

РЕЦЕПТОР СЕРПАНТИННОГО ТИПА И ГЕТЕРОТРИМЕРНЫЙ G-БЕЛОК КАК МИШЕНИ ДЕЙСТВИЯ ПОЛИЛИЗИНОВЫХ ДЕНДРИМЕРОВ

© А. О. Шпаков,¹ И. А. Гурьянов,² Н. В. Баянова,² Г. П. Власов²

¹ Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова РАН
и ² Институт высокомолекулярных соединений РАН, Санкт-Петербург;

¹ электронный адрес: alex_shpakov@list.ru

Исследованы молекулярные механизмы действия поликатионных пептидов, представляющих собой полилизиновые гомо- и гетеродендримеры, которые предполагается использовать в качестве высокоэффективных полимерных носителей биологически активных веществ, влияющих на функциональную активность чувствительной к биогенным аминам и пептидным гормонам аденилатциклазной сигнальной системы (АЦ-системы) в миокарде и мозге крыс. Полилизиновые гомодендримеры третьей [(NH₂)₁₆(Lys)₈(Lys)₄(Lys)₂Lys-Ala-NH₂] (I), четвертой [(NH₂)₃₂(Lys)₁₆(Lys)₈(Lys)₄(Lys)₂Lys-Ala-NH₂] (II) и пятой [(NH₂)₆₄(Lys)₃₂(Lys)₁₆(Lys)₈(Lys)₄(Lys)₂Lys-Ala-NH₂] (III) генераций, а также полилизиновые гетеродендримеры пятой генерации — [(NH₂)₆₄(Lys-Glu)₃₂(Lys-Glu)₁₆(Lys-Glu)₈(Lys-Glu)₄(Lys-Glu)₂Lys-Ala-Ala-Lys(ClAc)-Ala-NH₂] (IV), [(NH₂)₆₄(Lys-Ala)₃₂(Lys-Ala)₁₆(Lys-Ala)₈(Lys-Ala)₄(Lys-Ala)₂Lys-Ala-Lys(ClAc)-Ala-Ala-NH₂] (V) и [(NH₂)₆₄(Lys-Gly-Gly)₃₂(Lys-Gly-Gly)₁₆(Lys-Gly-Gly)₈(Lys-Gly-Gly)₄(Lys-Gly-Gly)₂Lys-Gly-Gly-Lys(ClAc)-Ala-Ala-NH₂] (VI) — по не зависящему от рецептора механизму стимулировали активность гетеротримерных G-белков преимущественно ингибирующего типа, взаимодействуя с С-концевыми участками их α-субъединиц. Наиболее эффективными активаторами G-белков были гомодендримеры II и III и гетеродендример V. Полилизиновые дендримеры нарушали функциональное сопряжение рецепторов биогенных аминов и пептидных гормонов с G₁-белками и в существенно меньшей степени — с G_s-белками. Это выражалось в ослаблении регуляторных эффектов этих гормонов на активность АЦ и ГТФ-связывание G-белков, а также в снижении аффинности рецепторов к агонистам в присутствии полилизиновых дендримеров, которое является следствием диссоциации комплекса рецептор—G-белок. Показано также, что по молекулярным механизмам и селективности своего действия на G-белки полилизиновые дендримеры сходны с мастопараном и мелиттином — природными токсинами из яда насекомых.

Ключевые слова: аденилатциклаза, адренергический рецептор, гетеротримерный G-белок, ГТФ-связывание, мастопаран, полилизиновый дендример, серотониновый рецептор.

Принятые сокращения: АЦ — аденилатциклаза, АЦ-система — аденилатциклазная сигнальная система, β-АР — β-адренергический рецептор, АКО — аминокислотный остаток, G-белок — гетеротримерный ГТФ-связывающий белок стимулирующего (G_s) или ингибирующего (G_i) типа, СР — серотониновый рецептор.

В настоящее время ведется интенсивный поиск водорастворимых поликатионных систем, которые могут быть использованы в качестве полимеров-носителей биологически активных веществ, обладающих противоопухолевой, антибактериальной и противовирусной активностью, а также при целевом транспорте генетического материала (ДНК) в новых биомедицинских технологиях, связанных с геной терапией. Наиболее перспективными среди таких носителей являются дендримеры на основе природной α-аминокислоты лизина. В процессе транспорта ДНК они обеспечивают оптимальную укладку фрагмента ДНК, обеспечивают его надежную защиту от расщепления нуклеазами крови, способствуют эффективному выходу комплексов ДНК из эндосом, являются биосовместимыми и биodeградируемыми. Как показано нами и другими авторами, поликатионные природные и синтетические пептиды с линейной и разветвленной структурами влияют на

функциональную активность гормональных сигнальных систем, в частности гормоночувствительной аденилатциклазной сигнальной системы (АЦ-системы). Они по не зависящему от рецептора механизму стимулируют гетеротримерные ГТФ-связывающие белки (G-белки), посредством которых осуществляется сопряжение активированного гормоном рецептора с ферментом-генератором вторичных посредников (Higashijima et al., 1990; Sukumar et al., 1997; Nurnberg et al., 1999; Breitweg-Lehmann et al., 2002; Vavac, 2004; Шпаков, Перцева, 2005; Shpakov, Pertseva, 2007). Вследствие этого для оптимизации структуры полимерных носителей на основе поликатионных пептидов, повышения эффективности и направленности их действия, а также для изучения особенностей их влияния на функциональное состояние клеток-мишеней необходимо изучение молекулярных механизмов действия поликатионных пептидов на гормональные сигнальные системы

и их компоненты. Исследование механизмов действия этих пептидов на сигнальные белки имеет большое значение и для выявления основополагающих принципов передачи гормонального сигнала в клетку. Это важно, ибо уже на начальных этапах эволюции хемосигнальных систем, на уровне прокариот, поликатионные пептиды были одними из ключевых сигнальных молекул, осуществляющих регуляцию этих систем и контроль фундаментальных клеточных процессов (Johnsborg et al., 2006; Reading, Sperandio, 2006; Шпаков, Перцева, 2008; Shpakov, Pertseva, 2008).

Цель настоящей работы состояла в изучении молекулярных механизмов влияния полилизиновых гомо- и гетеродендримеров на функциональную активность компонентов АЦ-системы, чувствительной к биогенным аминам и пептидным гормонам. Исследовали действие гормонов, регулирующих аденилатциклазу (АЦ) через различные типы гетеротримерных G-белков — стимулирующего (G_s) и ингибирующего (G_i) типов, в мозге и миокарде крыс.

Материал и методика

Для исследования рецепторного связывания, активности АЦ и ГТФ-связывания G-белков использовали фракции плазматических мембран миокарда и синапсомальных мембран мозга крыс линии Wistar, которые получали по известным методам (Kidwai et al., 1973; Hajos, 1975). Для получения каждой фракции брали 7—10 крыс.

Для проведения биологических экспериментов использовали следующие химические реактивы: соматостатин, изопротеренол, серотонин, бромкриптин, альпренолол, креатинфосфат, креатинфосфокиназу из мышц кролика (НФ 2.7.3.2), мастопаран, мелиттин, АТФ, цАМФ, ГТФ, β , γ -имидогуанозин-5'-трифосфат (GppNHp), имидазол, HEPES-Na, Tris-OH, Lubrol-PX, ЭДТА, ДТТ и БСА (Sigma, США). Релаксин-2 свиньи был любезно предоставлен проф. O. D. Sherwood (США). Для колоночной хроматографии использовали нейтральную окись алюминия (Reanal, Венгрия), для определения рецепторного связывания — фильтры GF/C (Sigma, США), для определения ГТФ-связывания — нитроцеллюлозные фильтры (тип HA, 0.45 мкм; Millipore, США). Для определения связывающих характеристик рецепторов использовали [пропил-2,3- 3 H]-дигидроальпренолол (3 H)-ДГА; 30 Ки/мМ; Amersham, Англия) и 5-[1,2- 3 H(N)]-гидрокситриптамиин (3 H)-серотонин; 27 Ки/мМ; NEN, США). Для определения активности АЦ — [α - 32 P]АТФ (4 Ки/мМ; Изотоп, Россия), для определения ГТФ-связывания — β , γ -имидо[8- 3 H]-гуанозин-5'-трифосфата аммонийную соль ([8- 3 H]GppNHp; 5 Ки/мМ; Amersham, Англия).

Полилизиновые гомодендримеры третьей [(NH₂)₁₆(Lys)₈(Lys)₄(Lys)₂Lys-Ala-NH₂] (I), четвертой [(NH₂)₃₂(Lys)₁₆(Lys)₈(Lys)₄(Lys)₂Lys-Ala-NH₂] (II) и пятой [(NH₂)₆₄(Lys)₃₂(Lys)₁₆(Lys)₈(Lys)₄(Lys)₂Lys-Ala-NH₂] (III) генераций и полилизиновые гетеродендримеры пятой генерации — [(NH₂)₆₄(Lys-Glu)₃₂(Lys-Glu)₁₆(Lys-Glu)₈(Lys-Glu)₄(Lys-Glu)₂Lys-Ala-Ala-Lys(ClAc)-Ala-NH₂] (IV), [(NH₂)₆₄(Lys-Ala)₃₂(Lys-Ala)₁₆(Lys-Ala)₈(Lys-Ala)₄(Lys-Ala)₂Lys-Ala-Lys(ClAc)-Ala-Ala-NH₂] (V) и [(NH₂)₆₄(Lys-Gly-Gly)₃₂(Lys-Gly-Gly)₁₆(Lys-Gly-Gly)₈(Lys-Gly-Gly)₄(Lys-Gly-Gly)₂Lys-Gly-Gly-Lys(ClAc)-Ala-Ala-NH₂] (VI), где Lys(ClAc) — N^ε-хлорацетиллизин — были получены в соответствии со стандартным твердофазным методом синтеза пептидов на

полимерном носителе — пара-метилбензгидриламиновой смоле со средней емкостью 0.55 ммоль/г (0.25 ммоль) — с помощью полуавтоматического синтезатора NPS-4000 (Neosystem Laboratoires, Франция), как описано ранее (Баянова и др., 2003; Власов и др., 2004, 2005).

Определение ГТФ-связывания G-белков проводили по методу (McIntire et al., 2001) с нашими модификациями (Шпаков и др., 2005б). Специфическое ГТФ-связывание определяли как разность связыванием меченого [8- 3 H]GppNHp в пробе в отсутствие ГТФ и в присутствии 10 мМ ГТФ и выражали в пмоль [8- 3 H]GppNHp на 1 мг мембранного белка. Определение активности АЦ (АТФ-пирофосфатлиаза циклизирующая, НФ 4.6.1.1) проводили по методу (Salomon et al., 1974) с нашими модификациями (Shpakov et al., 2006). Активность фермента выражали в пмоль цАМФ за 1 мин на 1 мг мембранного белка.

Определение β -адренергических рецепторов (β -АР) во фракциях плазматических мембран миокарда проводили по методу Перцевой и соавторов (Pertseva et al., 1992). Мембранный белок (150—200 мкг) инкубировали в течение 30 мин при 37 °С в 500 мкл инкубационной среды, содержащей 0.1—20 нМ [3 H]-ДГА, 10 мМ HEPES-Na-буфер, pH 7.5, и 5 мМ MgCl₂. Связывание останавливали добавлением 5 мл 10 мМ калий-фосфатного буфера, pH 8.0, фильтровали пробы через фильтры Whatman GF/C и трижды промывали их фосфатным буфером (по 5 мл). Фильтры высушивали и помещали в вials со сцинтилляционной смесью. Радиоактивность измеряли на счетчике Rackbeta (LKB, Швеция). Значения специфического связывания рассчитывали вычитанием неспецифического связывания [3 H]-ДГА, измеренного в присутствии 10⁻⁴ М немеченого альпренолола, из общего связывания с [3 H]-ДГА с мембранами. Кривые насыщения преобразовывали по методу Скэтчарда, что позволяло судить о средстве рецепторов (K_D) для [3 H]-ДГА.

Специфическое связывание серотониновых рецепторов (СР) в мозговой ткани определяли с помощью [3 H]-серотонина по методу (Clawges et al., 1997). Мембранный белок (100—150 мкг) инкубировали в течение 90 мин при комнатной температуре в 500 мкл инкубационной среды, содержащей 0.1—50 нМ [3 H]-серотонина, 50 мМ Tris-HCl-буфер, pH 7.5, 5 мМ MgCl₂ и 0.5 мМ ЭДТА. Связывание останавливали фильтрованием проб через фильтры GF/C, которые трижды промывали охлажденным до 4 °С 50 мМ Tris-HCl-буфером, pH 7.5, содержащим 5 мМ MgCl₂ и 0.5 мМ ЭДТА (по 4 мл). Фильтры высушивали, помещали во флаконы, в которые вносили по 5 мл сцинтилляционной жидкости, и измеряли в них радиоактивность на счетчике Rackbeta (LKB, Швеция). Неспецифическое связывание [3 H]-серотонина определяли в присутствии 10⁻⁴ М немеченого серотонина. Значения K_D рассчитывали так же, как и в случае β -АР.

Преинкубацию фракций плазматических мембран с дендримерами и пептидными токсинами в соответствующих концентрациях проводили на льду (4 °С) в течение 10 мин.

Статистический анализ полученных данных проводили с использованием компьютерной программы ANOVA. Данные представлены в виде среднего \pm стандартная ошибка среднего из нескольких независимых экспериментов. Различия между контрольными пробами и пробами, подвергнутыми воздействию гормонов или негормональных агентов, оценивали как достоверные при $P < 0.05$.

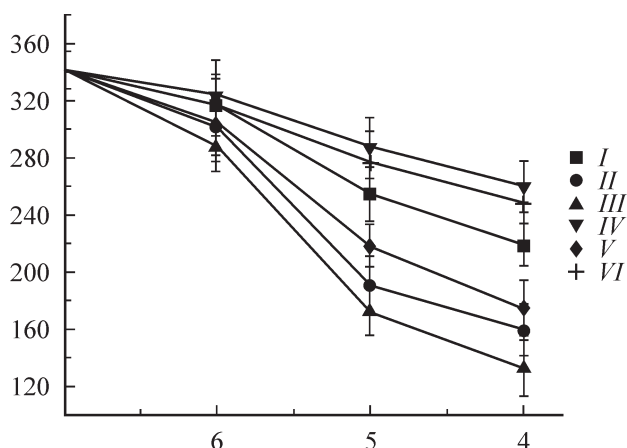


Рис. 1. Ингибирующее влияние дендримеров I—VI (I—VI) на стимуляцию форсколином активности аденилатциклазы (АЦ) в плазматических мембранах миокарда.

По оси абсцисс — отрицательный логарифм концентрации дендримера, М; по оси ординат — стимулирующий АЦ эффект 10^{-5} М форсколина, %; за 100 % принята базальная активность АЦ.

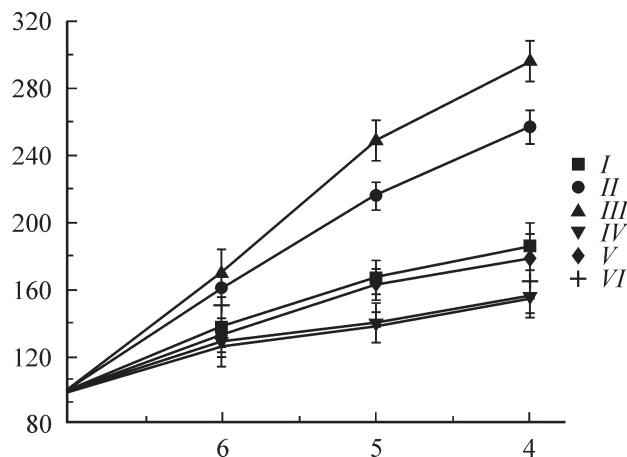


Рис. 2. Стимулирующее влияние дендримеров I—VI (I—VI) на ГТФ-связывание G-белков в мембранах миокарда.

По оси абсцисс — отрицательный логарифм концентрации дендримера, М; по оси ординат — ГТФ-связывание, %; за 100 % принят базальный уровень ГТФ-связывания, который составлял 2.41 ± 0.13 пмоль $[8\text{-}^3\text{H}]\text{-GppNHp}$ на 1 мг мембранного белка.

Результаты

На первом этапе изучали влияние полилизиновых дендримеров на базальную и стимулированную негормональными агентами (NaF, GppNHp и форсколин) активность АЦ в миокарде и мозге крыс. В отличие от изученных ранее поликатионных пептидов с линейной и разветвленной структурами, которые стимулировали АЦ в отсутствие гормонального воздействия (Шпаков и др., 2004а, 2004б, 2005а), полилизиновые гомо- и гетеродендримеры существенного влияния на базальную активность фермента не оказывали. Лишь гомодендример I третьей генерации и гетеродендример VI, содержащий между точками «ветвления» остатки дипептида глицил-глицина, в обеих тканях в незначительной степени стимулировали базальную активность АЦ (на 19—28 % в концентрации 10^{-5} М). Полилизиновые дендримеры также слабо влияли

на стимуляцию фермента NaF и GppNHp — активаторами гетеротримерных G_s -белков (данные не представлены). В то же время гомодендримеры II и III четвертой и пятой генераций и гетеродендример V пятой генерации, содержащий между точками «ветвления» остатки аланина, отчетливо снижали стимулированную форсколином активность АЦ (рис. 1), что наблюдалось нами ранее для разветвленных поликатионных пептидов (Шпаков и др., 2004а).

Все полилизиновые дендримеры в микромолярных концентрациях стимулировали ГТФ-связывание G-белков, причем наиболее эффективным был гомодендример III, а наименее эффективными были гетеродендримеры IV и VI (рис. 2). В присутствии сурамина — селективного ингибитора гетеротримерных G-белков — стимулирующих эффектов дендримеров на ГТФ-связывание не выявлялось (данные не представлены). Для выявления типа

Т а б л и ц а 1

Стимулирующее влияние дендримеров на ГТФ-связывание G-белков и действие на них С-концевых пептидов α -субъединиц G-белков в миокарде крыс

Вариант опыта	ГТФ-связывание, пмоль $[8\text{-}^3\text{H}]\text{-GppNHp}$ на 1 мг мембранного белка		
	без пептида	пептид 346—355 α_{i2} , 10^{-4} М	пептид 385—394 α_s , 10^{-4} М
Контроль (без дендримера)	2.41 ± 0.13	2.35 ± 0.15	2.33 ± 0.22
Дендример I, 10^{-5} М	4.02 ± 0.26 (+67)	3.38 ± 0.19 (+44)	3.32 ± 0.13 (+42)
II, 10^{-5} М	5.21 ± 0.20 (+116)	3.83 ± 0.26 (+63)	4.98 ± 0.34 (+114)
III, 10^{-5} М	6.00 ± 0.31 (+149)	4.01 ± 0.31 (+71)	5.65 ± 0.28 (+142)
IV, 10^{-5} М	3.37 ± 0.32 (+40)	2.95 ± 0.18 (+26)	3.13 ± 0.21 (+34)
V, 10^{-5} М	3.93 ± 0.22 (+63)	3.17 ± 0.17 (+35)	3.65 ± 0.19 (+57)
VI, 10^{-5} М	3.33 ± 0.23 (+38)	2.93 ± 0.17 (+25)	2.95 ± 0.13 (+27)
Мастопаран, 10^{-5} М	6.76 ± 0.37 (+180)	4.25 ± 0.28 (+81)	6.26 ± 0.45 (+169)
Мелиттин, 10^{-5} М	4.02 ± 0.22 (+67)	2.47 ± 0.23 (+5)	4.00 ± 0.26 (+72)

Примечание. В скобках приведен стимулирующий ГТФ-связывание эффект дендримера или пептидного токсина (%) по отношению к контролю.

Таблица 2

Влияние дендримеров на сродство к лигандам и число связывающих мест β -АР в миокарде и СР в мозге крыс

Вариант опыта	Связывание ДГА с β -АР		Связывание серотонина с СР	
	K_D (нМ)	V_{max} (фмоль на 1 мг белка)	K_D (нМ)	V_{max} (фмоль на 1 мг белка)
Контроль (без дендримера)	0.91 ± 0.09	110 ± 8	2.4 ± 0.3	165 ± 11
Дендример I, 10^{-4} М	0.93 ± 0.11	89 ± 7	4.6 ± 0.6	156 ± 16
II, 10^{-4} М	0.99 ± 0.10	87 ± 5	4.8 ± 0.4	158 ± 12
III, 10^{-4} М	1.01 ± 0.08	78 ± 9	5.5 ± 0.6	150 ± 15
IV, 10^{-4} М	1.00 ± 0.12	88 ± 6	3.1 ± 0.2	167 ± 13
V, 10^{-4} М	0.99 ± 0.10	82 ± 7	4.9 ± 0.5	161 ± 10
VI, 10^{-4} М	0.97 ± 0.12	83 ± 11	4.0 ± 0.5	167 ± 14

G-белков, являющихся мишенями действия полилизинных дендримеров, были применены пептиды, производные С-концевых участков α -субъединиц G-белков, которые селективно, по конкурентному механизму нарушают процессы передачи сигналов, осуществляемые через те типы G-белков, производными которых они являются (Шпаков и др., 2004в). В присутствии С-концевого пептида 346—355 α_{22} -субъединицы G_i -белка стимулирующие ГТФ-связывание эффекты дендримеров снижались, в наибольшей степени — в случае дендримеров II и III (табл. 1). В присутствии пептида 385—394 α_s -субъединицы G_s -белка снижение стимуляции ГТФ-связывания наблюдалось только в случае гомодендримера I и гетеродендримера VI. Эти данные указывают на то, что большинство исследованных нами дендримеров действует селективно на G_i -белки, и лишь дендримеры I и VI способны активировать также G_s -белки. В этом отношении полилизинные дендримеры сходны с токсинами из яда пчел — мастопараном и мелиттином, мишенями действия которых в основном являются G_i -белки (табл. 1). Так, стимулирующие ГТФ-связывание эффекты пептидных токсинов резко снижались (мастопаран) или полностью блокировались (мелиттин) в присутствии пептида 346—355 α_{22} .

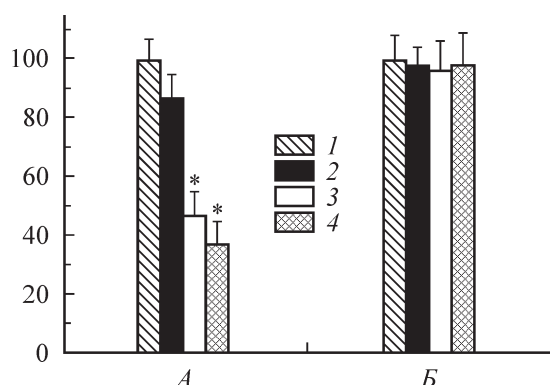


Рис. 3. Влияние дендримера III на связывание серотонина с мембранами мозга (А) и дигидроальпrenoла с мембранами миокарда (Б).

1 — контроль, 2—4 — 10^{-6} , 10^{-5} и 10^{-4} М дендримера III соответственно. По вертикали — специфическое связывание лиганда, %. Звездочкой помечены результаты, достоверно отличающиеся от контроля, $P < 0.05$ ($n = 8$).

Показано, что сродство антагониста [3 H]-ДГА к β -АР в миокарде в присутствии полилизинных дендримеров практически не меняется, в то время как число связывающих мест снижается на 20—30 % (табл. 2). В свою очередь сродство агониста [3 H]-серотонина к СР в мозге в присутствии дендримеров снижалось, наиболее отчетливо в случае гомодендримеров I—III и гетеродендримера V при слабом изменении числа связывающих мест гормона. Для исследования специфического связывания антагонистов и агонистов в присутствии возрастающих концентраций дендримера III мембраны инкубировали либо с антагонистом (нМ [3 H]-ДГА, миокард), либо с агонистом (2 нМ [3 H]-серотонин, мозг). Дендример III снижал связывание агониста серотонина, но не влиял на связывание антагониста ДГА (рис. 3).

Далее было изучено влияние полилизинных дендримеров на регуляторные эффекты соматостатина в миокарде и D_2 -агониста бромкриптина в мозге, которые действуют на АЦ через G_i -белки, и релаксина в миокарде и серотонина в мозге, которые осуществляют свое действие преимущественно через G_s -белки. В присутствии дендримера III отчетливо снижались ингибирующие эффекты соматостатина и бромкриптина на стимулированную форсколином активность АЦ (рис. 4) и их стимулирующие

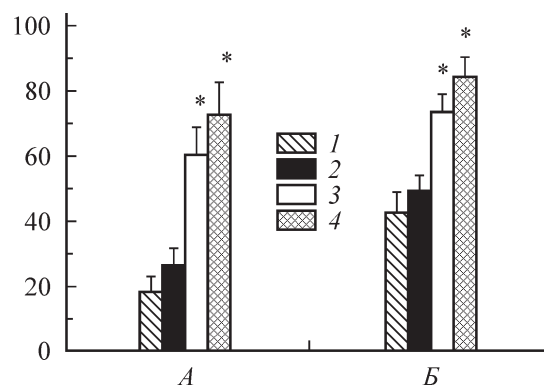


Рис. 4. Влияние дендримера III на ингибирование гормонами активности АЦ, стимулированной форсколином.

По вертикали — стимулирующее действие 10^{-5} М форсколина, %; действие форсколина в отсутствие гормона принято за 100 %. Звездочкой помечены результаты по действию дендримера III, достоверно отличающиеся от контроля, $P < 0.05$. А — соматостатин (10^{-7} М), миокард; Б — бромкриптин (10^{-4} М), мозг; 1 — без дендримера, 2—4 — активность АЦ при добавлении дендримера III в концентрации 10^{-6} , 10^{-5} или 10^{-4} М соответственно.

эффекты на ГТФ-связывание (рис. 5). Пептидные токсины мастопаран и мелиттин (10^{-5} М), которые являются селективными активаторами G_i -белков, также снижали ингибирующий АЦ эффекта соматостатина и бромкриптина и стимуляцию ими ГТФ-связывания (данные не представлены). Следует отметить, что нарушение передачи ингибирующего АЦ сигнала в присутствии мастопарана и мелиттина обусловлено их способностью конкурировать с рецепторами за связывание с α -субъединицей G_i -белка.

Стимулирующие АЦ и ГТФ-связывание эффекты релаксина и серотонин были менее чувствительны к дендримеру III в сравнении с эффектами гормонов — ингибиторов АЦ — и снижались в незначительной степени (рис. 6). Ингибирующее влияние дендримеров I, II и VI было сопоставимым по величине с таковым дендримера III, в то время как дендримеры IV и V были в этом отношении неэффективны (данные не представлены). Мастопаран, как и большинство полилизинных дендримеров, слабо влиял на эффекты гормонов — стимуляторов АЦ (данные не представлены), в то время как мелиттин, являющийся не только активатором G_i -белков, но и ингибитором G_s -белков, напротив, отчетливо снижал стимулирующие эффекты релаксина и серотонина на активность АЦ и ГТФ-связывание (рис. 6).

Обсуждение

Основные молекулярные детерминанты, ответственные за взаимодействие рецепторов серпантинного типа с G-белками, локализованы в проксимальных по отношению к мембране участках второй и третьей цитоплазматических петель рецептора, а также в сравнительно коротком участке его С-концевого домена, который непосредственно следует за седьмым трансмембранным доменом. Одной из особенностей этих участков, определяющих взаимодействие рецептора с α -субъединицами G-белков, является присутствие в них значительного числа положительно заряженных аминокислотных остатков (АКО), формирующих консенсусные мотивы ВВХХВ-типа, где В — положительно заряженный АКО (Шпаков, 2003). Другой их особенностью является склонность к формированию амфипатических α -спиралей, имеющих как ми-

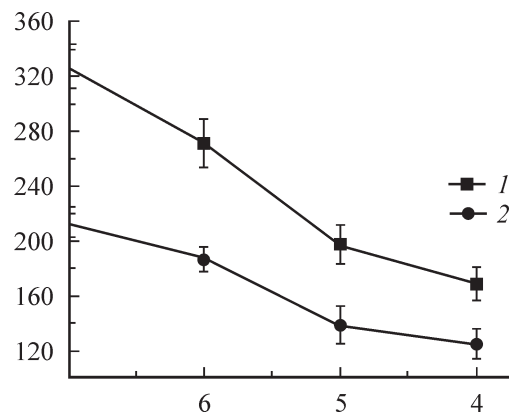


Рис. 5. Ингибирующее влияние дендримера III на стимуляцию ГТФ-связывания соматостатином в миокарде и бромкриптином в мозге.

По оси абсцисс — отрицательный логарифм концентрации дендримера, М; по оси ординат — ГТФ-связывание, %; за 100 % принят базальный уровень ГТФ-связывания, который в миокарде и мозге составлял соответственно 2.29 ± 0.16 и 6.80 ± 0.42 пмоль $[8\text{-}^3\text{H}]\text{-GppNHp}$ на 1 мг мембранного белка. 1 — соматостатин (10^{-7} М), миокард; 2 — бромкриптин (10^{-5} М), мозг.

нимум одну положительно заряженную сторону, с помощью которой участок рецептора взаимодействует с отрицательно заряженными С-концевыми участками α -субъединиц G-белков, что в конечном итоге и обеспечивает передачу сигнала с лигандсвязывающего сайта активированного гормоном рецептора на гуаниннуклеотидсвязывающий сайт G-белка. Синтетические пептиды, соответствующие по первичной структуре поликаатионным участкам цитоплазматических петель и С-концевого домена рецептора, способны в отсутствие гормональной стимуляции, по не зависимо от рецептора механизму активировать G-белки и гормональные системы в целом (подробнее см.: Шпаков, Перцева, 2005; Shpakov, Pertseva, 2007). Эти пептиды рассматривают как новое поколение высокоэффективных негормональных регуляторов чувствительных к гормонам сигнальных систем. Такие регуляторы обладают направленным действием и осуществляют регуляцию эффекторных систем, действуя на пост-рецепторных этапах сигнальной трансдукции. В пользу

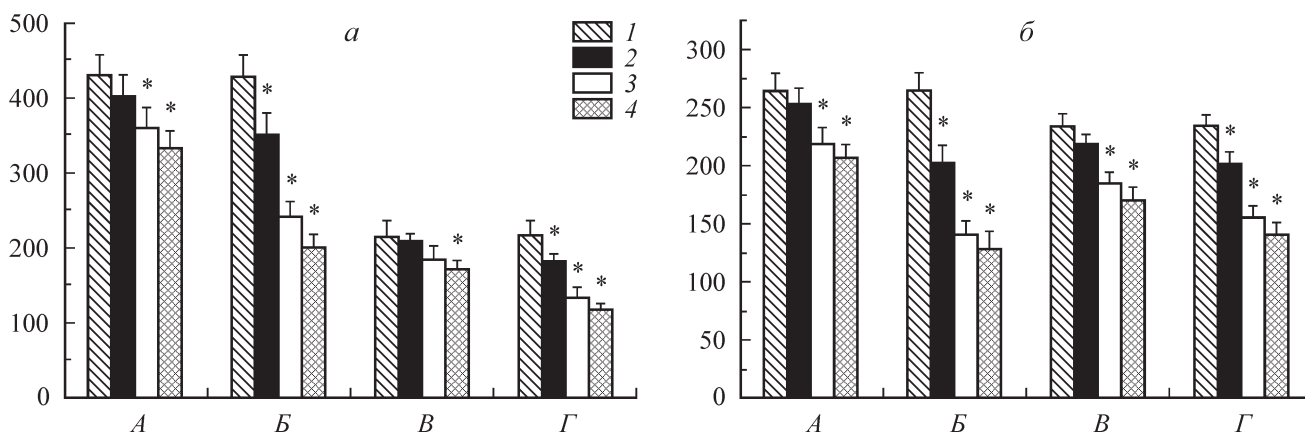


Рис. 6. Ингибирование дендримером III и мелиттином действия гормонов, стимулирующих АЦ (а) и ГТФ-связывание (б).

По вертикали — активность АЦ (а) и ГТФ-связывание (б), %, стимулированные гормонами; за 100 % приняты базальная активность АЦ, которая в миокарде и мозге составляла соответственно 23.5 ± 1.4 и 73.8 ± 3.1 пмоль цАМФ на 1 мг белка за 1 мин, и базальный уровень ГТФ-связывания. А, Б — релаксин (10^{-8} М), миокард; В, Г — серотонин (10^{-5} М), мозг. 1 — контроль, 2—4 — в присутствии 10^{-6} , 10^{-5} и 10^{-4} М дендримера III (А, В) или мелиттина (Б, Г) соответственно.

высокой селективности и эффективности их действия свидетельствуют наши данные по изучению влияния синтетических пептидов, соответствующих С-концевому участку третьей цитоплазматической петли рецептора релаксина LGR7, на функциональную активность компонентов АЦ-системы в тканях позвоночных и беспозвоночных животных (Шпаков и др., 2005б; Shpakov et al., 2007).

Другими негормональными регуляторами сигнальных систем являются пептидные токсины и бактериальные аутоиндукторы (Higashijima et al., 1990; Sukumar et al., 1997; Vavec, 2004; Johnsborg et al., 2006; Reading, Sperandio, 2006; Шпаков, Перцева, 2008), способные к формированию амфипатических поликатионных спиралей, а также модифицированные гидрофобными радикалами сравнительно короткие поликатионные пептиды (Leschke et al., 1997; Nurnberg et al., 1999; Breitweg-Lehmann et al., 2002). Несмотря на то что все эти регуляторы не имеют структурной гомологии с рецепторами и другими сигнальными белками, они взаимодействуют с отрицательно заряженными участками G-белков, стимулируют их ГТФ-связывающую и ГТФазную активность и запускают сигнальные каскады в отсутствие гормонального воздействия. Нами было синтезировано несколько групп поликатионных пептидов, обладающих как линейной, так и разветвленной («звездообразной») структурой, имеющих боковые гидрофобные радикалы, включающие в себя вставки из незаряженных или отрицательно заряженных АКО. Показано, что многие из них, хотя и с различной эффективностью, способны стимулировать G-белки, влиять на активность АЦ и, действуя по конкурентному механизму, нарушать передачу гормональных сигналов различной природы через АЦ-систему (Шпаков и др., 2004а, 2004б, 2005а, 2006; Shpakov, Pertseva, 2007). Эффективность взаимодействия поликатионных пептидов с сигнальными белками — компонентами АЦ-системы — определяется числом и распределением в них положительно заряженных АКО, а также наличием гидрофобных радикалов и других элементов структуры, обеспечивающих их способность связываться с гидрофобными поверхностями — плазматической мембраной или гидрофобными участками сигнальных белков. В то же время степень спиральности поликатионных пептидов слабо влияла на их биологическую активность. Возможно, это связано с тем, что доля спиральной конформации определялась в растворе, а в процессе взаимодействия с сигнальными белками она может сильно меняться вследствие «замораживания» вторичной структуры. Это, вероятно, и происходило в случае наиболее эффективных поликатионных пептидов со строго фиксированными гидрофобной и гидрофильной сторонами, имеющими гидрофобные радикалы, расположенные на одной из сторон спирали.

В настоящем исследовании нами были изучены синтезированные ранее гомо- и гетеродендримеры на основе α -лизина (Баянова и др., 2003; Власов и др., 2004, 2005), образующие жесткие сферические структуры, поверхностный слой которых покрыт положительно заряженными аминогруппами остатков лизина. Эти структуры с высокой эффективностью образуют комплексы с отрицательно заряженными полимерами как синтетического (полиметакриловая кислота), так и природного (фрагменты ДНК) происхождения. Полилизиновые дендримеры удовлетворяют всем основным требованиям, предъявляемым к негормональным активаторам гетеротримерных G-белков, — обладают жесткой структурой и имеют поликати-

онную поверхность, доступную для взаимодействия с отрицательно заряженными участками G-белков. Наряду с этим способность дендримеров к образованию стабильных макромолекулярных комплексов, в том числе комплексов включения, позволяет предположить, что они способны с высокой эффективностью внедряться в комплексы рецепторов с G-белками, нарушать их функциональное сопряжение и препятствовать передаче гормонального сигнала с рецептора на G-белок.

Подтверждением вышесказанного является выявленная нами способность полилизиновых дендримеров по не зависимо от рецептора механизму стимулировать ГТФ-связывание G-белков, причем их действие является более селективным в сравнении с ранее изученными поликатионными пептидами, неспособными образовывать сферические структуры. Наиболее эффективными среди изученных дендримеров были гомодендримеры II и III четвертой и пятой генераций и гетеродендример V, который содержал между точками «ветвления» остатки аланина. Показано, что полилизиновые дендримеры преимущественно активируют G_i -белки, которые ингибирующим образом сопряжены с АЦ. В пользу этого свидетельствует как снижение стимулирующего ГТФ-связывание эффекта полилизиновых дендримеров в присутствии С-концевого пептида 346—355 α_{i2} -субъединицы C_i -белка, так и ингибирование полилизиновыми дендримерами стимулирующей форсколином активности АЦ. Следует отметить, что наряду с активацией G_i -белков причиной ингибирования стимулирующего эффекта форсколина может быть взаимодействие полилизиновых дендримеров с каталитическим сайтом фермента, с которым связывается форсколин. Однако в нашем случае такая возможность представляется маловероятной, поскольку полилизиновые дендримеры заметно не влияли на базальную активность АЦ, что указывает на отсутствие их непосредственного взаимодействия с каталитическим сайтом АЦ. В пользу преимущественной активации G_i -белков свидетельствует и то, что они с высокой эффективностью прерывали передачу сигналов, генерируемых соматостатином в миокарде и бромкриптином в мозге, и осуществляемую через G_i -белки. Их действие было сходно с таковым мастопарана и мелиттина, пептидными токсинами из ядра насекомых, взятыми нами для сравнения. Селективность действия их в отношении G_i -белков была доказана ранее как нами, так и другими авторами (Higashijima et al., 1990; Fukushima et al., 1998; Breitweg-Lehmann et al., 2002; Bakker et al., 2004; Шпаков, Перцева, 2006).

За исключением гомодендримера I и гетеродендримера VI, полилизиновые дендримеры сравнительно слабо или вовсе не влияли на активность G_s -белков. На это указывает отсутствие заметного влияния С-концевого пептида 385—394 α_s -субъединицы G_s -белка, нарушающего активацию G_s -белков как гормональными, так и негормональными агентами, на стимулирующий ГТФ-связывание эффект полилизиновых дендримеров, а также то, что полилизиновые дендримеры намного слабее влияли на передачу гормональных сигналов, осуществляемых через G_s -белки, в сравнении с таковыми, реализуемыми через G_i -белки.

Выявленная нами селективность действия полилизиновых дендримеров в отношении G_i -белков отличает их от ранее изученных поликатионных пептидов, действие которых не являлось селективным: они примерно в одинаковой степени активировали как G_i -, так и G_s -белки. Вероятно, жесткость структуры дендримеров, высокая

плотность положительно заряженных аминогрупп на поверхности образуемой ими сферы и склонность к образованию межмолекулярных комплексов и ассоциатов являются главными причинами такой селективности. Сходная ситуация наблюдается и в случае непептидных регуляторов G-белков — полимера C48/80 и олигомеров N-алкилзамещенных производных лизина, которые также имеют компактную структуру, высокую плотность положительно заряженных групп и способны образовывать стабильные макромолекулярные комплексы (Mousli et al., 1990; Leschke et al., 1997; Nurnberg et al., 1999; Breitweg-Lehmann et al., 2002). Показано, что эти регуляторы в микромолярном диапазоне концентраций с высокой эффективностью активируют G_i-белки, слабо влияя на другие типы G-белков (G_s и G_{q/11}).

Изучение влияния полилизинных дендримеров на связывающие характеристики рецепторов биогенных аминов показало, что они подавляют высокоаффинное связывание агониста серотонина с 5HT_{2A}, причем наиболее активными в этом отношении были гомодендримеры и гетеродендример V. Причиной снижения сродства агониста к рецептору является вызываемое полилизинными дендримерами нарушение стабильности комплекса рецептора с G-белком, формирование которого необходимо для перевода рецептора в высокоаффинное для связывания агониста состояние. В то же время полилизинные дендримеры практически не влияют на связывание антагониста ДГА с β-AR, что свидетельствует в пользу отсутствия блокирования ими лигандсвязывающего сайта рецептора. В этом отношении полилизинные дендримеры сходны с изученными ранее поликатионными пептидами, содержащими гидрофобные C₁₀-радикалы, которые также снижали сродство рецепторов к агонисту, не влияя на их связывание с антагонистом (Шпаков и др., 2005а, 2006).

Таким образом, полилизинные дендримеры являются представителями нового класса негормональных регуляторов гетеротримерных G-белков, которые в отсутствие гормональной стимуляции активируют G-белки и по не зависящему от рецептора механизму запускают зависящие от G-белков сигнальные каскады. По молекулярным механизмам действия и его селективности полилизинные дендримеры сходны с пептидными токсинами мастопараном и мелиттином, которые, так же как и дендримеры, действуют в основном на G_i-белки.

Работа выполнена при финансовой поддержке программы президиума РАН «Фундаментальные науки — медицине» (2007—2008 гг.), Российского фонда фундаментальных исследований (проект 06-04-48809) и «Фонда содействия отечественной науке».

Список литературы

Баянова Н. В., Власов Г. П., Ануфриева Е. В., Некрасова Т. Н., Ананьева Т. Д., Краковяк М. Г. 2003. Водорастворимые дендримеры на основе α-аминокислот: синтез, функциональные свойства и наносекундная динамика. Структура и динамика молекулярных систем. 10 : 21—23.

Власов Г. П., Корольков В. И., Гурьянов И. А., Баянова Н. В., Баранов А. Н., Киселев А. В., Лесина Е. А., Баранов В. С. 2005. Оптимизация трансформирующих свойств комплексов ДНК с лизинными дендримерами. Биоорганич. хим. 31 : 167—174.

Власов Г. П., Павлов Г. М., Баянова Н. В., Корнеева Е. В., Эбель С., Ходорковский М. А., Артамонова Т. О. 2004. Дендри-

меры на основе α-аминокислот: синтез и гидродинамические характеристики. Докл. РАН. 399 : 366—368.

Шпаков А. О. 2003. Участие заряженных аминокислотных остатков цитоплазматических петель рецепторов серпантинного типа в процессе передачи гормонального сигнала. Журн. эволюц. биохим. физиол. 39 : 205—217.

Шпаков А. О., Гурьянов И. А., Авдеева Е. В., Воробьев В. И., Власов Г. П. 2004а. Молекулярные механизмы действия звездобразных поликатионных пептидов, содержащих последовательность 48—60 ТАТ-белка ВИЧ-1, на функциональную активность аденилатциклазной сигнальной системы. Цитология. 46 : 1011—1022.

Шпаков А. О., Гурьянов И. А., Власов Г. П. 2005а. Молекулярные механизмы взаимодействия поликатионных пептидов с G-белками. Докл. РАН. 405 : 270—273.

Шпаков А. О., Гурьянов И. А., Власов Г. П., Перцева М. Н. 2006. Молекулярные механизмы взаимодействия поликатионных пептидов с рецепторами серпантинного типа и гетеротримерными G-белками в тканях крыс. Журн. эволюц. биохим. физиол. 42 : 321—327.

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 : 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 : 441—450.

Шпаков А. О., Перцева М. Н. 2005. Использование пептидной стратегии для изучения молекулярных механизмов передачи гормонального сигнала в клетку. Журн. эволюц. биохим. физиол. 41 : 389—403.

Шпаков А. О., Перцева М. Н. 2006. Молекулярные механизмы действия мастопарана на G-белки в тканях позвоночных и беспозвоночных животных. Бюл. эксперим. биол. мед. 141 : 273—277.

Шпаков А. О., Перцева М. Н. 2008. Системы сигнальной трансдукции прокариот. Журн. эволюц. биохим. физиол. 44 : 113—130.

Шпаков А. О., Перцева М. Н., Гурьянов И. А., Власов Г. П. 2005б. Влияние пептидов, производных третьей цитоплазматической петли релаксинового рецептора 1-го типа, на стимуляцию релаксином GTP-связывающей активности G-белков. Биол. мембраны. 22 : 435—442.

Bakker R. A., Casarosa P., Timmerman H., Smit M. J., Leurs R. 2004. Constitutively active G_{q/11}-coupled receptor enables signaling by co-expressed G_{i/o}-coupled receptors. J. Biol. Chem. 279 : 5152—5161.

Bavec A. 2004. Novel features of amphiphilic peptide Mas7 in signaling via heterotrimeric G-protein. J. Pept. Sci. 10 : 691—699.

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.

Clawges H. M., Depree K. M., Parker E. M., Graber S. G. 1997. Human 5-HT₁ receptor subtypes exhibit distinct G protein coupling behaviors in membranes from Sf9 cells. Biochemistry. 36 : 12 930—12 938.

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.

Johnsborg O., Kristiansen P. E., Blomqvist T., Havarstein L. S. 2006. A hydrophobic patch in the competence-stimula-

ting peptide, a pneumococcal competence pheromone, is essential for specificity and biological activity. *J. Bacteriol.* 188 : 1744—1749.

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.

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.

McIntire W. E., Mac Cleery G., Garrison J. C. 2001. The G protein β subunit is a determinant in the coupling of G_s to the β_1 -adrenergic and A2a adenosine receptors. *J. Biol. Chem.* 276 : 15 801—15 809.

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.

Nurnberg B., Tögel 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.

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.

Reading N. C., Sperandio V. 2005. Quorum sensing: the many languages of bacteria *FEMS Microbiol. Lett.* 254 : 1—11.

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

Shpakov A. O., Gur'yanov I. A., Kuznetsova L. A., Plesneva S. A., Shpakova E. A., Vlasov G. P., Pertseva M. N. 2007. Studies of the molecular mechanisms of action of relaxin on the adenylyl cyclase signaling system using synthetic peptides derived from the LGR7 relaxin receptor. *Neurosci. Behav. Physiol.* 37 : 705—714.

Shpakov A. O., Kuznetsova L. A., Plesneva S. A., Kolychev A. P., Bondareva V. M., Chistyakova O. V., Pertseva M. N. 2006. Functional defects in adenylyl cyclase signaling mechanisms of insulin and relaxin action in rat skeletal muscles in conditions of streptozotocin type 1 diabetes. *Central Eur. J. Biol.* 1 : 530—544.

Shpakov A. O., Pertseva M. N. 2007. The peptide strategy as a novel approach to the study of G protein-coupled signaling systems. In: *Signal transduction research trends* (Ed. N. O. Grachevsky). Nova Science Publishers, Inc. 45—93.

Shpakov A. O., Pertseva M. N. 2008. Signaling systems of lower eukaryotes and their evolution. *Int. Rev. Cytol.* 269 : 151—282.

Sukumar M., Ross E. M., Higashijima T. 1997. A G_s -selective analog of the receptor-mimetic peptide mastoparan binds to $G_{\alpha u}$ in a kinked helical conformation. *Biochemistry.* 36 : 3632—3639.

Поступила 26 III 2008

THE RECEPTOR OF SERPENTINE TYPE AND THE HETEROTRIMERIC G PROTEIN AS TARGETS OF ACTION OF THE POLYLYSINE DENDRIMERS

A. O. Shpakov,¹ I. A. Guryanov,² N. V. Bayanova,² G. P. Vlasov²

¹ I. M. Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry RAS and ² Institute of Macromolecular Compounds RAS, St. Petersburg; e-mail: alex_shpakov@list.ru

The molecular mechanisms of action of the polycationic peptides — polylysine homo- and heterodendrimers on functional activity of biogenic amines- and peptide hormones-sensitive adenylyl cyclase signaling system (AC system) in the myocardium and the brain of rats were studied. These peptides are expected to be used as highly effective polymer carries for biologically active substances. The polylysine homodendrimers of the third [(NH₂)₁₆(Lys)₈(Lys)₄(Lys)₂Lys-Ala-NH₂] (I), fourth [(NH₂)₃₂(Lys)₁₆(Lys)₈(Lys)₄(Lys)₂Lys-Ala-NH₂] (II) and fifth [(NH₂)₆₄(Lys)₃₂(Lys)₁₆(Lys)₈(Lys)₄(Lys)₂Lys-Ala-NH₂] (III) generations and the polylysine homodendrimers of fifth generation — [(NH₂)₆₄(Lys-Glu)₃₂(Lys-Glu)₁₆(Lys-Glu)₈(Lys-Glu)₄(Lys-Glu)₂Lys-Ala-Ala-Lys(CIAC)-Ala-NH₂] (IV), [(NH₂)₆₄(Lys-Ala)₃₂(Lys-Ala)₁₆(Lys-Ala)₈(Lys-Ala)₄(Lys-Ala)₂Lys-Ala-Lys(CIAC)-Ala-Ala-NH₂] (V) and [(NH₂)₆₄(Lys-Gly-Gly)₃₂(Lys-Gly-Gly)₁₆(Lys-Gly-Gly)₈(Lys-Gly-Gly)₄(Lys-Gly-Gly)₂Lys-Gly-Gly-Lys(CIAC)-Ala-Ala-NH₂] (VI) showed receptor-independent mechanism of heterotrimeric G-proteins activity, preferably of inhibitory type, interacting with C-terminal regions of their α -subunits. The homodendrimers II and III and heterodendrimer V are more effective G-protein activators. The polylysine dendrimers disturbed the functional coupling of the receptors of biogenic amines and peptides hormones with G_i -proteins and, in a lesser extent, G_s -proteins. This is illustrated by the decrease in regulatory effects of the hormones on AX activity and G-protein GTP binding and by the decrease in receptor affinity to agonists in the presence of the polylysine dendrimers, as result of receptor—G-proteins complex dissociation. It was shown also that the molecular mechanisms and the selectivity of the action on the G-proteins of the polylysine dendrimers were similar to those of mastoparan and melittin, natural toxins of insect venom.

Key words: adenylyl cyclase, adrenergic receptor, heterotrimeric G protein, GTP binding, mastoparan, polylysine dendrimer, serotonin receptor.