

УДК 577.17
©Шпаков, Шпакова

РАЗРАБОТКА НЕГОРМОНАЛЬНЫХ РЕГУЛЯТОРОВ АДЕНИЛАТЦИКЛАЗНОЙ СИГНАЛЬНОЙ СИСТЕМЫ НА ОСНОВЕ ПЕПТИДОВ, ПРОИЗВОДНЫХ ТРЕТЬЕЙ ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКОЙ ПЕТЛИ СОМАТОСТАТИНОВЫХ РЕЦЕПТОРОВ

А.О. Шпаков, Е.А. Шпакова*

Учреждение Российской академии наук Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, 194223 Санкт-Петербург, пр. Тореза, 44,
факс: +7 (812) 552 30 12; эл. почта: alex_shpakov@list.ru

В большинстве рецепторов серпантинного типа третья цитоплазматическая петля (ЦП-3) ответственна за взаимодействие с гетеротримерными G-белками и передачу гормонального сигнала к ферментам, генераторам вторичных посредников. Обнаружено, что пептиды, соответствующие ЦП-3, в отсутствие гормона влияют на функциональную активность гормональных сигнальных систем, вследствие чего они могут стать прототипом для разработки селективных регуляторов этих систем. Нами впервые синтезированы пептиды, соответствующие С-концевым участкам 255–269 и 240–254 ЦП-3 соматостатиновых рецепторов 1-го и 2-го типов (Сом₁Р и Сом₂Р) крысы. В микромолярных концентрациях они активировали G_i-белки и ингибировали стимулированную форсколином активность аденилатциклазы (АЦ) в тканях мозга крыс. Пептид 255–269 Сом₁Р является селективным антагонистом Сом₁Р, пептид 240–254 Сом₂Р – агонистом Сом₁Р. Пептид 255–269 Сом₁Р снижал регуляторные эффекты соматостатина и селективного Сом₁Р-агониста СН-275, осуществляемые через гомологичный ему рецептор, в то время как пептид 240–254 Сом₂Р, напротив, усиливал ингибирующее АЦ действие СН-275. Оба пептида сравнительно слабо влияли на регуляторные эффекты Сом₂Р-агониста октреотида. Таким образом, изученные нами пептиды являются селективными регуляторами чувствительной к соматостатину АЦ системы. С их помощью установлено, что ЦП-3 Сом₁Р и Сом₂Р включает основные молекулярные детерминанты, ответственные за активацию G_i-белков и регуляцию АЦ системы соматостатином и его аналогами.

Ключевые слова: аденилатциклаза, пептид, соматостатин, соматостатиновый рецептор, третья цитоплазматическая петля, G-белок.

ВВЕДЕНИЕ. Циклический нейропептид соматостатин, который широко представлен в ЦНС и периферических тканях человека и позвоночных животных, контролирует секрецию значительного числа гормонов и ростовых факторов, модулирует передачу гормональных сигналов в нервной системе, регулирует клеточный рост в нормальной и опухолевой тканях [1]. Свои биологические эффекты он реализует через сопряженные с гетеротримерными G-белками

Принятые сокращения: АЦ – аденилатциклаза; АЦ система – аденилатциклазная система; Сом₁Р и Сом₂Р – соматостатиновые рецепторы 1-го и 2-го типов; СР – серотониновый рецептор; С-ЦП-3 – С-концевой участок третьей цитоплазматической петли; G_i и G_s – гетеротримерный G-белок ингибирующего или стимулирующего типа, соответственно.

* - адресат для переписки

НЕГОРМОНАЛЬНЫЕ ПЕПТИДНЫЕ РЕГУЛЯТОРЫ АДЕНИЛАТЦИКЛАЗНОЙ СИСТЕМЫ

рецепторы серпантинного типа, семь раз пронизывающие плазматическую мембрану. У млекопитающих выявлено пять типов соматостатиновых рецепторов (Som_1P – Som_5P), которые характеризуются высокой гомологией первичной структуры (39–57% идентичности). Связывание соматостатина с SomP вызывает активацию сопряженных с ними G-белков, что приводит к запуску множества внутриклеточных сигнальных каскадов [2]. SomP взаимодействуют с G-белками ингибирующего типа (G_i), чувствительными к коклюшному токсину (КТ), и $G_{q,11,14}$ - и $G_{12,13}$ -белками, нечувствительными к КТ. Через посредство G_i -белков, с которыми сопряжены все SomP , соматостатин ингибирует активность фермента аденилатциклазы (АЦ) и зависимых от нее сигнальных путей.

Предполагается, что в SomP за взаимодействие с G_i -белками отвечают проксимальные к мембране участки цитоплазматических петель рецепторов, в частности С-концевой участок их третьей цитоплазматической петли (С-ЦП-3) [3–5]. Это предположение базируется на том, что в большинстве рецепторов серпантинного типа, которые ингибирующим способом сопряжены с АЦ, С-ЦП-3 вовлечён как в связывание, так и в активацию G_i -белков [6, 7]. С-ЦП-3 является цитоплазматическим продолжением шестого трансмембранного домена, формирующего трансмембранный канал рецептора, и, как правило, обогащён положительно заряженными аминокислотными остатками, которые образуют ВВХХВ-мотив, где В – положительно заряженный лизин или аргинин [8].

Ранее нами и другими авторами было показано, что пептиды, соответствующие участкам С-ЦП-3 рецепторов, в отсутствие гормона стимулируют активность G-белков и запускают сопряженные с ними сигнальные каскады (подробнее см. [9]). Действие пептидов осуществляется в микромолярном диапазоне концентраций и является селективным в отношении G-белков и рецепторов. Пептиды стимулируют активность в основном тех типов G-белков, с которыми сопряжен гомологичный им рецептор, и снижают регуляторные эффекты тех гормонов, действие которых реализуется через этот рецептор. В перспективе на основе пептидов, производных С-ЦП-3 рецепторов, могут быть разработаны высоко селективные и высоко эффективные регуляторы гормональных сигнальных систем. Изучение таких пептидов важно для идентификации участков взаимодействия с G-белками и выяснения молекулярных механизмов передачи гормонального сигнала от рецептора к эффекторным белкам.

Идентификация молекулярных детерминант, ответственных за взаимодействие SomP с G-белками, а, следовательно, и за процесс передачи соматостатинового сигнала в клетку, а также разработка селективных регуляторов SomP на основе пептидов, включающих эти детерминанты, является одной из актуальных проблем современной молекулярной эндокринологии и практической медицины, поскольку нарушения чувствительности тканей к соматостатину приводят к широкому спектру онкологических заболеваний, дисфункций со стороны нервной, пищеварительной и репродуктивной систем.

Цель работы состояла в изучении влияния пептидов, соответствующих С-ЦП-3 Som_1P и Som_2P , на функциональную активность аденилатциклазной системы (АЦ системы) и передачу через неё соматостатинового сигнала в тканях мозга крыс. Выбор Som_1P и Som_2P обусловлен доминирующей ролью этих рецепторов в реализации регуляторного влияния соматостатина на АЦ систему, а также широким распространением и высоким уровнем экспрессии Som_1P и Som_2P в тканях мозга крыс, являющихся объектом исследования.

МЕТОДИКА. В работе использовали соматостатин-14 (“Sigma”, США), Som_1P -агонист СН-275 (“Neosystem”, Франция) и Som_2P -агонист октреотид (“Novartis Pharma”, Швейцария), а также другие реактивы фирм “Sigma” и “Reanal” (Венгрия). Для определения активности АЦ использовали [α - ^{32}P]АТР (30 Ки/ммоль) производства ОАО “Институт реакторных материалов” (Россия), для определения GTP-связывания G-белков – β, γ -имида[8- ^3H]-гуанозин-5'-трифосфат ([8- ^3H]GppNHP) (5 Ки/мМ) (“Amersham”, Англия).

Пептиды LKAGWQQRKRSEKKT^{255–271}-амид и IRVGSSKRKKSEKKT^{240–256}-амид, соответствующие С-ЦП-3 Som₁P и Som₂P крысы, были синтезированы стандартным твердофазным методом на *para*-метилбензгидриламиновой смоле (ёмкость 0,55 ммоль/г, 0,25 ммоль) с помощью синтезатора NPS-4000 (“Neosystem Laboratoires”, Франция). Присоединение аминокислотных остатков осуществляли карбодиимидным методом с помощью диизопропилкарбодиимида в присутствии 1-гидроксibenзотриазола в течение 1–2 ч. Снятие защитных групп и удаление пептидов с полимера осуществляли с помощью трифторметансульфокислоты (1 мл) в трифторуксусной кислоте (10 мл) в присутствии 1 мл тиоанизола и 0,5 мл этандитиола в течение 1 ч при охлаждении льдом и еще 1,5 ч без охлаждения при интенсивном перемешивании. Предварительную очистку пептидов проводили на BioGel P-2 в 6% уксусной кислоте. Дальнейшую очистку осуществляли с помощью ВЭЖХ на колонке Vydac C18 в системе вода–ацетонитрил–0,1% трифторуксусная кислота при использовании линейного возрастающего градиента ацетонитрила. Выделенные фракции имели 95% чистоты, считая от базовой линии (УФ-детектирование проводили при 230 нм). Структура пептидов была подтверждена данными аминокислотного анализа и масс-спектрометрического анализа, который показал, что M_{эксп.} пептида 255–269 Som₁P равна 2096,88 (M_{расч.} = 2097,47), M_{эксп.} пептида 240–254 Som₂P равна 1985,98 (M_{расч.} = 1986,36).

Исследования проводили на самцах крыс линии Wistar (n=24, масса тела 340±25 г). Фракции синапсомембранных мембран из тканей мозга выделяли по методу [10] с некоторыми модификациями. Кору больших полушарий, стриатум и гиппокамп гомогенизировали (4°C) при помощи Политрона в 50 мМ Трис-НСl буфере (pH 7,4), содержащем 10 мМ MgCl₂, 2 мМ EGTA, 10% (вес/объём) сахарозы и коктейль ингибиторов протеаз, включающий 500 мкМ *O*-фенантролин, 2 мкМ пепстатин и 1 мМ фенилметилсульфонилфторид (буфер А). Гомогенат центрифугировали (1000 g, 10 мин), осадок отбрасывали, а супернатант снова центрифугировали (9000 g, 20 мин). Осадок ресуспендировали в буфере А без сахарозы и центрифугировали (35000 g, 10 мин). Осажденные мембраны ресуспендировали в 50 мМ Трис-НСl буфере (pH 7,4) и использовали для исследования активности АЦ и GTP-связывания.

Активность АЦ определяли как описано ранее [11], и оценивали по количеству образовавшегося в результате ферментативной реакции сАМР. Определение GTP-связывания G-белков проводили как описано ранее [12], используя нитроцеллюлозные фильтры, тип HA, 0,45 мкм (“Millipore”, США). Специфическое GTP-связывание определяли как разность между связыванием меченого [8-³H]Gpp[NH]p в пробе в отсутствие и в присутствии 10 мМ GTP.

ADP-рибозилирование синапсомембранных мембран бактериальными токсинами проводили как описано ранее [13]. Фракции мембран с концентрацией белка 0,9–1,0 мг/мл инкубировали при 37°C в течение 45 мин с 100 мкг/мл холерного токсина (ХТ) или 10 мкг/мл КТ в 50 мМ Tris-НСl-буфере (pH 7,8), который содержал 2 мМ MgCl₂, 1 мМ EDTA, 10 мМ дитиотреитол, 0,1 мМ NAD, 1 мМ NADP, 0,1 мМ GppNHp (для ХТ) или GTP (для КТ), 1 мМ АТР, 10 мМ тимидин и коктейль ингибиторов протеаз. ADP-рибозилтрансферазы бактериальных токсинов предварительно активировали в присутствии 20 мМ дитиотреитола и 0,1% SDS (для ХТ) или 1 мМ АТР и 0,1% Lubrol-PX (для КТ) при 37°C в течение 15 мин. После проведения реакции ADP-рибозилирования суспензию мембран разводили до объёма 5 мл охлажденным до 4°C 50 мМ Трис-НСl-буфером (pH 7,5), содержащим 5 мМ MgCl₂, и центрифугировали (37000 g, 15 мин). Осадок ресуспендировали в том же буфере и использовали для экспериментов. Контрольные мембраны обрабатывали сходным образом, но без добавления токсинов.

Статистический анализ полученных данных проводили с использованием компьютерной программы “ANOVA”. Каждый эксперимент был выполнен троекратно. Данные представлены в виде средней ± ошибка средней нескольких

НЕГОРМОНАЛЬНЫЕ ПЕПТИДНЫЕ РЕГУЛЯТОРЫ АДЕНИЛАТЦИКЛАЗНОЙ СИСТЕМЫ

независимых экспериментов. Различия между контрольными пробами и пробами, подвергавшимися воздействию пептидов и гормонов, оценивали как достоверные при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Во фракциях синаптосомальных мембран тканей мозга крыс базальная активность АЦ составила $18,4 \pm 1,3$ пмоль сАМР/мин на 1 мг мембранного белка, базальный уровень ГТР-связывания – $4,4 \pm 0,2$ пмоль $[8\text{-}^3\text{H}]\text{GppNHp}$ на 1 мг мембранного белка. Форсколин (10^{-5} М) повышал активность АЦ до 108 ± 6 пмоль сАМР/мин на 1 мг мембранного белка (+487%). Соматостатин-14, Сом₁Р-агонист СН-275 и Сом₂Р-агонист октреотид (10^{-6} М) снижали базальную активность АЦ на 30, 15 и 18% и стимулированную форсколином активность АЦ – на 53, 27 и 35%, соответственно. Они также стимулировали ГТР-связывание G-белков, причем порядок эффективности в этом случае был следующим: соматостатин > октреотид > СН-275 (таблица). Отчётливо выраженные регуляторные эффекты агонистов СомР на активность АЦ системы в тканях мозга вызваны высоким уровнем экспрессии в ЦНС Сом₁Р и Сом₂Р, которые через посредство G_i-белков ингибируют АЦ [14, 15].

Таблица. Стимулирующие ГТР-связывание эффекты соматостатина и селективных агонистов СомР, а также пептидов, производных СомР, во фракциях синаптосомальных мембран, преинкубированных с бактериальными токсинами.

Воздействие	ГТР-связывание, пмоль $[8\text{-}^3\text{H}]\text{GppNHp}$ на 1 мг мембранного белка		
	Без токсинов	КТ	ХТ
Без добавок	$4,4 \pm 0,2$	$4,3 \pm 0,4$	$3,8 \pm 0,4$
Соматостатин-14, 10^{-6} М	$10,4 \pm 0,4^*$ (+136%)	$4,9 \pm 0,4^{**}$ (+14%)	$9,7 \pm 0,6^*$ (+134%)
СН-275, 10^{-6} М	$7,1 \pm 0,5^*$ (+61%)	$4,5 \pm 0,5^{**}$ (+5%)	$6,6 \pm 0,4^*$ (+64%)
Октреотид, 10^{-6} М	$7,9 \pm 0,4^*$ (+80%)	$4,9 \pm 0,3^{**}$ (+14%)	$7,1 \pm 0,3^*$ (+75%)
255–269 Сом ₁ Р, 10^{-4} М	$6,8 \pm 0,5^*$ (+55%)	$4,5 \pm 0,3^{**}$ (+5%)	$6,3 \pm 0,3^*$ (+57%)
240–254 Сом ₂ Р, 10^{-4} М	$5,8 \pm 0,4^*$ (+32%)	$5,0 \pm 0,3^{**}$ (+16%)	$5,8 \pm 0,5^*$ (+45%)

Примечание: Цифры в скобках - стимулирующие эффекты соматостатина в процентах от базального уровня ГТР-связывания, принятого за 100%. * - Различия между ГТР-связыванием в присутствии агонистов СомР или пептидов и в их отсутствие достоверны, $p < 0,05$; ** - Различия между ГТР-связыванием в контрольных мембранах и мембранах, обработанных КТ, достоверны, $p < 0,05$.

В отличие от агонистов СомР пептиды 255–269 и 240–254, производные С-ЦП-3 Сом₁Р и Сом₂Р крысы, практически не влияли на базальную активность АЦ (данные не представлены). Пептид 255–269 Сом₁Р отчётливо снижал стимулированную форсколином (10^{-5} М) активность АЦ (рис. 1) и повышал базальный уровень ГТР-связывания (рис. 2). Пептид 240–254 Сом₂Р в этом отношении был менее активен. Так, в концентрации 10^{-4} М пептид 255–269 Сом₁Р снижал активность АЦ на 31%, в то время как пептид 240–254 Сом₂Р – на 19%. Стимулирующий эффект 10^{-4} М пептида 255–269 Сом₁Р на ГТР-связывание был в 1,7 раза выше такового пептида 240–254 Сом₂Р, взятого в той же концентрации (рис. 2).

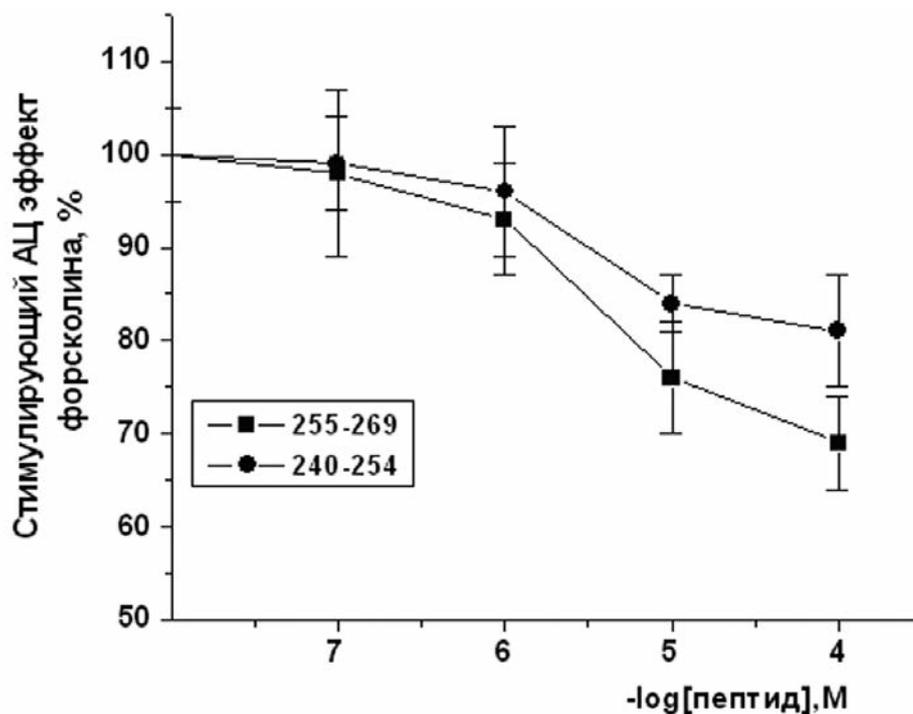


Рисунок 1.

Влияние пептидов 255-269 и 240254, производных С-ЦП-3 Som_1P и Som_2P , на стимулированную форсколином активность АЦ в синапсомальных мембранах мозга крыс. По оси ординат - стимулирующий АЦ эффект форсколина, % (эффект форсколина в отсутствие пептидов принят за 100%); по оси абсцисс - отрицательный логарифм концентрации пептида, М.

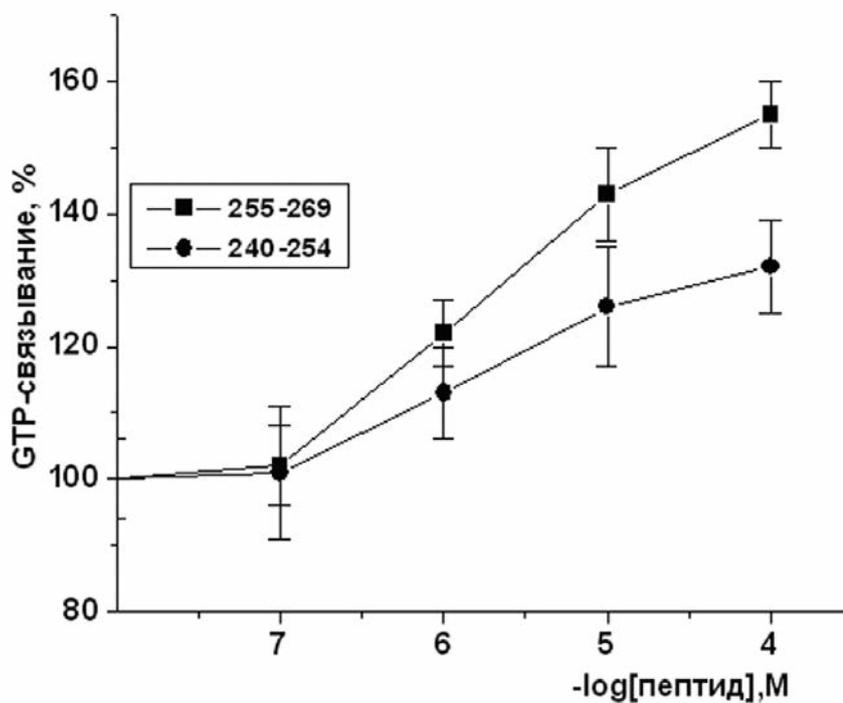


Рисунок 2.

Влияние пептидов 255-269 Som_1P и 240□254 Som_2P на GTP-связывание G-белков в мозге крыс. По оси ординат - GTP-связывание, % (базальный уровень GTP-связывания принят за 100 %); по оси абсцисс - отрицательный логарифм концентрации пептида, М.

НЕГОРМОНАЛЬНЫЕ ПЕПТИДНЫЕ РЕГУЛЯТОРЫ АДЕНИЛАТЦИКЛАЗНОЙ СИСТЕМЫ

Для определения типа G-белков, мишеней действия пептидов, изучали их влияние на GTP-связывание во фракциях мембран, обработанных КТ или ХТ. ADP-рибозилтрансфераза КТ модифицирует остаток цистеина в С-концевом сегменте α_1 -субъединицы G_i -белка, в результате чего G_i -белок теряет способность взаимодействовать с рецептором и передавать ингибирующий сигнал к АЦ [16]. ADP-рибозилтрансфераза ХТ модифицирует остаток аргинина, локализованный вблизи GTP-связывающего сайта α_s -субъединицы G-белка стимулирующего типа (G_s), что переводит G_s -белок в активированное состояние и делает его нечувствительным к действию гормона [17]. Таким образом, обработка КТ выключает из сигнальной трансдукции G_i -белок, а обработка ХТ – G_s -белок.

В мембранах, обработанных КТ, стимулирующий эффект пептида 255–269 Сом₁Р на GTP-связывание блокировался, в то время как соответствующий эффект пептида 240–254 Сом₂Р снижался на 50%. Обработка мембран ХТ существенно не влияла на стимуляцию GTP-связывания пептидом 255–269 Сом₁Р, а в случае пептида 240–254 Сом₂Р вызывала даже незначительное усиление эффекта (таблица). Качественно сходная картина наблюдалась для соматостатина, СН-275 и октреотида. Обработка КТ блокировала (СН-275) или отчетливо снижала (соматостатин, октреотид) стимуляцию ими G-белков, в то время как преинкубация с ХТ не влияла на стимулирующие GTP-связывание эффекты агонистов СомР (таблица). Следовательно, мишенями действия как пептидов, так и агонистов СомР являются чувствительные к КТ G_i -белки. При этом пептиды и агонисты СомР практически не влияли на GTP-связывание G_s -белков, субстратов ХТ. Частичное блокирование КТ эффектов пептида 240–254 Сом₂Р, соматостатина и Сом₂Р-агониста октреотида, как мы полагаем, объясняется способностью Сом₂Р активировать не только G_i -белки, но и $G_{q/11}$ -белки, через которые регулируется фосфоинозитидный сигнальный путь. Таким образом, в отличие от пептида 255–269 Сом₁Р, который селективно активирует G_i -белки, пептид 240–254 Сом₂Р не является селективным в отношении G_i -белков и способен взаимодействовать с другими их типами (вероятно, с $G_{q/11}$ -белками), нечувствительными к КТ и ХТ.

Таким образом, пептиды, производные С-ЦП-3 Сом₁Р и Сом₂Р, имитируют активированные гормоном СомР – в отсутствие гормона стимулируют G_i -белки и ингибируют АЦ. Сходной активностью обладают пептиды, производные С-ЦП-3 сопряженных с G_i -белками δ - и μ -опиоидных рецепторов и рецептора ангиотензина, а также изученный нами ранее пептид 307–316, производный С-ЦП-3 серотонинового рецептора (СР) 1В-подтипа, которые селективно активируют G_i -белки и ингибируют АЦ [18–20]. Пептиды, производные ЦП-3 рецепторов, сопряженных с G_s -белками, селективно активируют G_s -белки и стимулируют АЦ [9]. Нами показано, что пептиды, производные С-ЦП-3 релаксина рецептора RXFP1 и СР 6-го типа, стимулируют GTP-связывание G_s -белков и активность АЦ [12, 20–22]. Действие пептидов является специфичным не только в отношении определенного типа G-белков, но и их подтипов. Так пептиды 301–317 и 329–344, производные ЦП-3 СВ₁-каннабиноидного рецептора, специфично блокируют взаимодействие рецептора с α_{11} - и α_{12} -субъединицами G_i -белков, но не влияют на активность α_{13} -субъединицы [23].

Далее изучали влияние пептидов на передачу гормонального сигнала через Сом₁Р и Сом₂Р, генерируемого агонистами СомР. В присутствии пептида 255–269 Сом₁Р (10^{-5} и 10^{-4} М) ингибирующие АЦ эффекты соматостатина и Сом₁Р-агониста СН-275 снижались, в то время как соответствующий эффект Сом₂Р-агониста октреотида менялся слабо (рис. 3). Преинкубация мембран с пептидом 255–269 Сом₁Р приводила к снижению стимуляции GTP-связывания соматостатином и СН-275, и лишь незначительно влияла на стимулирующий GTP-связывание эффект октреотида (рис. 4). Таким образом, пептид 255–269 Сом₁Р нарушает передачу ингибирующего АЦ сигнала через Сом₁Р, но слабо влияет

на ингибирование АЦ через другие типы СомР, что указывает на специфичность его действия. Полученные результаты согласуются с ранее полученными данными о способности пептидов, производных ЦП-3 рецепторов серпантинного типа, ослаблять передачу сигнала через гомологичные им рецепторы [9]. Так пептиды, производные С-ЦП-3 релаксина рецептора RХFР1, ингибируют стимуляцию релаксином АЦ в миокарде и мозге крыс, где регуляторные эффекты релаксина осуществляются в основном через рецептор RХFР1, но мало эффективны в скелетных мышцах, где релаксин действует на АЦ через другие типы рецепторов [12, 21]. Пептиды, производные С-ЦП-3 СР 1В-подтипа, наиболее эффективно ослабляют ингибирующие АЦ эффекты 5-нонилситриптамина, селективного агониста СР 1В-подтипа, в то время как пептиды, соответствующие С-ЦП-3 СР 6-го типа, снижают стимулирующие АЦ и GTP-связывание эффекты EMD-386088, селективного агониста СР 6-го типа, но не влияют на эффекты агонистов СР 7-го типа [20, 22]. В соответствии с моделью, предложенной Covic и соавторами [24], пептиды, производные ЦП-3, взаимодействуют с участками рецептора, контактирующими с ЦП-3, что приводит к нарушению сопряжения рецептора с G-белком и препятствует передаче гормонального сигнала. Поскольку структура таких участков различается даже в близкородственных рецепторах, то взаимодействие пептидов с ними является высоко специфичным.

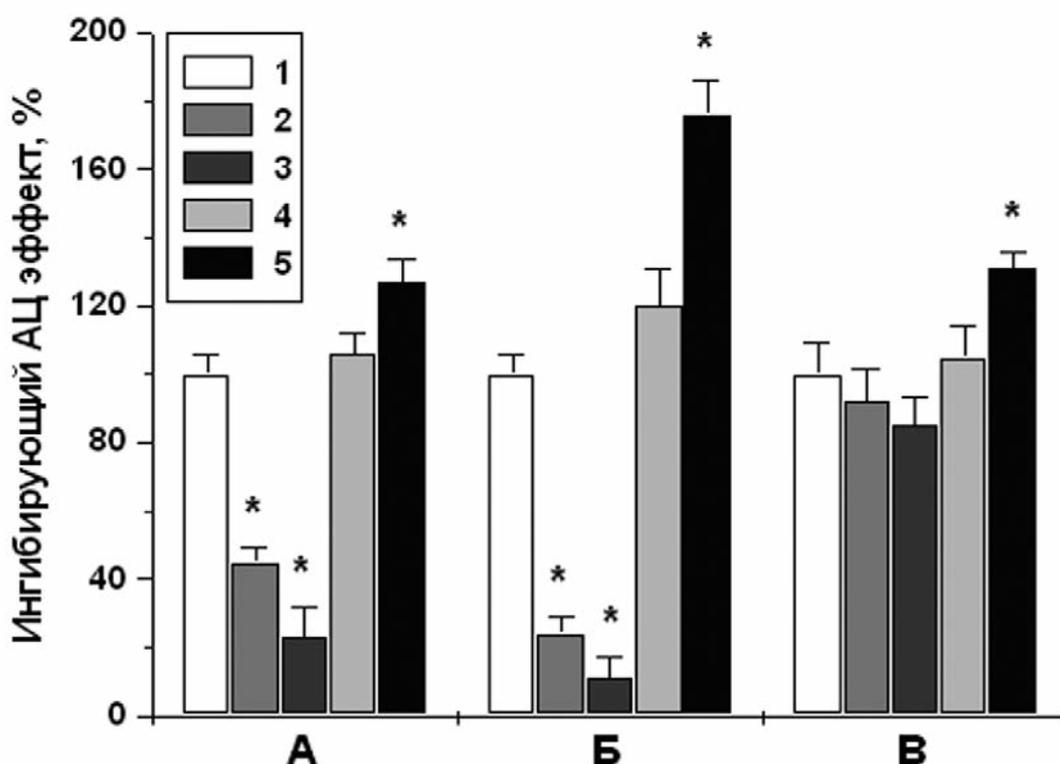


Рисунок 3.

Влияние пептидов на ингибирующий АЦ эффект соматостатина и агонистов СомР - СН-275 и октреотида.

А - соматостатин; Б - СН-275; В - октреотид. 1 - без пептида; 2 - пептид 255-269, 10⁻⁵ М; 3 - пептид 255-269, 10⁻⁴ М; 4 - пептид 240-254, 10⁻⁵ М; 5 - пептид 240-254, 10⁻⁴ М.

Ингибирующие эффекты соматостатина и агонистов СомР (10⁻⁶ М) на активность АЦ, стимулированной форсколином (10⁻⁵ М), в отсутствие пептидов приняты за 100%.

* - Различия между активностью АЦ в присутствии и в отсутствие пептидов достоверны, p<0,05.

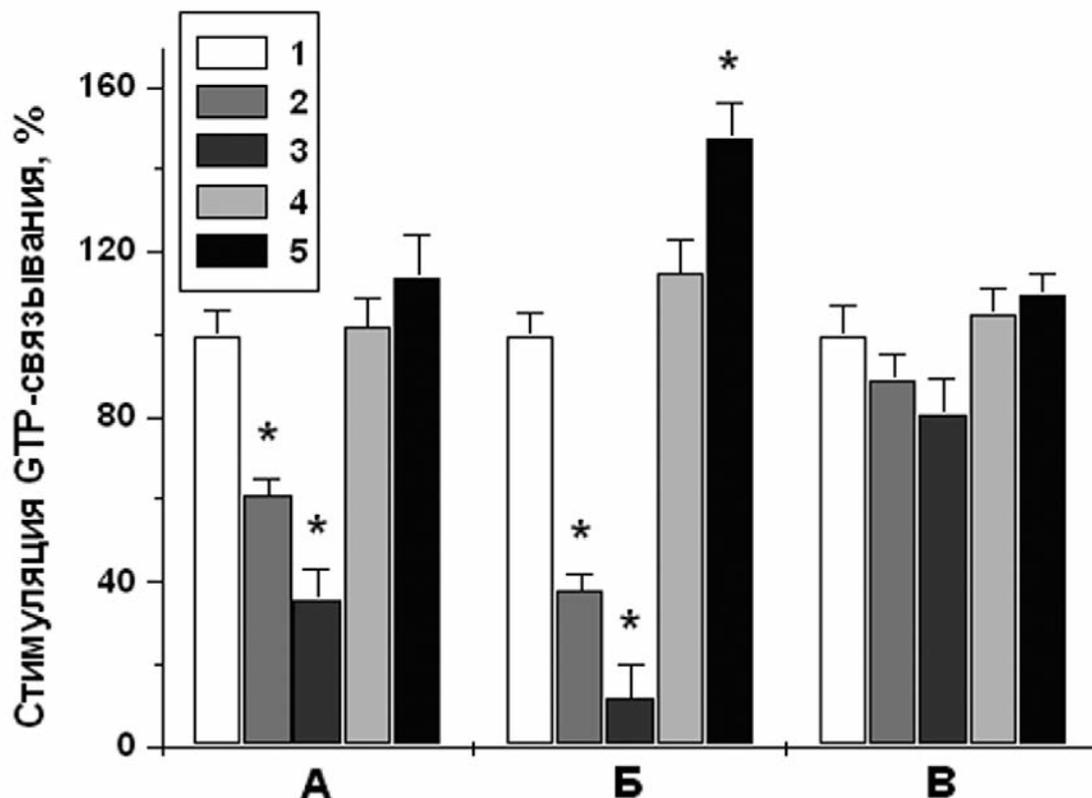


Рисунок 4.

Влияние пептидов на стимулирующий эффект соматостатина и агонистов СомР на GTP-связывание.

Стимулирующие эффекты соматостатина и агонистов СомР (10^{-6} М) на GTP-связывание в отсутствие пептидов приняты за 100%. * - Различия между значениями GTP-связывания в присутствии и в отсутствие пептидов достоверны, $p < 0,05$. Остальные обозначения те же, что и на рисунке 3.

В отличие от пептида 255–269 Сом₁Р, пептид 240–254 Сом₂Р (10^{-5} – 10^{-4} М) усиливал ингибирующий АЦ эффект Сом₁Р-агониста СН-275, а в концентрации 10^{-4} М – эффекты соматостатина и октреотида, хотя и намного слабее в сравнении с СН-275 (рис. 3). Пептид 240–254 Сом₂Р также повышал стимулирующий эффект СН-275 на GTP-связывание (рис. 4). Таким образом, пептид 240–254 Сом₂Р потенцировал активацию гормонами Сом₁Р, но слабо влиял на передачу соматостатинового сигнала через гомологичный ему Сом₂Р. Причиной этого, как мы полагаем, является ингибирующее влияние пептида 240–254 Сом₂Р на способность Сом₁Р и Сом₁Р образовывать гетеродимерный комплекс Сом₁Р–Сом₂Р. Имеются данные о том, что формирование такого комплекса снижает эффективность взаимодействия рецепторов с G_i-белками и ослабляет регуляцию сАМР-зависимых каскадов агонистами СомР [1]. Так, в сетчатке глаза мышей образование комплекса Сом₁Р–Сом₂Р приводит к резкому снижению ингибирующих АЦ эффектов соматостатина и его аналогов. Блокирование Сом₂Р антагонистом СУН, нарушающее стабильность комплекса, усиливает ингибирующий АЦ эффект, вызываемый Сом₁Р-агонистом СН-275, в то время как блокирование Сом₁Р антагонистом SRA880 усиливает ингибирующий эффект октреотида, осуществляемый через Сом₂Р. Обнаружено также, что соматостатин и октреотид с высокой эффективностью ингибируют АЦ в сетчатке глаза нокаутных

мышей, лишённых гена, кодирующего Som_1P , но имеющих функционально активный ген для Som_2P [25]. Можно предположить, что пептид 240–254 Som_2P нарушает взаимодействие между цитоплазматическими участками рецептора, стабилизирующими комплекс Som_1P – Som_2P , что ведет к его диссоциации. Поскольку Som_1P в мономерной форме существенно активнее такового в составе комплекса, то результатом действия пептида является повышение эффективности передачи гормонального сигнала через Som_1P .

Выявленная нами способность пептидов, производных С-ЦП-3 Som_1P и Som_2 , стимулировать G_i -белки и влиять на передачу соматостатинового сигнала, свидетельствует о том, что ЦП-3 Som_1P и Som_2P , как и в большинстве других рецепторов серпантинного типа, играет ключевую роль в их взаимодействии с G_i -белками. Имеются всего две работы [3, 4], в которых изучали значение ЦП-3 SomP для передачи соматостатинового сигнала, причем исследовали только аминокислотные остатки, локализованные вблизи центральной части петли. Обнаружено, что замена Arg^{240} , предшествующего VVXXV -мотиву ($\text{RKVTR}^{244-248}$), на триптофан существенно ослабляет взаимодействие мутантного Som_5P с G -белками, нечувствительными к КТ, но при этом слабо влияет на активацию $G_{i/o}$ -белков, чувствительных к КТ [4]. В другой работе показано, что мотив $\text{QQ}^{260-261}$, расположенный ближе к середине ЦП-3 Som_1P перед остатком Lys^{263} , который соответствует Arg^{240} в Som_5P , вовлечён во взаимодействие Som_1P с $G_{i/o}$ -белками и регуляцию гормоном Na^+/H^+ -обмена [3]. QQ -мотив присутствует в ЦП-3 Som_1P , а следовательно, и в пептиде 255–269 Som_1P , но отсутствует в соответствующем локусе Som_2P . Предполагается, что в Som_2P во взаимодействие с $G_{i/o}$ -белками, наряду с С-ЦП-3, могут быть вовлечены и другие цитоплазматические участки [3]. Этим, вероятно, и объясняется более низкая эффективность пептида 240–254 Som_2P в сравнении с пептидом 255–269 Som_1P , а также различия в молекулярных механизмах действия пептидов на передачу сигнала через SomP . С другой стороны, как отмечалось выше, обработка КТ полностью блокирует стимулирующий GTP -связывание эффект пептида 255–269 Som_1P , но лишь на 50% снижает соответствующий эффект пептида 240–254 Som_2P . Это указывает на активацию пептидом 240–254 Som_2P G -белков, нечувствительных к КТ, и согласуется с данными о том, что ЦП-3 Som_5P , близкая по первичной структуре ЦП-3 Som_2P , вовлечена в активацию как чувствительных, так и нечувствительных к КТ G -белков [4].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ. Синтезированные нами пептиды в микромолярных концентрациях селективно действуют на чувствительную к соматостатину АЦ систему в мозге крыс, мимикрируя гомологичные им рецепторы. Пептид 255–269 Som_1P обладает антагонистической активностью по отношению к Som_1P , специфично снижая передачу через него гормонального сигнала, в то время как пептид 240–254 Som_2P , напротив, является агонистом Som_1P , но слабо влияет на Som_2P . Ранее нами и другими авторами были синтезированы и изучены пептиды, обладающие активностью антагонистов, которые селективно блокируют передачу гормональных сигналов [9, 20, 21, 24]. До настоящего времени был известен только один пептид, производный ЦП-3 протеаза-активируемого рецептора 1-го типа, который обладал активностью внутриклеточного агониста, усиливающего передачу сигнала через гомологичный ему рецептор [26], сходный по функциональным свойствам с пептидом 240–254 Som_2P . Таким образом, полученные нами данные свидетельствуют о том, что на основе пептидов, производных рецепторов Som_1P и Som_2P , могут быть созданы пептиды, как с агонистической, так и антагонистической активностью, которые являются прототипом для разработки нового поколения внутриклеточных регуляторов гормональных сигнальных систем.

Работа поддержана РФФИ (проект № 09-04-00746) и Программой Президиума РАН “Фундаментальные науки – медицине” (2009–2011 гг.).

ЛИТЕРАТУРА

1. *Moller L.N., Stidsen C.E., Hartmann B., Holst J.J.* (2003) *Biochim. Biophys. Acta*, **1616**, 1–84.
2. *Lahlou H., Guillermet J., Hortala M., Vernejoul F., Pyronnet S., Bousquet C., Susini C.* (2004) *Ann. N.-Y. Acad. Sci.*, **1014**, 121–131.
3. *Lin C.Y., Varma M.G., Joubel A. et al.* (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**, 15128–15135.
4. *Peverelli E., Lania A.G., Mantovani G., Beck-Peccoz P., Spada A.* (2009) *Endocrinology*, **150**, 3169–3176.
5. *Somvanchi R.K., Billova S., Kharmate G., Rajput P.S., Kumar U.* (2009) *Cell. Signall.*, **21**, 1396–1414.
6. *Шпаков А.О.* (1996) *Журн. эвол. биохим. физиол.*, **32**(4), 488–511.
7. *Шпаков А.О.* (2002) *Цитология*, **44**(3), 242–258.
8. *Шпаков А.О.* (2003) *Журн. эвол. биохим. физиол.*, **39**(3), 205–217.
9. *Shpakov A.O., Pertseva M.N.* (2007) in: *Signal Transduction Research Trends* (Grachevsky N.O., ed.) Nova Science Publishers, Inc., New York, pp. 45–93.
10. *Odagaki Y., Nishi N., Koyama T.* (1997) *Br. J. Pharmacol.*, **121**, 1406–1412.
11. *Shpakov A.O., Kuznetsova L.A., Plesneva S.A., Kolychev A.P., Bondareva V.M., Chistyakova O.V., Pertseva M.N.* (2006) *Cent. Eur. J. Biol.*, **1**, 530–544.
12. *Шпаков А.О., Перцева М.Н., Гурьянов И.А., Власов Г.П.* (2005) *Биол. мембраны*, **22**(6), 435–442.
13. *Plesneva S.A., Shpakov A.O., Kuznetsova L.A., Pertseva M.N.* (2001) *Biochem. Pharmacol.*, **61**, 1277–1291.
14. *Le Verche V., Kaindl A.M., Verney C., Csaba Z., Peineau S., Olivier P., Adle-Biassette H., Leterrier C., Vitalis T., Renaud J., Dargent B., Gressens P., Dournaud P.* (2009) *PLoS ONE*, **4**, E5509.
15. *Stroh T., van Schouwenburg M.R., Beaudet A., Tannenbaum G.S.* (2009) *J. Neurosci.*, **29**, 8198–8205.
16. *Gudermann T., Kalkbrenner F., Schultz G.* (1996) *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **36**, 429–460.
17. *Freissmuth M., Gilman A.G.* (1989) *J. Biol. Chem.*, **264**, 21907–21914.
18. *Shirai H., Takahashi K., Katada T., Inagami T.* (1995) *Hypertension*, **25**, 726–730.
19. *Megaritis G., Merkouris M., Georgoussi Z.* (2000) *Receptors Channels*, **7**, 199–212.
20. *Shpakov A.O., Shpakova E.A., Tarasenko I.I., Derkach K.V., Vlasov G.P.* (2010) *Int. J. Pept. Res. Ther.*, **16**, 95–105.
21. *Shpakov A.O., Gur'yanov I.A., Kuznetsova L.A., Plesneva S.A., Shpakova E.A., Vlasov G.P., Pertseva M.N.* (2007) *Neurosci. Behav. Physiol.*, **37**, 705–714.
22. *Шпаков А.О., Тарасенко И.И., Шпакова Е.А.* (2010) *Докл. РАН*, **431**(5), 703–706.
23. *Mukhopadhyay S., Howlett A.C.* (2001) *Eur. J. Biochem.*, **268**, 499–505.
24. *Covic L., Gresser A.L., Talavera J., Swift S., Kuliopulos A.* (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 643–648.
25. *Pavan B., Fiorini S., Dal Monte M., Lunghi L., Biondi C., Bagnoli P., Cervia D.* (2004) *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, **370**, 91–98.
26. *Covic L., Misra M., Badar J., Singh C., Kuliopulos A.* (2002) *Nat. Med.*, **8**, 1161–1165.

Поступила: 20. 05. 2010.

**DEVELOPMENT OF NON-HORMONAL REGULATORS OF ADENYLYL CYCLASE
SIGNALING SYSTEM ON THE BASIS OF PEPTIDES, DERIVATIVES OF THE THIRD
INTRACELLULAR LOOP OF SOMATOSTATIN RECEPTORS**

A.O. Shpakov, E.A. Shpakova

I.M. Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, Russian Academy of Sciences,
pr. Thoreza, 44, St. Petersburg, 194223 Russia; fax: +7 (812) 552 30 12; e-mail: alex_shpakov@list.ru

In the majority of the serpentine type receptors the third intracellular loop (ICL-3) is responsible for interaction with heterotrimeric G-proteins and for transduction of hormonal signal to the enzymes, generators of the second messengers. It was found that the peptides corresponding to ICL-3 influence functional activity of hormonal signaling systems in the absence of the hormone and, in consequence, can be considered as prototypes for the development of selective regulators of these systems. We have originally synthesized peptides corresponding to C-terminal regions 255–269 and 240–254 of ICL-3 of type 1 and 2 rat somatostatin receptors (Som₁R and Som₂R). Micromolar concentrations of these peptides activated G_i-proteins and inhibited forskolin-stimulated activity of adenylyl cyclase (AC) in rat brain tissues. The peptide 255–269 of Som₁R is a selective antagonist of Som₁R, and the peptide 240–254 of Som₂R is an agonist of Som₁R. So, the peptide 255–269 of Som₁R decreased the regulatory effects of somatostatin and selective Som₁R-agonist CH-275 realized via the receptor homologous to them, while the peptide 240–254 of Som₂R, on the contrary, increased AC inhibitory action of CH-275. Both peptides insignificantly influenced regulatory effects of the Som₂R-agonist octreotide. Summing up, the peptides studied by us are selective regulators of somatostatin-sensitive AC system. Using the peptides it was shown that ICL-3 of Som₁R and Som₂R includes the main molecular determinants that are responsible for activation of G_i-proteins and regulation of AC system by somatostatin and its analogues.

Key words: adenylyl cyclase, peptide, somatostatin, somatostatin receptor, third intracellular loop, G-protein.