

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МЕХАНИЗМОВ ВЛИЯНИЯ ПРИРОДНЫХ И СИНТЕТИЧЕСКИХ ПОЛИКАТИОННЫХ ПЕПТИДОВ НА АКТИВНОСТЬ АДЕНИЛАТЦИКЛАЗНОЙ СИГНАЛЬНОЙ СИСТЕМЫ

© А. О. Шпаков,¹ И. А. Гурьянов,² Л. А. Кузнецова,¹ С. А. Плесева,¹
Е. Т. Захарова,³ Г. П. Власов,² М. Н. Перцева¹

¹ Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова РАН,

² Институт высокомолекулярных соединений РАН и ³ Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины РАМН, Санкт-Петербург;
электронный адрес: alex_shpakov@list.ru

Исследованы молекулярные механизмы действия природных и синтетических поликатионных пептидов, образующих амфипатические спирали, на гетеротримерные G-белки и фермент аденилатциклазу (АЦ), компоненты гормоночувствительной АЦ-системы. Показано, что синтетические пептиды С-εAhx-WKK(C₁₀)-KKK(C₁₀)-KKKK(C₁₀)-YKK(C₁₀)-KK (пептид I) и (GRGDSGRKKRRQRRRPQ)₂-K-εAhx-C(Acm) (пептид II) дозозависимо стимулируют базальную активность АЦ, ингибируют стимулированную форсколином активность фермента и снижают величину как стимулирующих, так и ингибирующих АЦ-эффектов гормонов в тканях крысы (стриатуме мозга и сердечной мышце) и гладких мышцах моллюска *Anodonta cygnea*. АЦ-эффекты пептидов отчетливо снижаются после обработки мембран холерным и коклюшным токсинами и ингибируются в присутствии пептидов, соответствующих С-концевым участкам 385—394 α_s- и 346—355 α_{i2}-субъединиц G-белков. Эти данные указывают на то, что пептиды I и II влияют на сигнальные пути, в которых участвуют G-белки, относящиеся к G_s- и G_i-семействам. В то же время природный поликатионный пептид мастопаран влияет на АЦ-систему только через G_i-белки и блокирует только те гормональные сигналы, которые реализуются с участием G_i-белков. Следовательно, его действие на G-белки в отличие от такового синтетических пептидов является селективным. Показано также, что пептид II с разветвленной структурой непосредственно взаимодействует не только с G-белками (менее эффективно, чем пептид I с гидрофобными радикалами и мастопаран), но и с ферментом АЦ, каталитическим компонентом АЦ-системы. Совокупность полученных данных свидетельствует о том, что формирование амфипатической спирали не является достаточным условием для селективной активации G-белка поликатионными пептидами. Важную роль в обеспечении селективного взаимодействия между пептидами и G-белками играют первичная структура пептидов, распределение в них положительно заряженных аминокислот и гидрофобных радикалов.

Ключевые слова: аденилатциклаза, бактериальный токсин, ГТФ-связывающий белок, мастопаран, поликатионный пептид, сердечная мышца, С-концевой пептид, стриатум головного мозга.

Принятые сокращения: АЦ — аденилатциклаза, АЦ-система — гормоночувствительная аденилатциклазная сигнальная система, КТ — коклюшный токсин, ХТ — холерный токсин, G-белок — гетеротримерный ГТФ-связывающий белок стимулирующего (G_s) или ингибирующего (G_i) типа.

Клетки эукариот располагают широким набором сигнальных систем, предназначенных для передачи различных по своей химической природе сигналов (первичных посредников) к локализованным внутри клетки ферментам, которые генерируют вторичные посредники — циклические нуклеотиды, катионы кальция, фосфоинозитиды, диацилглицерин, жирные кислоты и т. п. Вторичные посредники в свою очередь регулируют функциональную активность эффекторных систем, контролирующих запуск и протекание фундаментальных клеточных процессов, таких как рост, дифференцировка, метаболизм и апоптоз. Функцию первичных посредников, как правило, выполняют высокоспециализированные молекулы гормонов, нейротрансмиттеров и нейромодуляторов, регуляторные эффекты которых в большинстве случаев реа-

лизуются через сравнительно просто устроенную трехкомпонентную сигнальную систему. Эта система состоит из рецептора, специфически опознающего гормональный сигнал, и гетеротримерного ГТФ-связывающего белка (G-белка), осуществляющего направленную передачу этого сигнала на фермент — генератор вторичных посредников, который его усиливает и запускает каскад внутриклеточных реакций, вызывающих ответ клетки на гормональное воздействие.

В последние годы появились убедительные доказательства в пользу того, что некоторые пептиды природного происхождения могут запускать сигнальные каскады не зависимым от рецептора способом, непосредственно активируя второй компонент сигнальной системы — G-белок. К таким пептидам относятся масто-

параны, мелиттин и MCD-пептид — компоненты яда насекомых, относящихся к отряду Hymenoptera, а также пептидные гормоны — ангиотензин II, динорфин, брадикинин и субстанция P (Bueb et al., 1990; Higashijima et al., 1990; Mousli et al., 1990; Fujimoto et al., 1991; Tomita et al., 1991; Fukushima et al., 1998; Kusunoki et al., 1998). Характерной их особенностью является способность к образованию амфипатических спиралей, содержащих значительное число положительно заряженных аминокислот. Эти аминокислоты образуют мотивы BVXXV-типа (где V — положительно заряженная аминокислота), подобные тем, которые обнаружены в участках рецепторов, ответственных за связывание и активацию G-белков (подробнее см.: Шпаков, 2002, 2003). Способность перечисленных выше пептидов образовывать поликатионные спирали позволяет им проникать через плазматическую мембрану внутрь клетки, эффективно взаимодействовать с рецепторсвязывающими сайтами G-белков, которые несут преимущественно отрицательный заряд (Lambright et al., 1996), активировать их и запускать таким образом сигнальный каскад в отсутствие активированного гормоном рецептора.

Тот факт, что пептиды природного происхождения, не имеющие гомологии на уровне первичной структуры с рецепторами и другими сигнальными белками, способны запускать сигнальные каскады по не зависящему от рецептора механизму, предполагает возможность создания синтетических пептидов, которые сходны с природными пептидами по своей вторичной структуре и обладают теми же свойствами негормональных регуляторов сигнальных систем. Нами были синтезированы поликатионные пептиды, способные к образованию амфипатических спиралей, которые в отсутствие гормона стимулировали функциональную активность гетеротримерных G-белков, влияли на базальную и стимулированную гормонами активность аденилатциклазы (АЦ) — фермента, катализирующего синтез вторичного посредника цАМФ (Шпаков и др., 2001, 2003, 2004а, 2004б, 2004г, 2005). Введение в структуру поликатионных пептидов гидрофобных радикалов, а также создание на их основе разветвленных звездообразных структур повышали эффективность действия таких модифицированных пептидов на компоненты гормоночувствительной АЦ-системы. Действие поликатионных пептидов на АЦ-систему проявлялось у животных различного филогенетического уровня (одноклеточных эукариот, многоклеточных беспозвоночных, позвоночных), что свидетельствует об эволюционной консервативности молекулярных механизмов, лежащих в основе их взаимодействия с белками — компонентами АЦ-системы, в первую очередь G-белками (Шпаков и др., 2005). На способность поликатионных пептидов искусственного происхождения взаимодействовать с G-белками и влиять на функциональную активность сигнальных систем указывают и другие авторы (Leschke et al., 1997; Nurnberg et al., 1999; Breitweg-Lehmann et al., 2002). Однако молекулярные механизмы, лежащие в основе такого взаимодействия, остаются невыясненными. Исследование этих механизмов представляет собой одну из актуальных проблем молекулярной эндокринологии, поскольку ее решение будет способствовать раскрытию молекулярных основ функционального сопряжения рецепторов с G-белками. Необходимо также отметить, что в настоящее время поликатионные пептиды предполагается использовать в качестве перспективных носителей для транспортировки ДНК и дру-

гих макромолекул в клетку, вследствие чего важно знать, как сами эти носители будут влиять на функциональную активность клетки — мишени трансфекции.

Цель работы состояла в сравнительном исследовании молекулярных механизмов действия синтетических и природных поликатионных пептидов на G-белки и гормоночувствительную АЦ-систему в целом. Для исследования были взяты: 1) два ранее синтезированных нами поликатионных пептида, относящихся к различным их группам, — один, содержащий гидрофобные радикалы, и другой, имеющий разветвленную структуру; 2) наиболее изученный в настоящее время природный поликатионный пептид мастопаран из яда осы *Polistes jadwageae*. В работах других авторов было показано, что мастопаран с высокой селективностью активирует G-белки, относящиеся к $G_{i/o}$ -семейству, но слабо влияет на другие их типы (Higashijima et al., 1990; Tanaka et al., 1998; Whitman et al., 2000; Bakker et al., 2004; Olearczyk et al., 2004). Для выяснения типа G-белков, которые активируются поликатионными пептидами, применяли технику АДФ-рибозилирования холерным и коклюшным токсинами, которые селективно выключают G_s - и G_i -белки соответственно (Reisine, 1990), а также пептидную стратегию, в основе которой лежит применение С-концевых пептидов α -субъединиц G-белков, которые селективно блокируют сигнальные пути, включающие в себя те типы G-белков, производными которых эти пептиды являются (Novotny et al., 1996; Albrizio et al., 2000; Morizumi et al., 2003; Шпаков и др., 2004в; Shpakov et al., 2005а, 2005б).

Материал и методика

Для исследования активности АЦ использовали фракции плазматических мембран сердечной мышцы крысы и гладких мышц пресноводного двустворчатого моллюска *Anodonta cygnea*, которые получали по методу Кидвай и соавторов (Kidwai et al., 1973), а также фракции синаптосомальных мембран стриатума головного мозга крысы, выделенные по методу Хайос (Hajos, 1975). Для получения каждой фракции брали 6—8 крыс и 25—40 моллюсков.

В работе использовали мастопаран из *Polistes jadwageae*, коклюшный токсин (КТ), холерный токсин (ХТ), соматостатин, серотонин, изопротеренол и бромкриптин (Sigma, США); другие реактивы — фирм Sigma и Reanal. Пептиды, соответствующие С-концевым участкам 385—394 α_s - и 346—355 α_{i2} -субъединиц G-белков человека, а также поликатионные пептиды С- ϵ Ahx-WKK(C₁₀)-KKK(C₁₀)-KKKK(C₁₀)-YKK(C₁₀)-KK (пептид I) и (GRG DSGRKKRRQRRRPPQ)₂-K- ϵ Ahx-C(Acm) (пептид II), где ϵ Ahx — остаток ϵ -аминогексановой кислоты, C₁₀ — остаток каприновой кислоты, Acm — ацетамидометильная группа, были синтезированы, как описано ранее (Шпаков и др., 2004а, 2004б, 2004в). Для определения активности АЦ использовали [α -³²P]АТФ (1.11 Тбк/ммоль, Amersham, Англия).

Определение активности аденилатциклазы (АТФ-пиррофосфатлиаза циклизующая, КФ 4.6.1.1) проводили по методу Саломона и соавторов (Salomon et al., 1974) с нашими модификациями (Plesneva et al., 2001). Стандартная реакционная смесь содержала (конечные концентрации): 50 мМ Трис-НСl, рН 7.5, 0.1 мМ АТФ, 1 мМ цАМФ, 20 мМ креатинфосфат, 0.5 мг/мл креатинфосфо-

киназы, 5 мМ $MgCl_2$, 1—2 мкКи [α - ^{32}P]АТФ и 50—70 мкг белка в общем объеме 50 мкл. Реакцию начинали добавлением белка к инкубационной смеси. После инкубации в течение 10 мин при 37 (крысы) и 30 (моллюски) °С реакцию останавливали добавлением 100 мкл 0.5 М HCl и затем образцы кипятили в течение 7 мин. Для нейтрализации кислоты в каждую пробу добавляли по 100 мкл 1.5 М имидазола, после чего образцы помещали на колонки с окисью алюминия. цАМФ элюировали 8 мл 10 мМ имидазол- HCl -буфера, рН 7.4. Радиактивность элюата измеряли по методу Черенкова на β -счетчике Rackbeta (ЛКВ, Швеция). Активность АЦ выражали в пмоль цАМФ за 1 мин на 1 мг мембранного белка.

АДФ-рибозилирование фракций плазматических мембран бактериальными токсинами проводили, как описано ранее (Шпаков и др., 2002). Реакцию проводили при 37 (крысы) и 30 (моллюски) °С в течение 45 мин с добавлением 10 мкг/мл КТ или 100 мкг/мл ХТ в инкубационной среде общим объемом 400 мкл, содержащей (конечные концентрации): 50 мМ Трис- HCl , рН 7.8, 2 мМ $MgCl_2$, 1 мМ ЭДТА, 10 мМ дитиотреитол, 0.1 мМ НАД, 1 мМ НАДФ, 0.1 мМ ГТФ (для КТ) или $GppNHp$ (для ХТ), 1 мМ АТФ и 10 мМ тимидин. Концентрация мембранного белка составляла 0.95—1.00 мг/мл. Токсины были предварительно активированы в присутствии дитиотреитола и АТФ в течение 15 мин при 37 °С. Реакцию АДФ-рибозилирования останавливали добавлением к пробам 5 мл охлажденного 50 мМ Трис- HCl -буфера, рН 7.5. Пробы центрифугировали при 100 000 g в течение 30 мин, осажденные АДФ-рибозилированные мембраны ресуспендировали в том же буфере и немедленно использовали для определения активности АЦ. Контрольные пробы обрабатывали сходным образом, но без добавления бактериальных токсинов.

Преинкубацию фракций плазматических мембран с синтетическими пептидами и мастопараном в соответствующих концентрациях проводили при 4 °С в течение 10 мин.

Статистический анализ полученных данных проводили с использованием компьютерной программы ANOVA. Каждый эксперимент был выполнен трехкратно. Данные представлены в виде среднего \pm стандартная ошибка среднего из нескольких независимых экспериментов. Различия между контрольными пробами и пробами, подвергнутыми воздействию гормональных и негормональных агентов, согласно t -критерию Стьюдента, оценивали как достоверные при $P < 0.05$ ($n = 6$).

Результаты

Синтетический поликатионный пептид I в концентрации 10^{-6} — 10^{-4} М отчетливо стимулировал базальную активность АЦ во всех исследованных нами тканях (в большей степени в стриатуме мозга крысы) (рис. 1). При этом повышение его концентрации до 10^{-3} М приводило к снижению стимулирующего эффекта. Пептид II в концентрациях 10^{-6} и 10^{-5} М в незначительной степени стимулировал активность фермента, причем его эффект отчетливо проявлялся только в тканях крысы. При повышении концентрации стимулирующий АЦ-эффект пептида исчезал и переходил в ингибирующий. Мастопаран, поликатионный пептид из яда ос, слабо влиял на базальную активность фермента и лишь в концентрации 10^{-3} М заметно снижал ее в тканях крысы (рис. 1). Полученные

данные свидетельствуют о том, что пептид I и пептид II (в меньшей степени) в микромолярном диапазоне концентраций стимулируют базальную активность АЦ, в то время как мастопаран не обладает такой способностью.

Для выявления способности поликатионных пептидов ингибировать активность АЦ нами было изучено их влияние на активность АЦ, стимулированную дитерпеном форсколином, непосредственно взаимодействующим с каталитическим сайтом фермента. В отсутствие пептидов форсколин стимулировал активность АЦ в стриатуме на 207 %, сердечной мышце — на 455, мышцах моллюска — на 326 %. Обнаружено, что пептид II отчетливо снижал стимулированную форсколином активность АЦ уже в концентрации 10^{-6} — 10^{-5} М, а в концентрации 10^{-3} М ингибировал стимулирующий эффект форсколина на 50 % и более, причем ингибирование в мышцах моллюска проявлялось в большей степени, чем в тканях крысы (рис. 2). Пептид I был менее эффективен и заметно снижал стимулирующий АЦ-эффект форсколина только в концентрации 10^{-4} — 10^{-3} М, и не более чем на 20 % от величины такового в отсутствие пептида. Мастопаран был наиболее сильным ингибитором стимулирующего АЦ-эффекта форсколина — его действие выявлялось в концентрации 10^{-6} М, а при повышении концентрации до 10^{-4} М он ингибировал этот эффект в тканях крысы в 5 раз, в мышцах моллюска — в 2.5 раза (рис. 2). Следует, однако, отметить, что в отличие от пептида II ингибирующее действие мастопарана в мышцах моллюска было выражено значительно слабее, чем в тканях крысы, вследствие чего ингибирование АЦ-эффекта форсколина пептидом II и мастопараном в мышцах моллюска было сопоставимым.

Для выявления типа G-белков, на которые действуют поликатионные пептиды, были применены два метода — АДФ-рибозилирование фракций плазматических мембран с помощью бактериальных токсинов и пептидная стратегия, основанная на применении C-концевых пептидов α -субъединиц G-белков.

Для проведения селективных реакций АДФ-рибозилирования в тканях крысы и моллюска нами были использованы холерный токсин (ХТ), который АДФ-рибозилирует G_s -белок, переводит его в permanently активное состояние и, таким образом, выключает из процесса передачи сигнала, и коклюшный токсин (КТ), который инактивирует α -субъединицу $G_{i/o}$ -белка и блокирует сигнальные пути, в которых участвует этот G-белок. Показано, что в мембранах, АДФ-рибозилированных с помощью ХТ, стимулирующие эффекты пептидов I и II (10^{-5} и 10^{-4} М) на активность АЦ в значительной степени снижались или блокировались полностью, причем в тканях крысы начинал выявляться ингибирующий эффект пептида I, взятого в концентрации 10^{-4} М (рис. 3). В АДФ-рибозилированных ХТ мембранах тканей крысы (но не в мышцах моллюска) отчетливо выявлялся ингибирующий эффект мастопарана.

В мембранах, обработанных КТ, стимулирующие эффекты синтетических пептидов заметно повышались (для пептида I в большей степени) (рис. 4). При этом если в контрольных мембранах повышение концентрации пептида I с 10^{-5} до 10^{-4} М приводило к ослаблению его стимулирующего эффекта (рис. 1), то в мембранах, подвергнутых рибозилированию КТ, наблюдалась обратная картина (рис. 4). Стимулирующие АЦ-эффекты пептида II в концентрациях 10^{-5} и 10^{-4} М в обработанных

КТ мембранах были сопоставимы по величине, и в отличие от контрольных мембран ослабления этих эффектов при повышении концентрации пептида до 10^{-4} М не наблюдалось. Следует также отметить, что в рибозилированных КТ мембранах в гладких мышцах моллюска (но не в тканях крысы) выявлялся слабый стимулирующий АЦ-эффект мастопарана, действующего в концентрации 10^{-4} М (рис. 4).

Для исследования влияния АДФ-рибозилирования КТ на способность поликатионных пептидов активировать $G_{i/o}$ -белок и тем самым ингибировать активность АЦ изучали влияние этих пептидов на стимулированную форсколином активность АЦ в рибозилированных мембранах. В отсутствие пептидов форсколин в обработанных КТ мембранах стимулировал АЦ в стриатуме на 232 %, сердечной мышце — на 563, мышцах моллюска — на 340 %. Пептид I и мастопаран в рибозилированных мембранах в отличие от контрольных мембран практически не влияли на стимулирующий АЦ-эффект форсколина (рис. 5). В свою очередь ингибирование стимулирующего АЦ-эффекта форсколина пептидом II в рибозилированных мембранах сохранялось, хотя и было менее выражено, чем в контрольных мембранах. Так, пептид II в концентрации 10^{-4} М снижал эффект форсколина в стриатуме и сердечной мышце крысы и гладких мышцах моллюска соответственно на 29, 23 и 39 % (рис. 5). Для сравнения: в контрольных мембранах ингибирование составляло соответственно 44, 39 и 53 %.

Данные, полученные с помощью бактериальных токсинов (рис. 3—5), позволяют сделать следующие выводы. Пептид I действует на АЦ как через G_s -белок, так и через G_i -белок. С одной стороны, обработка ХТ блокирует стимулирующий АЦ-эффект пептида I, осуществляемый им через G_s -белок, и позволяет в тканях крыс выявить ингибирующий эффект этого пептида, взятого в концентрации 10^{-4} М (рис. 3). С другой стороны, обработка КТ, инактивирующим G_i -белок и вследствие этого препятствующим ингибированию АЦ пептидом, вызывает усиление стимулирующего АЦ-эффекта пептида и блокирует его способность ингибировать активность фермента, стимулированного форсколином (рис. 4, 5). Таким образом, АЦ-эффект пептида I в контрольных мембранах — это суммарный эффект, складывающийся из активации им как G_s -белка (стимуляция АЦ), так и G_i -белка (ингибирование АЦ). Мастопаран осуществляет

свое действие через G_i -белок, на что указывает блокирование ингибирующего эффекта этого природного пептида на стимулированную форсколином активность АЦ при обработке КТ во всех исследованных нами тканях (рис. 5). При этом действие мастопарана в тканях крысы более специфично, поскольку в мышцах моллюска, представителя беспозвоночных животных, его эффекты выражены в меньшей степени и, кроме того, в мембранах моллюска, рибозилированных КТ, выявляется стимулирующий эффект мастопарана, взятого в концентрации 10^{-4} М, что может указывать на стимуляцию им G_s -белка. Наконец, пептид II, так же как и пептид I, активирует оба типа G-белков, хотя и менее эффективно в сравнении с пептидом I (рис. 3, 4). В то же время молеку-

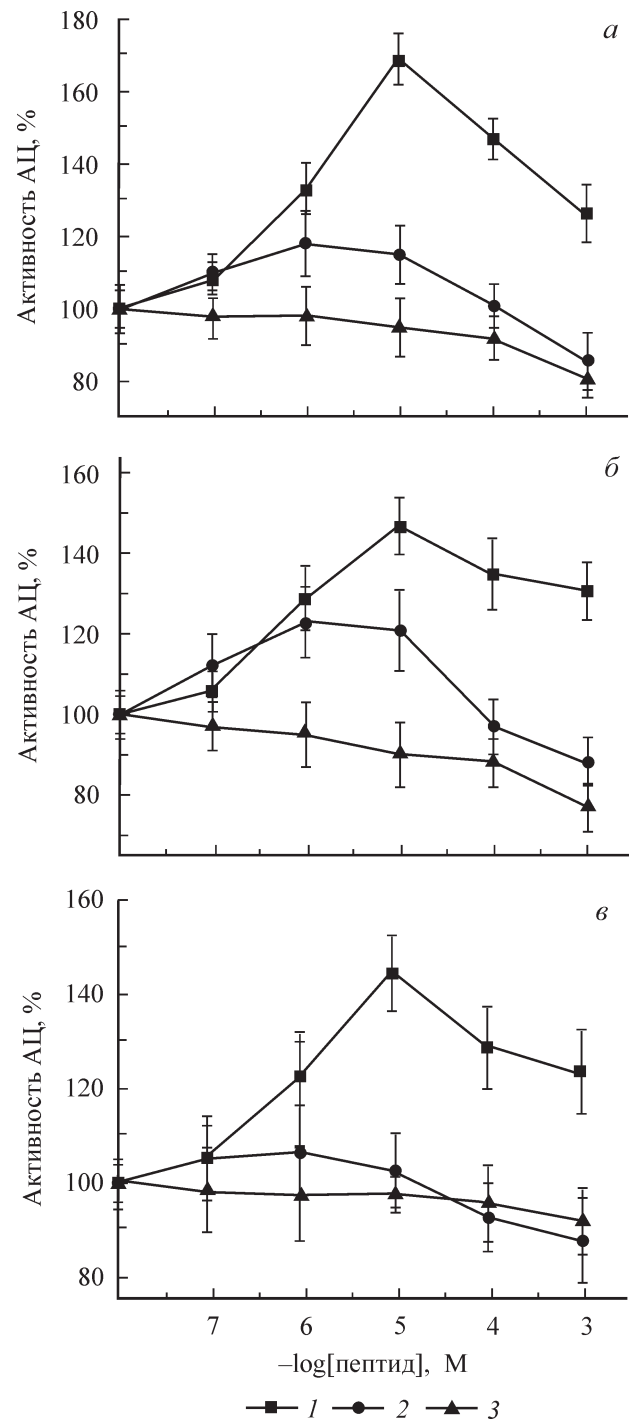


Рис. 1. Влияние поликатионных синтетических и природных пептидов на базальную активность аденилатциклазы (АЦ) во фракциях плазматических мембран стриатума мозга (а) и сердечной мышцы (б) крысы и гладких мышц моллюска *Anodonta cygnea* (в).

1 — пептид I, 2 — пептид II, 3 — мастопаран. Базальная активность АЦ, принятая за 100 %, составляла: в стриатуме мозга и сердечной мышце крысы — 76.9 ± 5.2 и 16.6 ± 1.1 соответственно, в гладких мышцах моллюска — 23.6 ± 1.8 пмоль цАМФ/мин на 1 мг мембранного белка.

Fig. 1. The influence of polycationic synthetic and natural peptides on basal adenyl cyclase (AC) activity in plasma membrane fractions of brain striatum (a) and heart muscle (b) of rat and of smooth muscles of the mollusc *Anodonta cygnea* (v).

1 — peptide I, 2 — peptide II, 3 — mastoparan. Axis X — $-\log[\text{пептид}], \text{M}$; axis Y — AC activity, %. Basal AC activities in brain striatum and heart muscle of rat and in smooth muscles of mollusc are 76.9 ± 5.2 , 16.6 ± 1.1 and 23.6 ± 1.8 pmols of cAMP/min per 1 mg of membrane protein, respectively, were taken as 100 %.

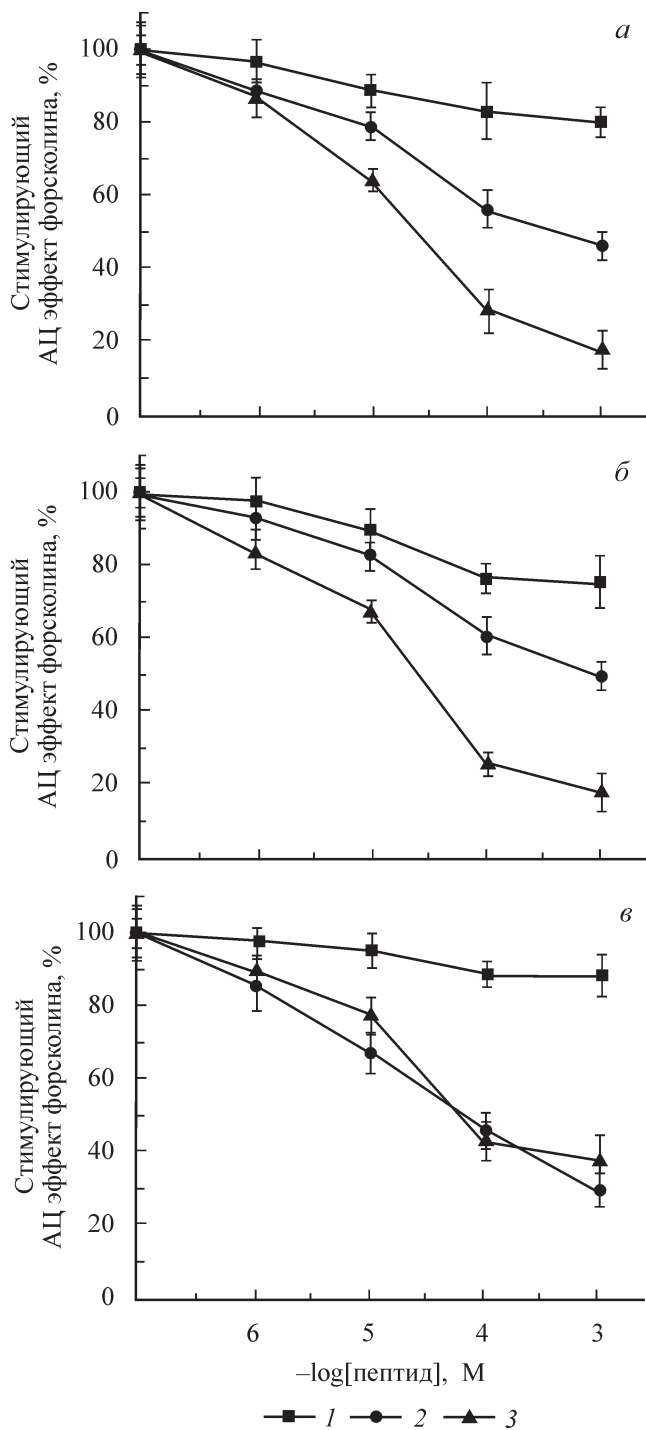


Рис. 2. Влияние поликатионных пептидов на стимулирующий АЦ-эффект форсколина во фракциях плазматических мембран стриатума мозга (а) и сердечной мышцы (б) крысы, а также гладких мышц моллюска *Anodonta cygnea* (в).

1 — пептид I, 2 — пептид II, 3 — мастопаран. Эффект форсколина (10^{-5} M) в отсутствие пептидов принят за 100 %.

Fig. 2. The influence of polycationic peptides on AC stimulating effect of forskolin in plasma membrane fractions of brain striatum (a) and heart muscle (б) of rat and of smooth muscles of the mollusc *Anodonta cygnea* (в).

1 — peptide I, 2 — peptide II, 3 — mastoparan. Axis X — $-\log[\text{peptide}], \text{M}$; axis Y — stimulating AC effect of forskolin (10^{-5} M), %. The effect of forskolin without peptides was taken as 100 %.

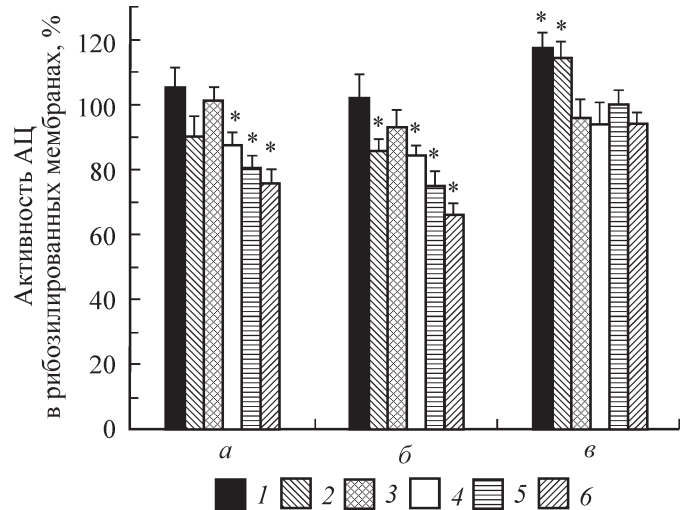


Рис. 3. Влияние АДФ-рибозилирования холерным токсином на АЦ-эффекты поликатионных пептидов.

а — стриатум мозга крысы, б — сердечная мышца крысы, в — гладкие мышцы моллюска. 1 — пептид I, 10^{-5} M; 2 — пептид I, 10^{-4} M; 3 — пептид II, 10^{-5} M; 4 — пептид II, 10^{-4} M; 5 — мастопаран, 10^{-5} M; 6 — мастопаран, 10^{-4} M. Активность АЦ, принятая за 100 %, в АДФ-рибозилированных холерным токсином мембранах составляла: в стриатуме мозга и сердечной мышце крысы — 138.6 ± 8.9 и 35.2 ± 1.4 соответственно, в гладких мышцах моллюска — 45.2 ± 2.9 пмоль цАМФ за 1 мин на 1 мг мембранного белка. Значения активности АЦ в присутствии пептидов, достоверно отличающиеся от активности фермента в их отсутствие ($P < 0.05$), отмечены звездочками.

Fig. 3. The influence of ADP-ribosylation by cholera toxin on AC effects of polycationic peptides.

а — brain striatum of rat, б — heart muscle of rat, в — smooth muscles of mollusc. 1 — peptide I, 10^{-5} M; 2 — peptide I, 10^{-4} M; 3 — peptide II, 10^{-5} M; 4 — peptide II, 10^{-4} M; 5 — mastoparan, 10^{-5} M; 6 — mastoparan, 10^{-4} M. AC activity in ADP-ribosylated by cholera toxin membranes of brain striatum and heart muscle of rat and in smooth muscles of mollusc are 138.6 ± 8.9 , 35.2 ± 1.4 and 45.2 ± 2.9 pmols of cAMP/min per 1 mg of membrane protein, respectively, were taken as 100 %. Statistical significance of differences between AC activity in the presence and without the peptides is indicated by asterisks ($P < 0.05$).

лярные механизмы их действия на АЦ различаются — пептид II в отличие от пептида I сохраняет способность заметно ингибировать стимулированную форсколином активность АЦ в мембранах, обработанных КТ (рис. 5). Это может свидетельствовать о том, что пептид II влияет на активность АЦ не только через посредство активации G-белков, но и вследствие прямого взаимодействия с каталитическим сайтом фермента.

Выводы, сделанные на основе результатов экспериментов с бактериальными токсинами, подтверждаются данными, полученными с помощью С-концевых пептидов α -субъединиц G-белков, которые селективно, по конкурентному механизму, нарушают процессы передачи гормональных сигналов, осуществляемые через те типы G-белков, производными которых они являются. Так, в присутствии С-концевого пептида 385—394 α_s -субъединицы G_s -белка снижаются стимулирующие АЦ-эффекты пептидов I и II в сердечной мышце крысы (см. таблицу). В присутствии С-концевого пептида 346—355 α_{12} -субъединицы G_i -белка эти эффекты пептидов возрастают. Пептид 346—355 α_{12} снижает ингибирование пептидом I активности АЦ, стимулированной форсколином, но слабо влияет на ингибирование этой активности, осуществляемое пептидом II. Пептид 346—355 α_{12}

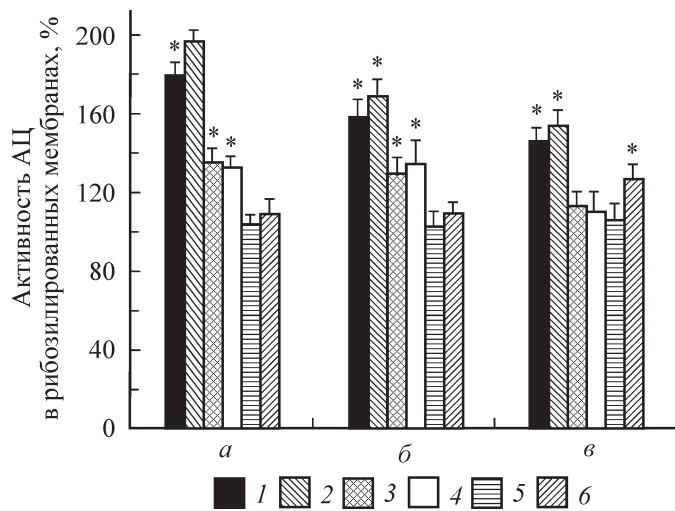


Рис. 4. Влияние АДФ-рибозилирования коклюшным токсином на АЦ-эффекты поликатионных пептидов.

Активность АЦ, принятая за 100 %, в АДФ-рибозилированных коклюшным токсином мембранах составляла: в стриатуме мозга и сердечной мышце крысы — 80.4 ± 7.4 и 17.4 ± 1.6 соответственно, в гладких мышцах моллюска — 25.8 ± 1.8 пмоль цАМФ за 1 мин на 1 мг мембранного белка. Остальные обозначения те же, что и на рис. 3.

Fig. 4. The influence of ADP-ribosylation by pertussis toxin on AC effects of polycationic peptides.

AC activities in ADP-ribosylated by cholera toxin membranes of brain striatum and heart muscle of rat and in smooth muscles of mollusc are 80.4 ± 7.4 , 17.4 ± 1.6 and 25.8 ± 1.8 pmoles of cAMP/min per 1 mg of membrane protein, respectively, were taken as 100 %. Other designations are as in Fig. 3.

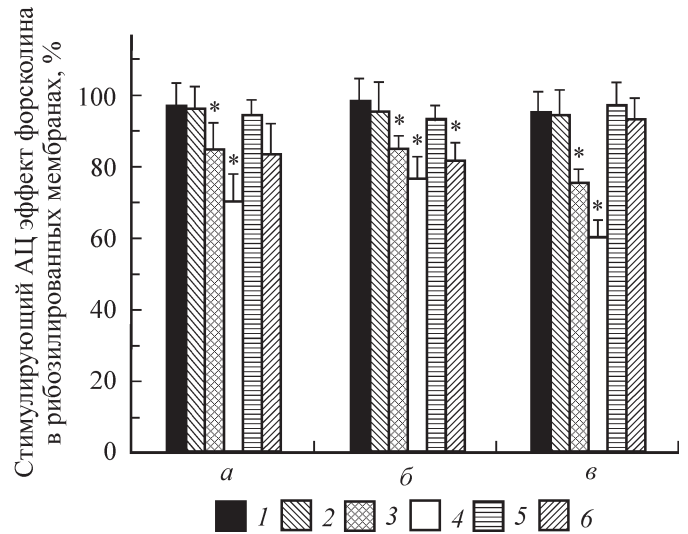


Рис. 5. Влияние АДФ-рибозилирования коклюшным токсином на ингибирование поликатионными пептидами активности АЦ, стимулированной форсколином (10^{-5} М).

Эффект форсколина в отсутствие пептидов принят за 100 %. Значения стимулирующего АЦ-эффекта форсколина, достоверно сниженные в присутствии пептидов ($P < 0.05$), отмечены звездочками. Остальные обозначения те же, что и на рис. 3.

Fig. 5. The influence of ADP-ribosylation by pertussis toxin on the inhibition of forskolin-stimulates AC activity by polycationic peptides.

Axis Y — AC stimulating effect of forskolin (10^{-5} M), %. The effect of forskolin without peptides was taken as 100 %. Statistical significance of differences between AC stimulating effects of forskolin in the presence and without the peptides is indicated by asterisks ($P < 0.05$). Other designations are as in Fig. 3.

Влияние поликатионных пептидов на базальную и стимулированную форсколином (10^{-5} М) активность АЦ в сердечной мышце крысы в присутствии С-концевых пептидов 385—394 α_s -субъединицы и 346—355 α_{12} -субъединицы G-белка

Воздействие	Активность АЦ, пмоль цАМФ за 1 мин на 1 мг мембранного белка ($M \pm m$)		
	в отсутствие С-концевых пептидов	пептиды 385—394 α_s , 10^{-4} М	пептид 346—355 α_{12} , 10^{-4} М
В отсутствие форсколина			
Без добавок	16.6 ± 1.1	15.8 ± 1.3	16.1 ± 1.4
Пептид I, 10^{-5} М	24.4 ± 1.4 (+47 %)	17.0 ± 1.5 [+8 %]	26.7 ± 1.0 [+66 %]
	22.4 ± 1.9 (+35 %)	18.1 ± 1.2 [+15 %]	28.3 ± 2.2 [+76 %]
Пептид II, 10^{-5} М	20.1 ± 1.8 (+21 %)	17.1 ± 1.0 [+8 %]	22.1 ± 1.1 [+37 %]
	16.1 ± 1.2 (-3 %)	15.6 ± 1.4 [-1 %]	22.0 ± 1.4 [+37 %]
Мастопаран, 10^{-5} М	14.9 ± 1.2 (-10 %)	14.0 ± 1.3 [-11 %]	16.3 ± 1.2 [+1 %]
	14.6 ± 0.9 (-12 %)	13.2 ± 0.9 [-16 %]	16.4 ± 0.7 [+2 %]
В присутствии форсколина (10^{-5} М)			
Без добавок	92.2 ± 4.9 (+455 %)	96.6 ± 5.7 [+511 %]	95.2 ± 7.5 [+491 %]
Пептид I, 10^{-5} М	84.6 ± 6.2 (+410 %)	78.9 ± 6.0 [+399 %]	88.9 ± 7.2 [+452 %]
	74.8 ± 4.8 (+351 %)	67.4 ± 5.5 [+327 %]	86.7 ± 5.1 [+439 %]
Пептид II, 10^{-5} М	79.2 ± 4.1 (+377 %)	75.8 ± 5.2 [+380 %]	80.2 ± 3.6 [+398 %]
	62.8 ± 5.8 (+278 %)	60.9 ± 4.3 [+285 %]	73.0 ± 5.9 [+353 %]
Мастопаран, 10^{-5} М	67.9 ± 4.2 (+309 %)	65.3 ± 3.2 [+313 %]	79.8 ± 4.8 [+396 %]
	36.1 ± 2.5 (+117 %)	37.2 ± 3.5 [+135 %]	76.8 ± 4.2 [+377 %]

Примечание. В круглых скобках приведены величины эффекта синтетических пептидов и мастопарана на активность АЦ по отношению к базальному уровню фермента; в квадратных скобках — величины их эффекта по отношению к активности АЦ в присутствии С-концевых пептидов.

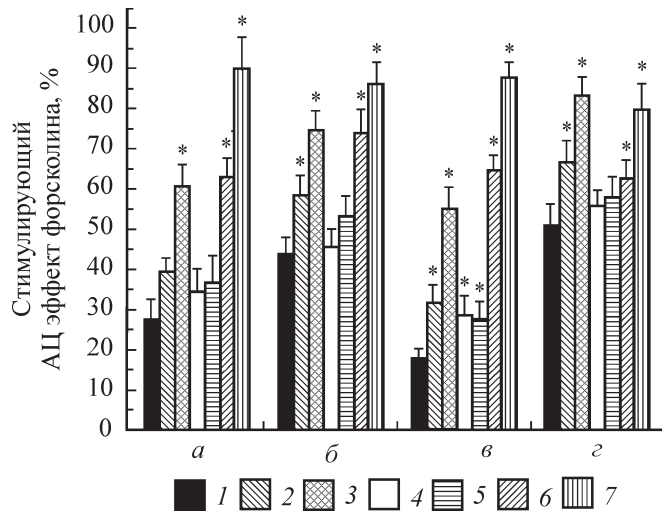


Рис. 6. Влияние поликатионных пептидов на ингибирование гормонами активности АЦ, стимулированной форсколином.

a — соматостатин (10^{-7} М), стриатум мозга крысы; *б* — бромкриптин (10^{-5} М), стриатум мозга крысы; *в* — соматостатин (10^{-7} М), сердечная мышца крысы; *г* — изопротеренол (10^{-5} М), гладкие мышцы моллюска. 1 — без пептида; 2 — пептид I, 10^{-5} М; 3 — пептид I, 10^{-4} М; 4 — пептид II, 10^{-5} М; 5 — пептид II, 10^{-4} М; 6 — мастопаран, 10^{-5} М; 7 — мастопаран, 10^{-4} М. Эффект форсколина (10^{-5} М) в отсутствие пептидов принят за 100%. Значения стимулирующего АЦ-эффекта форсколина, ингибированного гормоном в отсутствие пептидов, достоверно повышенные в их присутствии ($P < 0.05$), отмечены звездочками.

Fig. 6. The influence of polycationic peptides on the inhibition of forskolin-stimulated AC activity by the hormones.

a — somatostatin (10^{-7} M), brain striatum of rat; *б* — bromocryptine (10^{-5} M), brain striatum of rat; *в* — somatostatin (10^{-7} M), heart muscle of rat; *г* — isoproterenol (10^{-5} M), smooth muscles of mollusc. 1 — without peptide; 2 — peptide I, 10^{-5} M; 3 — peptide I, 10^{-4} M; 4 — peptide II, 10^{-5} M; 5 — peptide II, 10^{-4} M; 6 — mastoparan, 10^{-5} M; 7 — mastoparan, 10^{-4} M. Axis Y — AC stimulating effect of forskolin (10^{-5} M), %. The effect of forskolin without peptides was taken as 100%. Statistical significance of differences between AC inhibiting effects of the hormones on forskolin-stimulated enzyme activity in the presence of and without peptides is indicated by asterisks ($P < 0.05$).

в значительной степени снижает ингибирование мастопараном стимулирующего АЦ-эффекта форсколина и полностью блокирует его эффект на базальную активность АЦ в сердечной мышце (см. таблицу). Качественно сходная картина наблюдалась нами в стриатуме мозга крысы и гладких мышцах моллюска (данные не представлены). Следует, однако, отметить, что в гладких мышцах моллюска действие С-концевых пептидов было выражено слабее, чем в тканях крысы.

На заключительном этапе исследований было изучено влияние поликатионных пептидов на регуляцию функциональной активности АЦ гормонами, являющимися как стимуляторами, так и ингибиторами активности фермента. Сначала исследовали влияние пептидов на ингибирующие АЦ-эффекты гормонов, осуществляемые ими через G_i -белки. Эти эффекты выявлялись при действии соматостатина (10^{-7} М) и агониста D_2 -дофаминовых рецепторов бромкриптина (10^{-5} М) в стриатуме мозга крысы, соматостатина (10^{-7} М) в сердечной мышце и изопротеренола (10^{-5} М) в мышцах моллюска на активность фермента, стимулированного форсколином (рис. 6). Об участии G_i -белков в реализации регуляторного влияния этих гормонов на активность АЦ свидетельствует, во-первых, то, что эффекты гормонов полностью (соматоста-

тин) или частично (бромкриптин и изопротеренол) блокируются обработкой КТ и заметно снижаются в присутствии пептида 346—355 α_{i2} -субъединицы (данные не представлены), и, во-вторых, результаты наших предыдущих исследований, в которых выявлено ингибирующее АЦ влияние бромкриптина в стриатуме мозга крысы (Шпаков и др., 2004в) и изопротеренола в гладких мышцах моллюсков (Pertseva et al., 1992).

Показано, что мастопаран в концентрациях 10^{-5} и 10^{-4} М дозозависимо подавлял ингибирующие АЦ-эффекты гормонов в тканях крысы (в мышцах моллюска влияние мастопарана проявлялось слабо), причем наиболее чувствительным к его действию был ингибирующий эффект соматостатина. Пептид I в тканях крысы также снижал ингибирующие АЦ-эффекты гормонов, но слабее, чем мастопаран (рис. 6). В мышцах моллюска действие пептида I, наоборот, было более отчетливым в сравнении с таковым мастопарана. Пептид II был менее эффективен и заметно снижал лишь ингибирующий АЦ-эффект соматостатина в сердечной мышце.

Далее исследовали влияние поликатионных пептидов на стимулирующие АЦ-эффекты 10^{-5} М изопротеренола (+123%) в сердечной мышце и 10^{-5} М серотонина (+94%) в стриатуме мозга, действие которых осуществляется через G_s -белки. Показано, что пептиды I и II дозозависимо снижают стимулирующие АЦ-эффекты гормонов, в то время как влияние мастопарана в этом случае практически не выявляется (рис. 7). Следовательно, синтетические пептиды, стимулируя G_s -белки, по конкурентному механизму блокируют проведение стимулирующих сигналов к ферменту АЦ, в то время как

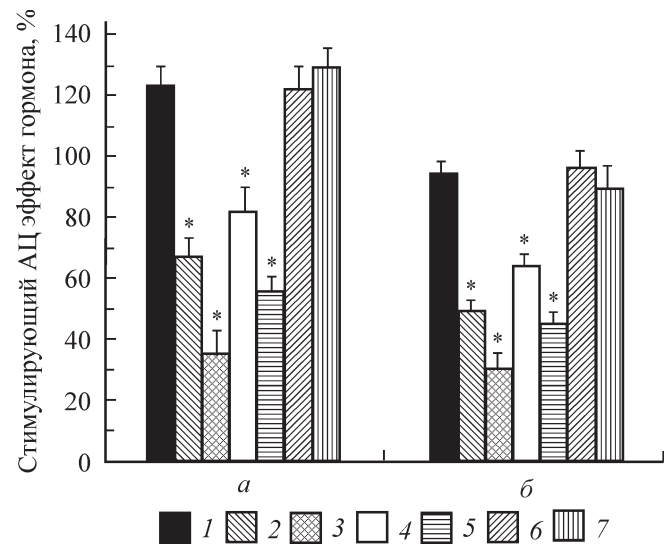


Рис. 7. Влияние поликатионных пептидов на стимулирующий АЦ-эффект гормонов в тканях крысы.

a — серотонин (10^{-5} М), стриатум мозга; *б* — изопротеренол (10^{-5} М), сердечная мышца. Значения стимулирующего АЦ-эффекта гормона, достоверно сниженные в присутствии пептидов ($P < 0.05$), отмечены звездочками. Остальные обозначения те же, что и на рис. 6.

Fig. 7. The influence of polycationic peptides on AC stimulating effect of the hormones in rat tissues.

a — serotonin (10^{-5} M), brain striatum; *б* — isoproterenol (10^{-4} M), heart muscle. Axis Y — AC stimulating effect of hormone, %. Statistical significance of differences between AC stimulating effects of the hormones in the presence of and without peptides is indicated by asterisks ($P < 0.05$). Other designations are as in Fig. 6.

мастопаран, который не влияет на функциональную активность G_s -белков, проведению этих сигналов не препятствует.

Обсуждение

Ранее нами было показано, что синтетические поликатионные пептиды, образующие α -спиральные структуры, способны влиять как на базальную, так и на стимулированную гормональными и негормональными агентами активность АЦ в тканях позвоночных и беспозвоночных животных (Шпаков и др., 2001, 2003, 2004а, 2004б, 2004г, 2005). Эффективность влияния пептидов на функциональную активность АЦ-системы определялась такими их характеристиками, как присутствие в молекуле гидрофобных радикалов, образование разветвленных звездообразных структур, плотность и распределение положительно заряженных аминокислотных остатков, присутствие отрицательно заряженных аминокислот, способность к образованию амфипатических α -спиралей. Однако молекулярные основы их действия на сигнальные белки — компоненты АЦ-системы, в первую очередь на гетеротримерные G-белки, остаются до конца не выясненными.

В рамках настоящего исследования были изучены молекулярные механизмы влияния синтетических поликатионных пептидов на функциональную активность гетеротримерных G-белков. Основываясь на ранее полученных результатах, были выбраны два пептида, относящихся к двум различающимся по своей структурной организации группам поликатионных пептидов: один из них (пептид I) содержал гидрофобные C10-радикалы, в то время как другой (пептид II) имел разветвленную звездообразную структуру. Биологические свойства каждого из пептидов отражали наиболее типичные свойства других пептидов, относящихся к той же структурной группе (Шпаков и др., 2003, 2004а, 2004б).

Исследование проводили в сравнительном аспекте. Во-первых, в качестве мишеней были избраны АЦ-системы животных различного филогенетического уровня — крысы (позвоночные) и двустворчатого моллюска *A. sygnea* (беспозвоночные). Во-вторых, в случае крысы исследовали различные ткани — стриатум головного мозга и сердечную мышцу. В-третьих, действие синтетических пептидов сравнивали с действием природного поликатионного пептида мастопарана — компонента яда насекомых (ос, пчел и шершней). Как известно, этот природный токсин с высокой селективностью активирует гетеротримерные G-белки $G_{i/o}$ -семейства, но практически не действует на другие их семейства (Higashijima et al., 1990; Tanaka et al., 1998; Whitman et al., 2000; Bakker et al., 2004; Olearczyk et al., 2004). Следует, однако, отметить, что наряду с позвоночными мы изучали влияние мастопарана на компоненты АЦ-системы моллюска *A. sygnea*, представителя беспозвоночных животных, что отличает наше исследование от работ других авторов, которые в качестве мишеней действия мастопарана выбирали ткани позвоночных животных.

Полученные нами с применением различных подходов и методов данные указывают на то, что хотя синтетические поликатионные пептиды и способны дозозависимо стимулировать активность гетеротримерных G-белков, но в отличие от природного поликатиона мастопарана их действие на G-белки не является селективным —

синтетические пептиды стимулируют как G_s -, так и G_i -белки. Так, их эффекты отчетливо снижаются после обработки мембран холерным и коклюшным токсинами и ингибируются в присутствии пептидов, соответствующих C-концевым участкам 385—394 α_s - и 346—355 α_{i2} -субъединиц G-белков. Наряду с этим синтетические пептиды дозозависимо снижают величину как стимулирующих, так и ингибирующих АЦ-активность эффектов гормонов, влияя, таким образом, на сигнальные пути, в которых участвуют G-белки, относящиеся соответственно к G_s - и $G_{i/o}$ -семействам. Мастопаран в свою очередь стимулирует только G_i -белки и блокирует только те гормональные сигналы, которые реализуются с участием этих G-белков. Необходимо также отметить, что пептид II с разветвленной структурой не только взаимодействует с G-белками (менее эффективно, чем мастопаран и пептид I), но и ингибирующим образом действует непосредственно на каталитический компонент АЦ-системы — фермент АЦ. Об этом свидетельствует отчетливое ингибирование пептидом II стимулированной форсколином активности АЦ даже в условиях АДФ-рибозилирования мембран КТ, который, как известно, инактивирует $G_{i/o}$ -белки и тем самым предотвращает ингибирование фермента агентами, осуществляющими свое действие через G-белки $G_{i/o}$ -семейства. Следует отметить, что ингибирующее влияние пептида I на активность АЦ, стимулированную форсколином, полностью блокируется КТ, и это указывает на отсутствие заметного влияния пептида, содержащего гидрофобные радикалы, но не имеющего разветвленной структуры, на каталитический сайт фермента.

Совокупность полученных нами данных свидетельствует о том, что формирование пептидами поликатионной амфипатической спирали само по себе не является достаточным условием для селективной активации ими определенных типов G-белков (например, G_i -белков), и важную роль здесь играют первичная структура пептидов, определяющая распределение положительно заряженных групп на поверхности этой спирали, а также наличие кластеров гидрофобных аминокислот или моделирующих эти кластеры гидрофобных радикалов. Можно предположить, что мастопаран и другие природные поликатионные пептиды (мелиттин, брадикинин, субстанция P и др.), обладающие способностью селективно взаимодействовать с одними типами G-белков, но не затрагивать при этом другие их типы, приобрели эту способность в процессе эволюции. Однако если в тканях позвоночных животных селективность влияния мастопарана на активность G-белков проявляется отчетливо, то в гладких мышцах моллюска, представителя беспозвоночных животных, как впервые показано нами в настоящем исследовании, этот пептид обладает более низкой селективностью и эффективностью своего действия на G-белки и в концентрации 10^{-4} М стимулирует, наряду с $G_{i/o}$ -белками, также и G_s -белки.

Применение C-концевых пептидов α -субъединиц G-белков позволило установить, что синтетические поликатионные пептиды, так же как и мастопаран, взаимодействуют с общим сайтом на молекуле G-белка — C-концевым сегментом его α -субъединицы. На участие этого сегмента во взаимодействии с мастопараном указывали и другие авторы (Higashijima et al., 1990; Tanaka et al., 1998; Breitweg-Lehmann et al., 2002). Нами показано, что C-концевой пептид 346—355 α_{i2} -субъединицы G_i -белка в значительной степени блокирует снижение

мастопараном и синтетическими пептидами I и II активности АЦ, стимулированной форсколином, и это свидетельствует о взаимодействии как природных (мастопаран), так и синтетических поликатионных пептидов с С-концевым участком α_1 -субъединицы. Действие пептида 346—355 α_2 более эффективно в случае мастопарана, в основе чего, как мы полагаем, лежит более эффективное взаимодействие между этим пептидным токсином и С-концевым участком α_1 -субъединицы. В присутствии С-концевого пептида 385—394 α_5 -субъединицы G_s -белка снижаются стимулирующие АЦ-эффекты пептидов I и II, что указывает на участие С-концевого участка α_5 -субъединицы во взаимодействии с синтетическими поликатионными пептидами. При этом пептид 385—394 α_5 никак не влияет на эффекты мастопарана, что, как мы полагаем, связано с наличием в структуре пептидного токсина молекулярных детерминант, ответственных за селективность активации G-белков и препятствующих такому взаимодействию. Эти детерминанты блокируют взаимодействие с G-белками G_s -семейства до определенного порога концентрации мастопарана (около $2 \cdot 10^{-4}$ М), при повышении которого селективность в действии мастопарана падает. В случае моллюска этот порог несколько снижен. Причиной этого, вероятно, и является то, что даже небольшое изменение конформации С-концевого сегмента в молекуле α_5 -субъединицы G-белка моллюска может в значительной степени изменить ее способность эффективно взаимодействовать с молекулярными детерминантами мастопарана, определяющими селективность его активирующего действия на G-белки.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 03-04-49114).

Список литературы

- Шпаков А. О. 2002. Молекулярные детерминанты в рецепторах серпантинного типа, ответственные за их функциональное сопряжение с гетеротримерными G-белками. Цитология. 44 (3) : 242—258.
- Шпаков А. О. 2003. Участие заряженных аминокислотных остатков цитоплазматических петель рецепторов серпантинного типа в процессе передачи гормонального сигнала. Журн. эволюц. биохим. физиол. 39 (2) : 205—217.
- Шпаков А. О., Гурьянов И. А., Авдеева Е. В., Воробьев В. И., Власов Г. П. 2004а. Молекулярные механизмы действия звездообразных поликатионных пептидов, содержащих последовательность 48—60 ТАТ-белка ВИЧ-1, на функциональную активность аденилатциклазной сигнальной системы. Цитология. 46 (11) : 1011—1022.
- Шпаков А. О., Гурьянов И. А., Власова Е. Н., Корольков В. И., Кузнецова Л. А., Плеснева С. А., Власов Г. П., Перцева М. Н. 2003. Ингибирование синтетическими катионными пептидами стимулирующего влияния гормонов на функциональную активность аденилатциклазной сигнальной системы. Докл. РАН. 389 (1) : 127—130.
- Шпаков А. О., Гурьянов И. А., Воробьев В. И., Авдеева Е. В., Кузнецова Л. А., Плеснева С. А., Чубей Н. М., Перцева М. Н., Власов Г. П. 2004б. Разобщающее влияние катионных пептидов, содержащих гидрофобные радикалы, на функциональное сопряжение рецепторов серпантинного типа с ГТФ-связывающими белками. Цитология. 46 (3) : 268—276.
- Шпаков А. О., Гурьянов И. А., Кузнецова Л. А., Плеснева С. А., Корольков В. И., Перцева М. Н., Власов Г. П. 2004в. Использование С-концевых пептидов α -субъединиц G-белков для исследования их функционального сопряжения с рецепторами биогенных аминов в тканях крыс и моллюсков. Биол. мембраны. 21 (6) : 441—450.
- Шпаков А. О., Деркач К. В., Гурьянов И. А., Успенская З. И., Кузнецова Л. А., Плеснева С. А., Власов Г. П., Перцева М. Н. 2005. Ингибирующее влияние поликатионных пептидов на регуляцию аденилатциклазы гормонами у инфузорий *Dileptus anser*. Цитология. 47 (8) : 714—722.
- Шпаков А. О., Корольков В. И., Власова Е. Н., Афонина М. П., Власов Г. П. 2001. Влияние синтетических катионных пептидов на активацию аденилатциклазной сигнальной системы биогенными аминами в мышечных тканях моллюсков и крыс. Цитология. 43 (5) : 483—490.
- Шпаков А. О., Корольков В. И., Гурьянов И. А., Власова Е. Н., Плеснева С. А., Кузнецова Л. А., Воробьев В. И., Чухиржина Е. В., Власов Г. П., Перцева М. Н. 2004г. Регуляторное влияние синтетических катионных пептидов, содержащих остатки глутаминовой кислоты, на функциональную активность компонентов аденилатциклазной сигнальной системы. Журн. эволюц. биохим. физиол. 40 (1) : 31—38.
- Шпаков А. О., Плеснева С. А., Кузнецова Л. А., Перцева М. Н. 2002. Исследование функциональной организации нового — аденилатциклазного сигнального механизма действия инсулина. Биохимия. 67 (3) : 403—412.
- Albrizio S., D'Ursi A., Fattorusso C., Galoppini C., Greco G., Mazzoni M. R., Novellino E., Rovero P. 2000. Conformational studies on a synthetic C-terminal fragment of the α subunit of G_s proteins. Biopolymers. 54 : 186—194.
- Bakker R. A., Casarosa P., Timmerman H., Smit M. J., Leurs R. 2004. Constitutively active $G_{q/11}$ -coupled receptor enable signaling by co-expressed $G_{i/o}$ -coupled receptors. J. Biol. Chem. 279 : 5152—5161.
- Breitweg-Lehmann E., Czupalla C., Storm R., Kudlacek O., Schunack W., Freissmuth M., Nurnberg B. 2002. Activation and inhibition of G protein by lipoamines. Mol. Pharmacol. 61 : 628—636.
- Bueb J.-L., Mousli M., Bronner C., Rouot B., Landry Y. 1990. Activation of G_i -like proteins, a receptor-independent effect of kinins in mast cells. Mol. Pharmacol. 38 : 816—822.
- Fujimoto I., Ikenaka K., Kondo T., Aimoto S., Kuno M., Mikoshiba K. 1991. Mast cell degranulating (MCD) peptide and its optical isomer activate GTP-binding protein in rat mast cells. FEBS Lett. 287 : 15—18.
- Fukushima N., Kohno M., Kato T., Kawamoto S., Okuda K., Misu Y., Ueda H. 1998. Melittin, a metastatic peptide inhibiting G_s activity. Peptides. 5 : 811—819.
- Hajos F. 1975. An improved method for the preparation of synaptosomal fractions in high purity. Brain Res. 93 : 485—489.
- Higashijima T., Burnier J., Ross E. M. 1990. Regulation of G_i and G_o by mastoparan, related amphiphilic peptides and hydrophobic amines. J. Biol. Chem. 265 : 14 176—14 186.
- Kidwai A. M., Radcliffe A. M., Lee E. V., Daniel E. E. 1973. Isolation and properties of skeletal muscle membrane. Biochim. biophys. acta. 289 : 593—607.
- Kusunoki H., Wakamatsu K., Sato K., Miyazawa T., Kohno T. 1998. G protein-bound conformation of mastoparan-X. Biochemistry. 37 : 4782—4790.
- Lambright D. G., Sondek J., Bohm A., Skiba N. P., Hamm H. E., Sigler P. B. 1996. The 2.0 Å crystal structure of a heterotrimeric G protein. Nature. 379 : 311—319.
- Leschke C., Storm R., Breitweg-Lehmann E., Exner T., Nurnberg B., Schunack W. 1997. Alkyl-substituted amino acid amides and analogous di- and triamines: new non-peptide G protein activators. J. Med. Chem. 40 : 3130—3139.
- Morizumi T., Imai H., Shichida Y. 2003. Two-step mechanism of interaction of rhodopsin intermediates with the C-terminal region of the transducin α -subunit. J. Biochem. (Tokyo). 134 : 259—267.
- Mousli M., Bronner C., Landry Y., Bockaert J., Rouot B. 1990. Direct activation of GTP-binding regulatory proteins (G proteins) by substance P and compound 48/80. FEBS Lett. 259 : 260—262.
- Novotny J., Gustafson B., Ransnas L. A. 1996. Inhibition of β -adrenergic receptor-mediated signals by a synthetic peptide deri-

ved from the α subunit of the stimulatory G-protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 219 : 619—624.

Nurnberg B., Togel W., Krause G., Storm R., Breitweg-Lehmann E., Schunack W. 1999. Non-peptide G protein activators as promising tools in cell biology and potential drug leads. *Eur. J. Med. Chem.* 34 : 5—30.

Olearczyk J. J., Stephenson A. H., Lonigro A. J., Sprague R. S. 2004. Heterotrimeric G protein G_i is involved in a signal transduction pathway for ATP release from erythrocytes. *Amer. J. Physiol.* 286 : 940—945.

Pertseva M. N., Kuznetsova L. A., Plesneva S. A., Grishin A. V., Panchenko M. P. 1992. β -Agonist-induced inhibitory-guanine-nucleotide-binding regulatory protein coupling to adenylyl cyclase in mollusk *Anodonta cygnea* foot muscle sarcolemma. *Eur. J. Biochem.* 210 : 279—286.

Plesneva S. A., Shpakov A. O., Kuznetsova L. A., Pertseva M. N. 2001. A dual role of protein kinase «C» in insulin signal transduction via adenylyl cyclase signaling system in muscle tissues of vertebrates and invertebrates. *Biochem. Pharmacol.* 61 : 1277—1291.

Reisine T. 1990. Pertussis toxin in the analysis of receptor mechanisms. *Biochem. Pharmacol.* 39 : 1499—1504.

Salomon Y., Londos C., Rodbell M. A. 1974. Highly sensitive adenylyl cyclase assay. *Anal. Biochem.* 58 : 541—548.

Shpakov A. O., Korolkov V. I., Plesneva S. A., Kuznetsova L. A., Pertseva M. N. 2005a. Effects of the C-terminal peptide of the α s subunit of the G protein on the regulation of adenylyl cyclase and protein kinase A activities by biogenic amines and glucagon in mollusk and rat muscles. *Neurosci. Behav. Physiol.* 35 : 177—186.

Shpakov A. O., Shipilov V. N., Bondareva V. M. 2005b. Sensitivity of adenylyl cyclase signaling system of the mollusk *A. cygnea* ganglions to serotonin and adrenergic agonists. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1040 : 466—468.

Tanaka T., Kohno T., Kinoshita S., Mukai H., Itoh H., Ohya M., Miyazawa T., Higashijima T., Wakamatsu K. 1998. α -Helix content of G protein α -subunit is decreased upon activation by receptor mimetics. *J. Biol. Chem.* 273 : 3247—3252.

Tomita U., Takahashi K., Ikenaka K., Kondo T., Fujimoto I., Aimoto S., Mikoshiba K., Ui M., Katada T. 1991. Direct activation of GTP-binding proteins by venom peptides that contain cationic clusters within their α -helical structures. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 178 : 400—406.

Whitman S. C., Daugherty A., Post S. R. 2000. Macrophage colony-stimulating factor rapidly enhances β -migrating very low-density lipoprotein metabolism in macrophages through activation of a G_{i_0} protein signaling pathway. *J. Biol. Chem.* 275 : 35 807—35 813.

Поступила 20 X 2005

COMPARATIVE STUDY OF MOLECULAR MECHANISMS OF NATURAL AND SYNTHETIC POLYCATIONIC PEPTIDES ACTION ON THE ACTIVITY OF THE ADENYLYL CYCLASE SIGNALING SYSTEM

A. O. Shpakov,¹ I. A. Guryanov,² L. A. Kuznetsova,¹ S. A. Plesneva,¹ E. T. Zakharova,³
G. P. Vlasov,² M. N. Pertseva¹

¹ I. M. Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry RAS,

² Institute of Macromolecular Compounds RAS, and ³ Institute of Experimental Medicine RAMS, St. Petersburg;
e-mail: alex_shpakov@list.ru

The molecular mechanisms of action of natural and synthetic polycationic peptides, forming amphiphilic helices, on the heterotrimeric G-proteins and enzyme adenylyl cyclase (AC), components of hormone-sensitive AC system, were studied. It is shown that synthetic peptides C- ϵ Ahx-WKK(C₁₀)-KKK(C₁₀)-KKKK(C₁₀)-YKK(C₁₀)-KK (peptide I) and (GRGDSGRKKRRRPPQ)₂-K- ϵ Ahx-C(Acm)(peptide II) in dose-dependent manner stimulate the basal AC activity, inhibit forskolin-stimulated AC activity and decrease both stimulating and inhibiting AC effects of the hormones in the tissues (brain striatum, heart muscle) of rat and in smooth muscles of the mollusc *Anodonta cygnea*. AC effects of these peptides are decreased after membrane treatment by cholera and pertussis toxins and are inhibited in the presence of the peptides, corresponding to C-terminal regions 385—394 α_s - and 346—355 α_2 -subunits of G-proteins. These data give evidence that the peptides I and II act on the signaling pathways which are realized through G_s - and G_i -proteins. At the same time, natural polycationic peptide mastoparan acts on AC system through G_i -proteins and blocks hormonal signals mediated via G_i -proteins only. Consequently, the action of mastoparan on G-proteins is selective and differs from the action of the synthetic peptides. It is also shown that peptide II, with branched structure, directly interacts not only with G-proteins (less effective in comparison with peptide I with hydrophobic radicals and mastoparan), but also with enzyme AC, the catalytic component of AC system. On the basis of data obtained the following conclusions were made: 1) the formation of amphiphilic helices is not enough for selective activation of G-protein by polycationic peptides, and 2) the primary structure of the peptides, the distribution of positive charged amino acids and hydrophobic radicals in them are very important for selective interaction between polycationic peptides and G-proteins.

Key words: adenylyl cyclase, bacterial toxin, GTP-binding protein, mastoparan, polycationic peptide, heart muscle, C-terminal peptide, brain striatum.