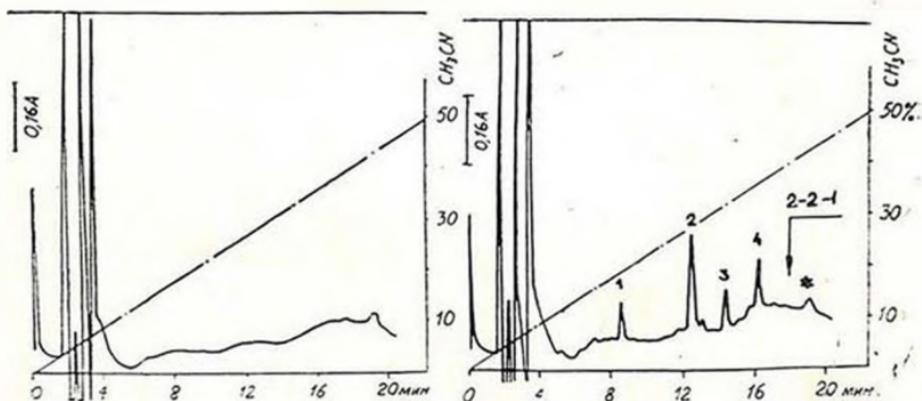


Рис. 6. Профиль элюции триптических фрагментов очищенного пептида 2-2-1 после микроколоночной хроматографии при pH 2. 1 мкг пептида 2-2-1 расщепляли ТРСК-трипсином («Serva», ФРГ, 0,05 мкг) в течение 8 ч при 40° в 45 мкл 0,1 М трис-НСI буфера, pH 8,0. Продукты протеолиза наносили на колонку (2×62 мм, Nucleosil 5С18) и элюировали линейным градиентом ацетонитрила от 0 до 50%, содержащим 0,1% трифторуксусной кислоты pH 2, со скоростью 100 мкл/мин в течение 22 мин. Выход пептидов прослеживали по определению УФ-поглощения элюата при 210 нм. Стрелкой показано время выхода исходного пептида 2-2-1

что определенное по спектральным характеристикам содержание ароматических аминокислот в пептиде 2-2-1 не соответствует составу DBI.

Поскольку точных оценок величины  $M_i$  и сродства мы пока не имеем, то удастся оценить содержание пептида 2-2-1 в гипофизе только относительно его констант ингибирования. Эта величина равна приблизительно 10 значениям  $K_i$ , то есть средняя концентрация пептида в гипофизе примерно в 10 раз больше концентрации, необходимой для 50%-ного вытеснения диазепама из БЗ-рецепторов. Столь высокое значение содержания пептида 2-2-1 может свидетельствовать о том, что гипофиз является местом хранения этого соединения.

Общая характеристика пептида 2-2-1 свидетельствует, что он, видимо, является наиболее вероятным кандидатом на роль эндогенного лиганда БЗ-рецепторов из числа известных до настоящего времени ингибиторов специфического связывания диазепама.

Таким образом, с помощью примененных в данной работе твердо-

фазной экстракции и микроколоночной высокоэффективной жидкостной хроматографии нами был получен пептид-ингибитор специфического связывания диазепама, отличающийся от ранее известного пептидного ингибитора—DBI. Очевидно, первоочередной задачей является расшифровка его структуры, исследование топографии в головном мозгу и изучение физиологической роли. На повестке для также стоит синтез соответствующих олигонуклеотидных зондов, выделение и изучение гена, кодирующего синтез пептида 2-2-1.

*Идентификация гена пептидного ингибитора специфического связывания  $^3\text{H}$ -диазепама.* В настоящее время в ВНИЦ психического здоровья

Таблица

Сравнение некоторых свойств пептидов 2-2-1 и DBI

Параметры	2-2-1	DBI
Величина $M_r$ (кД)	4-8*	11,7
$A_{280}/A_{310}$	0,02 ± 0,005	0,048*
$K_i$ ( $n_{ii} = 1$ ), (нМ)	75-150*	4000

\* Рассчитанные значения. Данные для пептида DBI взяты из работ Costa и соавт. [2-4].

АМН СССР совместно с Новосибирским научно-исследовательским институтом цитологии и генетики СО АН СССР начаты работы по синтезу олигонуклеотидных проб и с их помощью изучение генетических факторов, контролирующих синтез соответствующих пептидов. В качестве модельной была взята задача синтеза и проверки олигонуклеотидного зонда, позволяющего обнаружить ген пептида DBI. Этот пептид с величиной  $M_r$  около 11,7 кД обнаруживается в головном мозгу человека и крысы в концентрации от 10 до 20 мкМ и, по-видимому, является анксиогенным веществом [2-4].

Пептид DBI состоит из 104 аминокислот, последовательность которых не имеет гомологий ни с одной из известных аминокислотных последовательностей пептидов млекопитающих [2].

С целью обнаружения и последующего клонирования специфического структурного гена DBI мы воспользовались традиционным методом идентификации генов посредством использования в качестве молекулярных зондов олигонуклеотидных проб, нуклеотидная последовательность которых воспроизводит предполагаемую последовательность гена, кодирующего пептид. Использование синтетических олигонуклеотидов в качестве молекулярных зондов, как правило, сопряжено со сложными и кропотливыми процедурами выделения, идентификации и клонирования специфических мРНК. Отличие нашего метода заключалось в одновременном синтезе нескольких олигонуклеотидов, комплементарных различным участкам предполагаемого гена, объединении их в единую двунитевую

структуру и ее клонировании в бактериальном векторе. Такой подход позволяет, опуская все этапы выделения и клонирования специфических мРНК, непосредственно выявлять интересующие геномные фрагменты ДНК благодаря тому, что используемую в качестве зонда рекомбинантную плазмиду можно метить радиоактивными изотопами до достаточно высокой специфической активности.

На основе знания генетического кода и частот встречаемости отдельных кодонов и динуклеотидов в геноме млекопитающих по эмбриональным последовательностям коротких пептидных фрагментов пептида DBI—фрагментов T7 и T5, обладающих выраженной анксиогенной активностью [2—4], были синтезированы 4 частично взаимно комплементарных олигонуклеотида. Смесь их была отожжена, обработана ДНК-лигазой и полученная дунитевая структура клонирована по предусмотренным липким концам в бактериальной плазмиде pUC19.

Рекомбинантная плазмидная ДНК, полученная таким способом, была помечена  $^{32}\text{P}$  методом нуклеотидного замещения до специфической активности около  $10^9$  имп/мин/мкг ДНК и использована в качестве зонда в процедуре блоттинг-гибридизации с рестриктивными фрагментами геномной ДНК человека. Полученные результаты свидетельствуют о наличии в геноме человека по крайней мере двух типов фрагментов ДНК, гомологичных использованной пробе. Первый из них был представлен EcoRI-фрагментами ДНК длиной около 5000 пар нуклеотидов и обнаруживался во всех исследованных геномных ДНК как уникальная последовательность. Другой тип—фрагменты длиной 2800 пар нуклеотидов—также обнаруживался почти во всех исследованных геномах, однако характеризовался выраженным полиморфизмом по числу копий, которое может различаться в геномах разных индивидов в десятки раз.

В ближайшее время основными задачами наших исследований будут непосредственное клонирование гена DBI, определение его первичной структуры и изучение механизмов амплификации. Представляется также важным определение, является ли полиморфная копия DBI-гена наследственным признаком и какую роль такой признак может играть в развитии депрессивных состояний у человека.

## SEARCH FOR ENDOGENOUS LIGANDS OF BENZODIAZEPINE RECEPTORS: ISOLATION AND GENETIC STUDIES

BRUSOV O. V., YAKOVLEV A. G., PLOTNIKOV V. V., \*BARAM G. I.,  
\*GRACHEV M. A., \*\*KUMAREV V. P., KUDRYAKOVA T. B.,  
\*\*BOROVKOV A. A., \*\*KOBZEV V. F.

All-Union Research Center of Mental Health, USSR Acad. Med. Sci. Moscow

\*\*Institute of Bioorganic Chemistry, Siberian Division of the USSR Acad. Sci. Novosibirsk;

\*\*Institute of Cytology and Genetics, Siberian Division of the USSR Acad. Sci., Novosibirsk

With the aid of the developed purification scheme including high performance solid phase extraction and microcolumn chromatography a peptide inhibitor of the specific binding of  $^3\text{H}$ -diazepam (peptide 2—2—

1) has been isolated in a homogenous state from bovine hypothalamus. The affinity of this peptide to benzodiazepine receptors and its concentration in hypophysis are high. An attempt to identify the human gene of DBI peptide is also made.

#### Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Speth R. S., Jonson R. W., Regan J., Reisine T., Kobayashi D. M., Bresoltt N., Roeske W. R., Yamamura H. I. *Federat. Proc.*, v. 39, p. 3032—3038, 1980
2. Costa E.—in: Profile of a neuroscience research program at the National institute of Mental Health (1968 thru 1985), p. 253, Tipolitografia Campisi Uicenza, Italia, 1985.
3. Corda M. G., Ferrary M., Guidotti A., Konkel D., Costa E. *Neurosci. Lett.*, v. 47, p. 319—325, 1984.
4. Ferrero P., Santi M. R., Conti-Tronconi B., Costa E., Guidotti A. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*, v. 83, p. 827—831, 1985.
5. Барам Г. И., Грачев М. А., Назимов И. В., Плетнев А. Р., Прессман Е. К., Рубин О. Г., Сальчиков Я. А., Семашко И. В., Чумаков М. П., Шемякин В. В., Ямщиков В. Ф. *Биоорг. химия*, т. 11, № 12, с. 1677—1680, 1985.
6. Baran G. I., Grachev M. A., Komarova W. I., Perelroyzen M. P., Bolvanov Yu. A., Kuzmin S. U., Kargaltsev U. U., Kuper E. A. *J. Chromatogr.*, v. 264, p. 69—90, 1983.
7. Mohler H., Okada T. *Science*, v. 198, p. 849—853, 1977.

Поступила 9. IX 1986

УДК 612.822.1:577.175.823:615.212.7:547.95

## НЕЙРОХИМИЧЕСКИЕ И НЕЙРОФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ПЕРЕСТРОЙКИ В СТРУКТУРАХ МОЗГА ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ НЕКОТОРЫХ НЕЙРОПЕПТИДОВ

ГЕРШТЕЙН А. М.

Институт мозга ВНИИ психического здоровья АМН СССР, Москва

Комплексное нейрофизиологическое и цитобioхимическое исследование показало, что при однократном системном введении тетрапептида (Tyr-D-Ala-Gly-Phe-NH<sub>2</sub>) или таффина (Thr-Lys-Pro-Arg) в период выраженного их действия на двигательную активность животных наблюдаются существенные изменения систем синтеза и деградации моноаминов, АХЭ, а также метаболизма белков и некоторых протеаз в структурах двигательной системы головного мозга исследованных млекопитающих. Эти изменения проявлялись как на корковом, так и на подкорковом уровнях, затрагивая в большей степени подкорковые структуры (хвостатое ядро).

Действие биоактивных нейропептидов на ЦНС осуществляется либо за счет их взаимодействия со специфическими рецепторами, либо за счет влияния на медиаторные системы головного мозга. При этом они проявляют по отношению к последним модулирующие эффекты [1]. В связи с этим в последние десятилетия замечен повышенный интерес к изучению