

ВТОРИЧНАЯ СТРУКТУРА ПЕПТИДОВ, ПРОИЗВОДНЫХ ТРЕТЬЕЙ ПЕТЛИ РЕЦЕПТОРОВ СЕРПАНТИННОГО ТИПА, И ЕЕ СВЯЗЬ С ИХ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТЬЮ

© *Е. А. Шпакова,¹ Е. А. Скворцова,² И. И. Тарасенко,¹ А. О. Шпаков^{3,*}*

¹ Учреждение Российской академии наук Институт высокомолекулярных соединений РАН,

² Учреждение Российской академии наук Институт цитологии РАН и

³ Учреждение Российской академии наук Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург;

* электронный адрес: alex_shpakov@list.ru

Нами и другими авторами показано, что синтетические пептиды, соответствующие участкам третьей цитоплазматической петли (ЦП-3) рецепторов серпантинного типа, способны активировать G-белки и запускать сигнальные каскады в отсутствие гормона. Для создания на основе таких пептидов селективных регуляторов гормональных сигнальных систем исследуют взаимосвязь между их биологической активностью и вторичной структурой. Предполагается, что наиболее оптимальной является спиральная конформация, позволяющая пептиду наиболее эффективно взаимодействовать с сигнальными белками. Цель работы состояла в изучении биологической активности вторичной структуры синтезированных нами линейных пептидов и их димерных и пальмитоилированных аналогов, соответствующих С-концевым участкам ЦП-3 рецептора лютеинизирующего гормона (ЛГР-пептиды) и серотонинового рецептора 6-го типа (Сер₆Р-пептиды). Показано, что ЛГР-пептиды в микромолярных концентрациях стимулируют базальную активность аденилатциклазы (АЦ) и ГТФ-связывание G-белков в плазматических мембранах семенников крыс, в то время как Сер₆Р-пептиды активируют АЦ и G-белки в синапсомембранных мозга крыс. Действие пептидов является тканеспецифичным и наблюдается в тканях, где присутствуют гомологичные им рецепторы. Наиболее эффективными были пальмитоилированные пептиды. ЛГР-пептиды снижали стимулирующий АЦ эффект хорионического гонадотропина, в то время как Сер₆Р-пептиды — соответствующий эффект агониста серотонинового рецептора 6-го типа EMD-386088, причем действие пептидов не выявлялось в отношении негомологичных им рецепторов. С помощью спектроскопии кругового дихроизма показано, что в нейтральной (pH 7) и кислой (pH 2) средах все пептиды находятся преимущественно в антипараллельной β-складчатой (37—42 %) и в неупорядоченной (33—35 %) конформациях. В щелочной среде (pH 10) в случае пальмитоилированных пептидов наблюдается повышение доли спиральной конформации до 12—27 %. В присутствии трифторэтанола (10—80 %), спиралеобразующего растворителя, доля спиральной конформации для большинства исследованных пептидов незначительно повышается (для пальмитоилированных аналогов до 14 %), однако преобладающими и в этом случае являются антипараллельная β-складчатая и неупорядоченная конформации. Сделан вывод о том, что отсутствие у исследуемых пептидов выраженной способности к формированию спиралей существенно не влияет на их активность. Это хорошо согласуется с наиболее вероятным механизмом действия таких пептидов, в соответствии с которым пептид взаимодействует с комплементарными ему участками гомологичного рецептора, что не требует образования им спирали.

Ключевые слова: аденилатциклаза, G-белок, вторичная структура, круговой дихроизм, пептид, рецептор лютеинизирующего гормона, серотонин, серотониновый рецептор 6-го типа, третья цитоплазматическая петля.

Принятые сокращения: АКО — аминокислотный остаток, АЦ — аденилатциклаза, АЦСС — аденилатциклазная сигнальная система, КД — круговой дихроизм, ЛГР — рецептор лютеинизирующего гормона, ЛГР-пептиды — синтетические пептиды, соответствующие С-концевым участкам ЦП-3 рецептора ЛГР, Сер₆Р — серотониновый рецептор 6-го типа, Сер₆Р-пептиды — синтетические пептиды, соответствующие С-концевым участкам ЦП-3 рецептора Сер₆Р, ТФЭ — трифторэтанол, ЦП-2 и ЦП-3 — вторая и третья цитоплазматические петли, С-ЦП-3 — С-концевой участок третьей цитоплазматической петли.

Большинство гормонов и гормоноподобных веществ реализует свои регуляторные эффекты на клетку, специфически связываясь с рецепторами серпантинного типа, которые 7 раз пронизывают плазматическую мембрану и

сопряжены с αβγ-гетеротримерными G-белками. Через посредство рецепторов серпантинного типа и G-белков регулируется активность ферментов — аденилатциклазы (АЦ), фосфолипазы, фосфатидилинозитол-3-киназы и гуани-

латциклаз, генерирующих вторичные посредники, и зависящих от G-белков ионных каналов. С помощью сопряженных с G-белками рецепторов осуществляется контроль таких фундаментальных клеточных процессов, как рост, метаболизм, дифференцировка, апоптоз, движение и хемотаксис. Одним из ключевых этапов передачи гормонального сигнала в клетку является взаимодействие активированного гормоном рецептора с G-белком, за которое ответственны проксимальные к мембране участки рецептора, локализованные в его второй и третьей цитоплазматических петлях (ЦП-2 и ЦП-3), а также во внутриклеточном С-концевом домене. Эти участки в большинстве рецепторов обогащены положительно заряженными аминокислотными остатками (АКО), которые образуют мотивы ВВХХВ (где В — аргинин или лизин) и родственные им мотивы (Шпаков, 2002, 2003). В молекуле G-белка за взаимодействие с рецептором отвечают участки, локализованные в его α -субъединице. Один из них, соответствующий С-концевому сегменту α -субъединицы, определяет эффективность и специфичность взаимодействия G-белка с рецептором и контактирует с $\alpha 5$ -спиралью, формирующей ГТФ-связывающий сайт α -субъединицы (Nanoff et al., 2006). Другой участок включает в себя петлю, обеспечивающую контакт между $\beta 6$ -складчатой структурой и $\alpha 5$ -спиралью, и также определяет ГТФ-связывающую функцию G-белка (Johnston, Siderovski, 2007). Оба участка в большинстве α -субъединиц заряжены отрицательно, вследствие чего они способны вступать в электростатические взаимодействия с положительно заряженными участками цитоплазматических петель рецептора, формирующими его связывающий с G-белком сайт.

В настоящее время получены данные о том, что синтетические пептиды, соответствующие проксимальным участкам ЦП-2, ЦП-3 и С-концевого домена рецепторов серпантинного типа, в отсутствие гормона стимулируют активность G-белков, запускают сопряженные с ними внутриклеточные каскады и влияют на передачу гормонального сигнала через рецепторы, производными которых они являются (Covic et al., 2002a; Shpakov, Pertseva, 2007; Smyth et al., 2009; Trivedi et al., 2009; Shpakov, 2010; Shpakov et al., 2010a). Многие из пептидов, производных N- и С-концевых участков ЦП-3, образуют спиральные структуры в присутствии трифторэтанола (ТФЭ), стабилизирующего спиральную конформацию пептидов, а также соединений, имитирующих поверхность мембраны, таких как додецилфосфохолин (Okuda et al., 2002; Kikkou et al., 2008; Wu et al., 2008; Bellot et al., 2009). Это согласуется с результатами теоретических и кристаллографических исследований вторичной структуры рецепторов серпантинного типа, которые свидетельствуют о том, что вовлеченные во взаимодействие с G-белками N- и С-концевые участки ЦП-3 во многих рецепторах способны образовывать спирали, являющиеся цитоплазматическим продолжением высокоспирализованных трансмембранных доменов (Naidar et al., 2005). Показано также, что биологическая активность поликатионных пептидных токсинов, не имеющих гомологии с рецепторными белками, но способных взаимодействовать с G-белками и влиять на активность гормональных сигнальных систем, в значительной степени определяется их спиральностью (Kusunoki et al., 1998; Todokoro, 2006). Все вышесказанное позволяет сделать предположение о том, что биологическая активность пептидов, соответствующих участкам цитоплазматических петель рецепторов, может зависеть от их способности формировать амфипатические спирали. В то же время

имеются данные о том, что способность к формированию спиралей не является необходимым условием для биологической активности пептидов, производных рецепторов, и значительная часть из них находится преимущественно в β -складчатой или неупорядоченной конформации (Franzoni et al., 1997; Ulfers et al., 2002; Shpakov, 2011). Проведенные нами исследования вторичной структуры поликатионных пептидов с регулярной структурой также не выявили положительной корреляции между степенью спиральности и эффективностью активирующего действия пептидов на G-белки (Шпаков и др., 2004; Шпаков, 2009). Таким образом, в настоящее время нет единой точки зрения в отношении того, насколько способность к формированию спиральных структур влияет на активность пептидов, производных цитоплазматических петель рецепторов, а также в отношении взаимосвязи между активностью пептидов и их вторичной структурой. Установление такой взаимосвязи — одна из важнейших задач молекулярной эндокринологии, поскольку многие из таких пептидов рассматриваются как прототипы для создания лекарственных препаратов, регуляторов эндокринной и других систем организма (Miller et al., 2009; Shpakov, 2010, 2011; Tressel et al., 2011).

Задача работы состояла в изучении взаимосвязи между специфической биологической активностью и вторичной структурой синтезированных нами пептидов, производных С-концевого участка ЦП-3 (С-ЦП-3) рецептора лютеинизирующего гормона (ЛГР-пептиды) и серотонинового рецептора 6-го типа (Сер₆P-пептиды). Биологическую активность пептидов изучали по их влиянию на базальную и стимулированную гормонами активность G_s-белков и АЦ, компонентов аденилатциклазной сигнальной системы (АЦСС), которые функционально сопряжены с рецептором лютеинизирующего гормона (ЛГР) в семенниках и с серотониновым рецептором 6-го типа (Сер₆P) в тканях мозга крыс. Вторичную структуру пептидов изучали с помощью спектроскопии кругового дихроизма (КД) в водных растворах с различными значениями pH для выяснения зависимости их конформации от кислотности среды и в присутствии возрастающих концентраций ТФЭ для выявления у пептидов способности к образованию α -спиралей.

Материал и методика

В работе использовали серотонин, хорионический гонадотропин человека (ХГЧ) (Sigma, США), Сер₆P-агонист 5-хлор-2-метил-3-(1,2,3,6-тетрагидро-4-пиридинил)-1*H*-индол (EMD-386088) (Tocris Cookson Ltd., Великобритания). Колоночную хроматографию проводили на нейтральной окиси алюминия (Sigma, США), для определения ГТФ-связывания использовали нитроцеллюлозные фильтры типа HA, 0.45 мкм (Millipore, США). Для определения активности АЦ использовали [α -³²P]АТФ (1000 Ки/ммоль) (ОАО Институт реакторных материалов, Россия), для определения ГТФ-связывания — β , γ -имидадо[8-³H]-гуанозин-5'-трифосфат ([8-³H]GppNHp) (5 Ки/мм) (Amersham, Англия).

Пептиды, соответствующие С-ЦП-3 ЛГР и Сер₆P, были синтезированы стандартным твердофазным методом с помощью полуавтоматического синтезатора NPS-4000 (Neosystem Laboratoires, Франция), их аминокислотные последовательности приведены в табл. 1. Для защиты функциональных групп аминокислот использова-

Таблица 1

**Первичная структура пептидов, производных С-концевого участка
третьей цитоплазматической петли (С-ЦП-3) рецептора лютеинизирующего гормона (ЛГР)
и серотонинового рецептора 6-го типа (Сер₆P)**

Пептид	Аминокислотная последовательность	M _{теор.} , Да	M _{экспер.} , Да
Пептиды, производные С-ЦП-3 ЛГР			
I	Asn-Lys-Asp-Thr-Lys-Ile-Ala-Lys-Lys-Nle-Ala ^{562–572} -амид	1227.67	1227.64
II	Asn-Lys-Asp-Thr-Lys-Ile-Ala-Lys-Lys-Nle-Ala ^{562–572} -Lys(Palm)-Ala-амид	1665.13	1665.14
III	Leu-Nle-Ala-Thr-Asn-Lys-Asp-Thr-Lys-Ile-Ala-Lys-Lys-Nle-Ala ^{558–572} -амид	1626.08	1626.07
IV	(Asn-Lys-Asp-Thr-Lys-Ile-Ala-Lys-Lys-Nle-Ala ^{562–572}) ₂ -Lys-Gly-Gly-Cys(Асм)-амид	2856.14	2856.12
Пептиды, производные С-ЦП-3 Сер ₆ P			
V	Lys-His-Ser-Arg-Lys-Ala-Leu-Lys-Ala-Ser-Leu ^{258–268} -Lys-Ala-амид	1435.91	1435.92
VI	Lys-His-Ser-Arg-Lys-Ala-Leu-Lys-Ala-Ser-Leu ^{258–268} -Lys(Palm)-Ala-амид	1674.16	1674.16
VII	Lys-His-Ser-Arg-Lys-Ala-Leu-Lys-Ala-Ser-Leu ^{258–268} -Lys-Gly-Gly-Cys(Асм)-амид	1853.10	1853.09
VIII	(Lys-His-Ser-Arg-Lys-Ala-Leu-Lys-Ala-Ser-Leu ^{258–268} -Lys-Gly) ₂ -Lys-Ala-амид	3026.49	3026.48

Примечание. Асм — ацетамидометильная группа, Palm — остаток пальмитиновой кислоты.

ли *трет*-бутилоксикарбонильную, бензильную, мезитилсульфонильную и 2-хлорбензилоксикарбонильную группы. Присоединение АКО осуществляли карбодимидным методом с помощью диизопропилкарбодимида в присутствии 1-гидроксибензотриазола. Полное деблокирование и удаление пептидов с полимера осуществляли с помощью трифторметансульфоуксусной кислоты (1 мл) в трифторуксусной кислоте (10 мл) в присутствии 1 мл тиоанизола и 0.5 мл этандитиола (все количества на 1 г пептидил-полимера) в течение 1 ч при охлаждении льдом и еще 1.5 ч без охлаждения при интенсивном перемешивании. ε-Пальмитоилированный лизин, который использовали для синтеза пептидов II и VI, получали конденсацией пентафторфенилового эфира пальмитиновой кислоты и *Na-трет*-бутилоксикарбониллизина с помощью диизопропилкарбодимида в присутствии триэтиламина. Для получения димерных пептидов IV и VIII в точку ветвления цепи вводили *Ne,Na*-ди-*трет*-бутилоксикарбониллизин и в дальнейшем добавляли удвоенные количества производных аминокислот. Предварительную очистку пептидов проводили с помощью гель-хроматографии на BioGel P-2 в 6%-ной уксусной кислоте. Дальнейшую очистку осуществляли с помощью ВЭЖХ на колонке Vydac C18 в системе вода—ацетонитрил—0.1%-ная трифторуксусная кислота при использовании линейного возрастающего градиента ацетонитрила. Выделенные фракции имели 95 % чистоты, считая от базовой линии (УФ-детектирование проводили при 230 нм). Структура пептидов была подтверждена данными аминокислотного анализа, который проводили с помощью аминокислотного анализатора АААТ339М (Mikrotechna-Praha, Чехия), а также с помощью масс-спектрометрического анализа (табл. 1).

Исследования проводили на материале от 29 крыс-самцов линии Wistar с массой тела 295 ± 35 г. Выделение фракций синаптосомальных мембран из мозга крыс проводили по методу (Odagaki et al., 1997) с некоторыми модификациями (Shpakov et al., 2010a). Кору больших полушарий, стриатум и гиппокамп гомогенизировали при помощи Политрона в охлажденном до 4 °С 50 мМ Tris-HCl буферном растворе (pH 7.4), содержащем 10 мМ MgCl₂, 2 мМ EGTA, 10 % (w/v) сахарозы и ингибиторы протеаз (500 мкМ *O*-фенантролин, 2 мкМ пепстатин,

1 мМ фенилметилсульфонилфторид) (буфер А). Полученный гомогенат центрифугировали при 1000 g в течение 10 мин, осадок отбрасывали, а супернатант центрифугировали при 9000 g в течение 20 мин. Осадок ресуспендировали в буфере А без сахарозы и центрифугировали при 35 000 g в течение 10 мин. Выделение плазматических мембран из семенников крыс проводили, как описано ранее (Shpakov et al., 2011). Измельченные ткани гомогенизировали на холоде в 40 мМ Tris-HCl, pH 7.5, содержащем 5 мМ MgCl₂, 10 % (w/v) сахарозы и коктейль ингибиторов протеаз (буфер Б). Гомогенат центрифугировали при 1500 g в течение 10 мин, после чего супернатант центрифугировали при 20 000 g в течение 30 мин. Полученный осадок ресуспендировали в буфере Б (без сахарозы) и центрифугировали в том же режиме. Полученные плазматические мембраны ресуспендировали в 50 мМ Tris-HCl буферном растворе (pH 7.4) для получения мембранных фракций с концентрацией белка 1—3 мг/мл и использовали для исследования активности АЦ и ГТФ-связывания G-белков.

Активность АЦ определяли, как описано ранее (Shpakov et al., 2006). Инкубацию фракций мембран в реакционной смеси проводили при 37 °С в течение 10 мин. Активность АЦ оценивали по количеству цАМФ, который получался в результате ферментативной реакции, и выражали в пмоль цАМФ за 1 мин на 1 мг мембранного белка. Определение ГТФ-связывания G-белков проводили, как описано ранее (Шпаков и др., 2005). Специфическое ГТФ-связывание определяли как разность между связыванием меченого [8-³H]GppNHp в пробе в отсутствие и в присутствии 10 мМ ГТФ и выражали в пмоль [8-³H]GppNHp на 1 мг мембранного белка. Преинкубацию фракций мембран с пептидами при определении их влияния на активность АЦ и ГТФ-связывание проводили на холоде (4 °С) в течение 10 мин.

Определение вторичной структуры пептидов, взятых в конечной концентрации 30 мкМ, проводили с помощью спектроскопии КД в воде, водных растворах 0.01 М HCl и 0.01 М NaOH, а также в системе вода—трифторэтанол (ТФЭ) с восемью возрастающими концентрациями ТФЭ (от 10 до 80 %). Спектры КД снимали при комнатной температуре с помощью регистрирующего спектрофотомет-

ра-дихрографа Marc V (Чехия) (ширина кюветы 1 см) в диапазоне длин волн от 200 до 320 нм с шагом, равным 1 нм (среднее время снятия спектра 1 с). Расчет содержания доли вторичных структур в пептидах проводили с помощью программы CDNN V2.1 (Gerald Bohm, Институт биотехнологии, Виттенберг, Германия).

Статистический анализ полученных данных проводили с использованием метода ANOVA (Manugistics Inc., США). Каждый эксперимент был выполнен трехкратно. Данные представлены в виде $M \pm m$ нескольких независимых экспериментов. Различия между контрольными пробами и пробами, подвергнутыми воздействию пептидов и гормонов, оценивали как достоверные при $P < 0.05$.

Результаты

Влияние пептидов на базальную и стимулированную гормонами активность АЦСС. ЛГР-пептиды (10^{-5} М) стимулировали базальную активность АЦ и повышали уровень ГТФ-связывания G-белков во фракции плазматических мембран семенников крыс, в то время как Сер₆P-пептиды (10^{-5} М) оказывали стимулирующее влияние на компоненты АЦСС во фракции синапсомембранных тканей мозга крыс (табл. 2). Стимулирующие АЦ и ГТФ-связывание эффекты ЛГР-пептидов в мозге и соответствующие эффекты Сер₆P-пептидов в семенниках были выражены слабо (данные не представлены). Это свидетельствует о тканеспецифичности действия пептидов и согласуется с полученными ранее результатами о том, что пептиды, производные С-ЦП-3, эффективны в основном в тех тканях, где в значительных количествах присутствуют гомологичные им рецепторы (Shraikov et al., 2010a, 2010b). Ряды эффективности стимулирующего эффекта ЛГР-пептидов на активность АЦ и ГТФ-связывание были следующими — II > IV > III > I и II > III \cong V > I соответственно. В случае Сер₆P-пептидов ряды эффективности стимуляции ими ак-

Таблица 2

Влияние ЛГР- и Сер₆P пептидов на базальную активность аденилатциклазы (АЦ) и ГТФ-связывание G-белков

Пептид, 10^{-5} М	Активность АЦ, пмоль цАМФ за 1 мин на 1 мг белка	ГТФ-связывание, пмоль [8- ³ H]GppNHp на 1 мг белка
Семенники		
Без пептида	11.5 ± 0.6	2.4 ± 0.2
I	16.0 ± 2.0 (+39)*	2.9 ± 0.3 (+21)
II	24.0 ± 1.5 (+109)**	4.0 ± 0.3 (+67)**
III	18.7 ± 1.8 (+63)**	3.6 ± 0.6 (+50)*
IV	21.0 ± 1.0 (+83)**	3.5 ± 0.4 (+46)**
Мозг		
Без пептида	20.7 ± 1.6	4.6 ± 0.1
V	36.2 ± 2.4 (+75)**	6.5 ± 0.8 (+41)**
VI	44.9 ± 3.2 (+117)**	7.9 ± 0.6 (+72)**
VII	29.6 ± 2.5 (+43)**	6.4 ± 0.8 (+39)**
VIII	35.4 ± 2.0 (+71)**	6.9 ± 0.5 (+50)**

Примечание. В скобках приведен стимулирующий АЦ эффект пептида (в %). * и ** — значения АЦ активности, достоверно повышенные в присутствии пептидов при $P < 0.05$ и $P < 0.01$ соответственно.

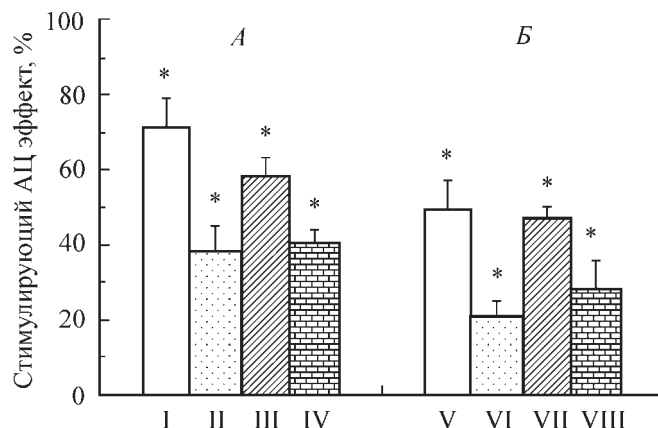


Рис. 1. Влияние ЛГР- и Сер₆P-пептидов на стимуляцию АЦ хоорионическим гонадотропином человека (ХГЧ) в семенниках и селективным Сер₆P-агонистом EMD-386088 в мозге крыс.

Стимулирующий АЦ эффект ХГЧ (10^{-8} М) (А) или EMD-386088 (10^{-6} М) (Б) принят в отсутствие пептидов за 100 %. А — семенники, Б — мозг. Римскими цифрами здесь и далее обозначены пептиды (см. табл. 1). Звездочкой отмечены достоверные отличия от контроля при $P < 0.05$.

тивности АЦ и ГТФ-связывания были следующими — VI > V \cong VIII > VII и VI > VIII > V \cong VII соответственно.

В присутствии ЛГР-пептидов в семенниках крыс снижался стимулирующий АЦ эффект ХГЧ (10^{-8} М), структурного и функционального гомолога лютеинизирующего гормона, который в отсутствие пептидов составлял 580 % (рис. 1). Наиболее активными ингибиторами АЦ эффекта ХГЧ были пептиды II и IV, наименее активным — пептид I. В мозге Сер₆P-пептиды вызвали снижение стимулирующего АЦ эффекта EMD-386088 (10^{-6} М), селективного агониста Сер₆P, который в отсутствие пептидов повышал базальный уровень АЦ на 139 %. Порядок эффективности ингибирующего действия Сер₆P-пептидов был следующим — VI > VIII > VII \cong V (рис. 1). ЛГР-пептиды практически не влияли на АЦ эффект EMD-386088 в мозге, в то время как Сер₆P-пептиды лишь в незначительной степени снижали АЦ эффект ХГЧ в семенниках (данные не представлены). Это указывает на высокую рецепторную специфичность действия пептидов, которые эффективно ингибируют передачу сигнала только через гомологичный им рецептор.

Вторичная структура ЛГР- и Сер₆P-пептидов в водных растворах при различных значениях кислотности среды. С помощью спектроскопии КД показано, что в нейтральном (рН 7) и в подкисленном (рН 2) водных растворах все исследуемые пептиды находятся преимущественно в антипараллельной β -складчатой конформации, доля которой составляет от 37 до 42 %, а также в конформации неупорядоченного клубка, доля которой составляет от 33 до 35 %, в то время как способность пептидов образовывать α -спирали практически не выявляется (рис. 2, 3). Доля параллельной β -складчатой конформации составляет не более 5 %, доля β -поворотов — 17—21 %. В водном растворе, который имеет щелочную реакцию (рН 10), в случае пептидов II и VI, модифицированных остатком пальмитиновой кислоты, наблюдается существенное повышение доли спиральной конформации до 27 и 12 % соответственно, что иллюстрируется спектрами КД для ЛГР-пептидов, на которых отчетливо видны различия спектра КД для пептида II (рис. 4). Причиной этого, как мы полагаем, является де-

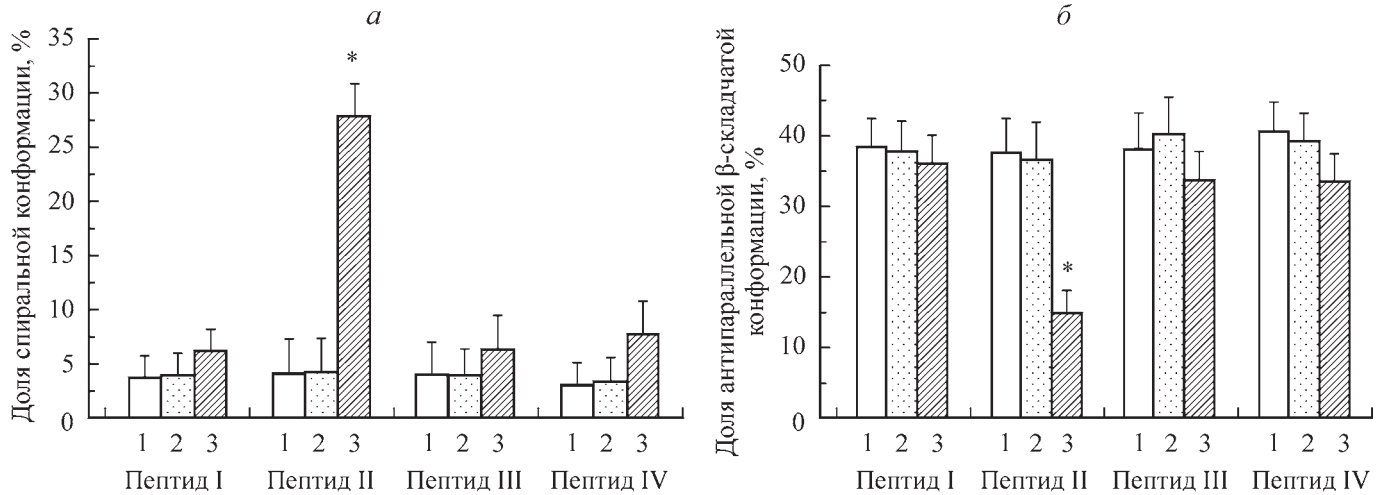


Рис. 2. Доля спиральной (а) и антипараллельной β-складчатой (б) конформаций пептидов, производных С-ЦП-3 ЛГР, по данным спектроскопии КД в водной среде с различными значениями рН.

1 — нейтральная среда, 2 — рН 2, 3 — рН 10. Конечная концентрация пептида здесь и далее 30 мкМ.

протонирование положительно заряженных боковых групп остатков лизина и аргинина, что способствует образованию пептидами мицелл с существенным вкладом α-спиральных структур. Повышение спиральности происходит в основном за счет снижения доли антипараллельных β-складчатых структур без заметного изменения вклада других типов вторичной структуры, в том числе неупорядоченной структуры (табл. 3). В случае других пептидов, не имеющих гидрофобных радикалов, способность к образованию α-спиралей в щелочной среде существенно не меняется (рис. 2, 3).

Вторичная структура пептидов при различных концентрациях трифторэтанола. Для изучения способности ЛГР- и Ser₆P-пептидов формировать α-спирали исследовали их вторичную структуру в присутствии ТФЭ, который является растворителем, способствующим образованию α-спиралей (Krause et al., 1996). В присутствии высоких концентраций ТФЭ даже пептиды со сравнительно низкой склонностью к образованию α-спиралей способны к формированию спиральных структур. Показано, что при увеличении концентрации ТФЭ от 10 до 80 % наблюдается тенденция к повы-

шению вклада спиральной конформации во вторичную структуру пептидов (рис. 5, а; 6, а). Исключение составляют пептиды III и V, вторичная структура которых во всем диапазоне исследованных концентраций ТФЭ практически не менялась. Наиболее выраженное повышение спиральности наблюдалось в случае пальмитоилированных пептидов II и VI, которые в 40%-ном ТФЭ имели около 11 % доли спиральной конформации, в 80%-ном — 13—14 %. Изменение спектров КД при повышении концентрации ТФЭ иллюстрируется спектрами КД для пептида VI (рис. 7). Наряду с повышением спиральности снижалась доля антипараллельных β-складчатых структур (рис. 5, б; 6, б; табл. 3). Это снижение компенсировалось не только повышением доли α-спиралей, но и незначительным по величине повышением доли β-поворотов (табл. 3).

Обсуждение

В последние годы получены убедительные доказательства того, что пептиды, производные ЦП-3 рецепторов серпантинного типа, способны в отсутствие гормо-

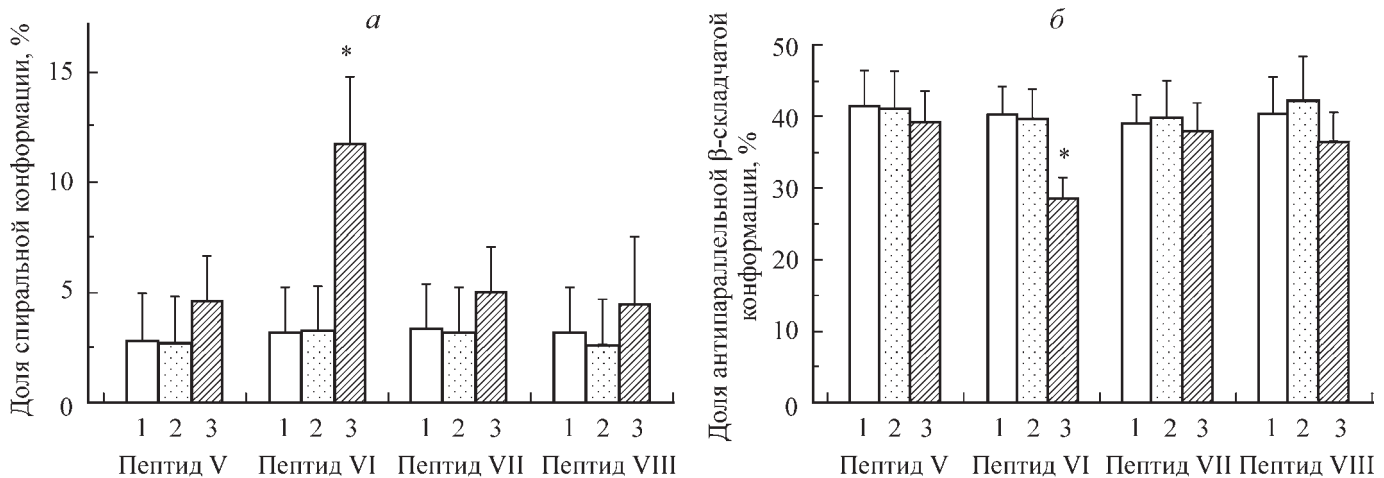


Рис. 3. Доля спиральной (а) и антипараллельной β-складчатой (б) конформаций пептидов, производных С-ЦП-3 Ser₆P, по данным спектроскопии КД в водной среде с различными значениями рН.

1 — нейтральная среда, 2 — рН 2, 3 — рН 10.

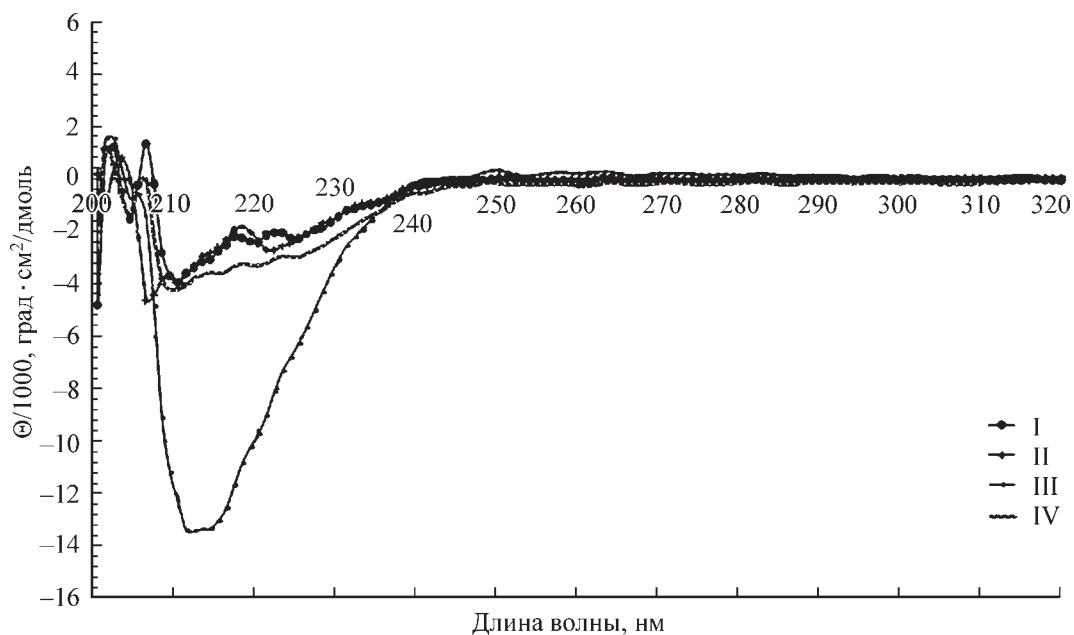


Рис. 4. Спектры кругового дихроизма для ЛГР-пептидов в щелочной среде (0.01 М NaOH, pH 10). Конечные концентрации пептидов составили 30 мкМ.

нальной стимуляции активировать G-белки и запускать сигнальные каскады, включающие в себя гомологичный им рецептор (Covic et al., 2002a; Shpakov, Pertseva, 2007; Miller et al., 2009; Smyth et al., 2009; Trivedi et al., 2009; Shpakov et al., 2010a, 2011; Shpakov, 2011). Регуляторные эффекты пептидов выявляются в условиях как *in vitro*, так и *in vivo*. Синтезированные и изученные нами пептиды, соответствующие С-ЦП-3 ЛГР и Ser₆P, расширяют список биологически активных пептидов, производных рецепторов серпантинного типа, которые могут рассматриваться как новое поколение внутриклеточных регуляторов гормональных сигнальных систем. Их действие является специфичным в отношении гомологичного им рецептора и не затрагивает сигнальные каскады, которые реализуются через другие типы рецепторов. В пользу рецепторной специфичности пептидов свидетельствуют и данные других авторов. Пептид, производный С-ЦП-3 активируемого протеазами рецептора 1-го типа, снижает стимулирующие эффекты селективного агониста этого рецептора на активность фосфолипазы С, но не затрагива-

ет эффекты, реализуемые через другие типы рецепторов, активируемых протеазами, в то время как пептид, соответствующий С-ЦП-3 активируемого протеазами рецептора 4-го типа, блокирует передачу гормонального сигнала через этот тип рецептора, но не влияет на активность других рецепторов этого семейства (Covic et al., 2002b). Пептид, соответствующий ЦП-2 рецептора сфингозин-1-фосфата 3-го типа, с высокой специфичностью действует на гомологичный рецептор, но не влияет на активность эволюционно родственного рецептора сфингозин-1-фосфата 1-го типа (Licht et al., 2003). Наряду с рецепторной специфичностью действие синтезированных нами пептидов на АЦСС является тканеспецифичным и реализуется в основном в тех тканях, где присутствуют гомологичные им рецепторы. Эти результаты согласуются с данными других авторов, полученными на клеточных культурах. Так, регуляторные эффекты пептида, соответствующего N-концевому участку ЦП-3 активируемого протеазами рецептора 1-го типа, на активность G-белков и фосфолипазы Сβ не выявляются в клетках, где отсутст-

Таблица 3

Вторичная структура пальмитоилированных пептидов II и VI в водных растворах, имеющих нейтральную (pH 7) или щелочную (pH 10) среду, а также содержащих 40 % ТФЭ (по данным спектроскопии КД)

Тип вторичной структуры, %	Пептид II			Пептид VI		
	pH 7	pH 10	40 % ТФЭ	pH 7	pH 10	40 % ТФЭ
α-Спираль	4 ± 2	27 ± 3	11 ± 2	3 ± 2	12 ± 2	11 ± 2
Антипараллельная β-структура	38 ± 3	16 ± 2	25 ± 2	40 ± 3	29 ± 3	24 ± 2
Параллельная β-структура	5 ± 2	6 ± 2	5 ± 2	5 ± 2	6 ± 2	5 ± 2
β-Повороты	19 ± 2	18 ± 2	23 ± 2	20 ± 2	19 ± 2	26 ± 3
Неупорядоченная структура	34 ± 3	33 ± 3	36 ± 3	32 ± 3	34 ± 3	34 ± 3

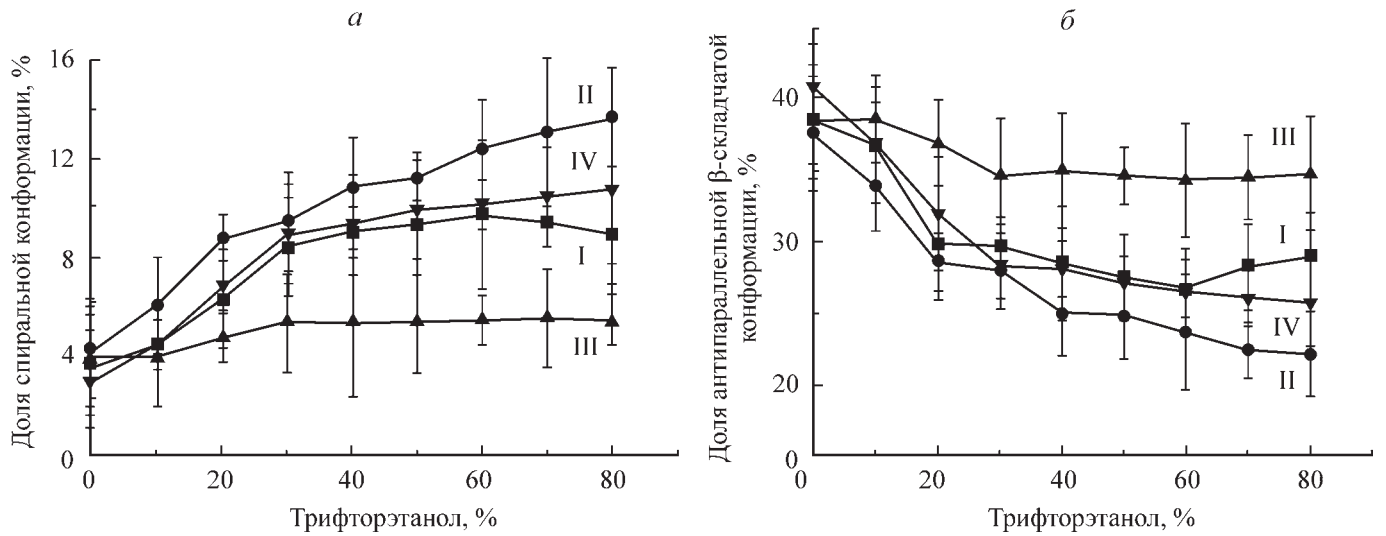


Рис. 5. Изменение доли спиральной (а) и антипараллельной β-складчатой (б) конформаций ЛГР-пептидов при возрастающих концентрациях ТФЭ (10—80 %).

вует активируемый протеазами рецептор 1-го типа или вместо него имеется мутантная, неактивная, форма рецептора (Covic et al., 2002b). Пальмитоилированный пептид 374—386, соответствующий проксимальному к мембране участку С-концевого домена того же рецептора, регулирует фосфоинозитидный обмен только в тех клеточных культурах, где экспрессирован активируемый протеазами рецептор 1-го типа (Swift et al., 2006).

Совокупность данных о рецепторной и тканевой специфичности действия пептидов, производных ЦП-3 ЛГР и Сер₆P, указывает на то, что ключевую роль в механизмах их действия на АЦСС играют гомологичные рецепторы. Зависимость биологической активности пептида от присутствия гомологичного рецептора хорошо согласуется с молекулярной моделью действия пептидов, предложенной группой Кулиопулоса (Covic et al., 2002a). В соответствии с этой моделью пептид специфично взаимодействует с комплементарными ему участками ЦП рецептора, что приводит к изменению конформации G-белоксвязывающего сайта и вызывает либо ослабление

гормонального сигнала, что наблюдается чаще, либо его усиление (Covic et al., 2002a, 2002b; Miller et al., 2009; Shpakov, 2010, 2011). В первом случае пептид функционирует как внутриклеточный антагонист, во втором — как агонист. В рамках этой модели возможен и другой механизм, который включает в себя взаимодействие пептида с комплементарными участками рецептора, вовлеченными в формирование межмолекулярных рецепторных комплексов, стабильность которых определяет функциональную активность рецептора (Shpakov, 2010, 2011; Шпакова, Шпаков, 2011; Tressel et al., 2011). Принципиально другой механизм действия пептидов, производных рецепторов, заключается в их прямом взаимодействии с рецептор-связывающими участками α-субъединицы G-белка, что ведет к активации G-белка и запуску сопряженного с ним сигнального каскада (Shpakov, Pertseva, 2007; Shpakov, 2010). Однако в этом случае отсутствует тканевая и рецепторная специфичность действия пептидов и исчезает необходимость присутствия гомологичного рецептора для проявления пептидом биологической ак-

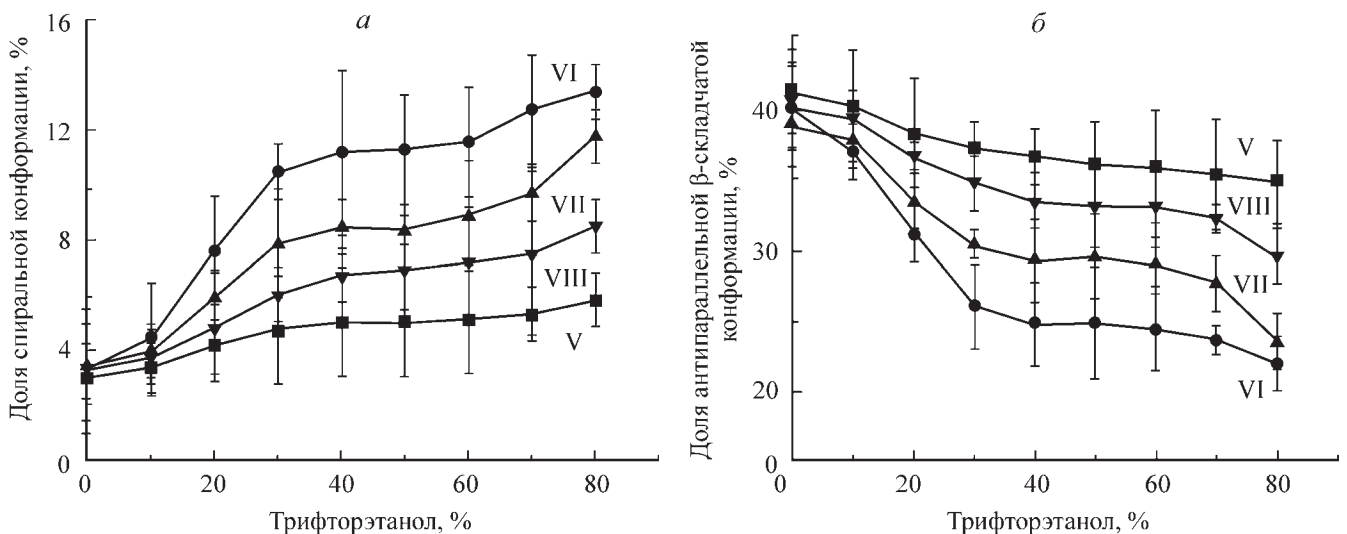


Рис. 6. Изменение доли спиральной (а) и антипараллельной β-складчатой (б) конформаций Сер₆P-пептидов при возрастающих концентрациях ТФЭ (10—80 %).

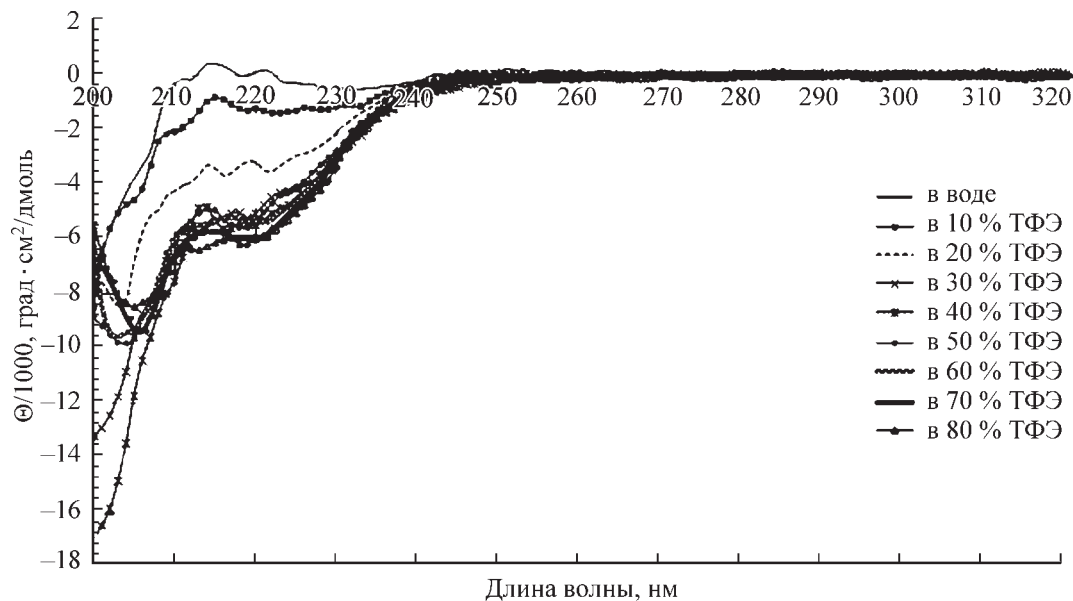


Рис. 7. Спектры кругового дихроизма для пальмитоилированного Сер₆P-пептида VI при возрастающих концентрациях ТФЭ.

тивности, что не согласуется с результатами, полученными нами и другими авторами при изучении значительного числа пептидов, производных ЦП-3 рецепторов (Covic et al., 2002a, 2002b; Trivedi et al., 2009; Шпакова, Шпаков, 2011; Shpakov, 2011; Tressel et al., 2011). Можно предположить, что пептиды, имеющие значительный положительный заряд и спиральную структуру, способны активировать G-белки по не зависящему от рецептора механизму, что будет вносить вклад в их результирующий биологический эффект. Возможно, этим объясняется тот факт, что изученные нами Сер₆P-пептиды в незначительной степени влияли на базальную и стимулированную ХГЧ активность АЦ в семенниках, где отсутствуют гомологичные им рецепторы (Voskaert et al., 2006). Эти пептиды имеют отчетливо выраженный положительный заряд, поскольку содержат четыре положительно заряженных остатка лизина (в пальмитоилированном пептиде их три), по одному остатку аргинина и гистидина, свободную N-концевую α-аминогруппу, а также амидированную C-концевую карбоксильную группу, что равноценно потере одного отрицательного заряда. ЛГР-пептиды более специфичны, что, как мы полагаем, связано с их меньшим положительным зарядом. В этой связи следует отметить, что поликатионные пептиды, не имеющие гомологии с рецепторными белками, в том числе поликатионные токсины из яда насекомых, пептидные аутоиндукторы бактерий и неприродные пептиды с регулярной структурой, способны непосредственно взаимодействовать с α-субъединицами G-белков (Шпаков и др., 2004, 2009; Shpakov, Pertseva, 2008; Shpakov, 2010; Shpakov et al., 2010b).

Предполагается, что проксимальные к мембране участки рецепторов, ответственные за взаимодействие с G-белками, в большинстве случаев должны находиться в спиральной конформации, которая наиболее оптимальна для взаимодействия с α-субъединицей G-белка (Okuda et al., 2002; Kikkou et al., 2008; Wu et al., 2008; Bellot et al., 2009). Несмотря на то что многие из этих участков содержат значительное число АКО, дестабилизирующих спирали, часть из них действительно обладает способностью к образованию спиральных структур. Стабилизация этих структур осуществляется соседними с ними спирализо-

ванными трансмембранными доменами, а также вследствие их взаимодействия с комплементарными участками рецептора и гидрофобной фазой мембраны (Okuda et al., 2002; Naider et al., 2005; Kikkou et al., 2008; Wu et al., 2008; Bellot et al., 2009). На основании этого было высказано предположение о том, что спиральная конформация необходима для проявления пептидами, производными ЦП рецептора, биологической активности, что должно учитываться при поиске и конструировании таких пептидов (Okuda et al., 2002; Naider et al., 2005). Однако имеются данные о том, что способность к образованию спиралей не является необходимым условием для проявления пептидами биологической активности и что многие из них, являясь эффективными и селективными регуляторами гормональных систем, находятся в β-складчатой или неупорядоченной конформации (Franzoni et al., 1997; Ulfers et al., 2002; Shpakov, 2011). В пользу этого свидетельствуют и результаты, полученные нами при изучении пептидов, производных С-ЦП-3 ЛГР и Сер₆P.

Все изученные нами пептиды содержат большое количество АКО, которые характерны для участков белковых молекул, находящихся в неупорядоченной конформации (Ala, Arg, Lys, Gly и Ser), и содержат сравнительно мало АКО, которые встречаются в высокоупорядоченных структурах (Trp, Cys, Phe, Ile, Tyr, Val, Leu и Asn) (Agnati et al., 2009). Установлено, что вариabельные участки белков имеют низкий уровень упорядоченности пространственной структуры (Dyson, Wright, 2005). Проведенный нами анализ аминокислотных последовательностей С-ЦП-3 рецепторов серпантинного типа показывает, что большинство из них вариabельно, даже в случае близкородственных рецепторов, хотя и содержит высококонсервативные ВВХХВ и родственные им мотивы, ответственные за связывание и активацию G-белков (Шпаков, 2002, 2003). Вследствие этого можно предположить, что способность исследуемых пептидов, производных С-ЦП-3 ЛГР и Сер₆P, к формированию спиральных структур будет выражена слабо, что и подтвердилось при их исследовании с помощью спектроскопии КД. Даже в присутствии значительных концентраций ТФЭ (до 80 %) для ЛГР- и Сер₆P-пептидов не наблюдалось существенного повыше-

ния вклада спиральной конформации в их вторичную структуру.

Исключение составили пальмитоилированные пептиды — ЛГР-пептид II и Сер₆P-пептид VI. В нейтральной и кислой средах они не образовывали спиральных структур. Однако в щелочной среде доля их спиральной конформации повышалась до 12—27 %, что связано с депротонированием в щелочной среде остатков лизина и аргинина, которое приводит к повышению гидрофобности пептидов и способствует образованию мицелл и других упорядоченных структур с существенным вкладом спиральной конформации. Это согласуется с данными ряда авторов о том, что нейтрализация в щелочной среде положительного заряда пептидов, обогащенных положительно заряженными АКО, и в кислой среде отрицательного заряда пептидов, обогащенных остатками глутаминовой кислоты, приводит к повышению их спиральности (Kono et al., 1993; Fukushima et al., 1994; Marti et al., 2000; Li et al., 2004). Так, в щелочной среде (рН 8—11.5) вследствие депротонирования наблюдается переход в спиральную конформацию положительно заряженного полилизина, который в кислой среде существует в виде неупорядоченного клубка (Fukushima et al., 1994). Переход в α -спиральную конформацию в щелочной среде при рН выше 7.5 наблюдался и в случае положительно заряженного полипептида с регулярной структурой — поли(Lys-Aib-Leu-Aib), где Aib — 2-аминоизомаасляная кислота, причем этот процесс в значительной степени усиливался в присутствии однослойных везикул, образованных лецитином яичного желтка (Kono et al., 1993). Отрицательно заряженный полипептид поли(Glu-Aib-Leu-Aib), напротив, переходил в α -спиральную конформацию при низких значениях рН (Kono et al., 1993). Поли(Lys-Aib-Leu-Aib) в слабощелочной среде и поли(Glu-Aib-Leu-Aib) в слабокислой среде с высокой эффективностью связывались с везикулами, которые образованы дипальмитоилфосфатидилхолином и моделируют плазматическую мембрану (Kono et al., 1993). 30-мерный полипептид, имеющий повторяющиеся сегменты (Glu-Ala-Leu-Ala) и сходный по заряду и структуре с поли(Glu-Aib-Leu-Aib), также образовывал спирали при снижении рН до 5. При нейтральных значениях рН полипептид хорошо растворялся в воде, в то время как в подкисленном растворе его растворимость сильно снижалась, но наблюдалась отчетливо выраженная ассоциация с гидрофобной поверхностью мембраны, что является следствием нейтрализации отрицательного заряда и повышения гидрофобности (Li et al., 2004). Следует отметить, что изученные нами пальмитоилированные пептиды были хорошо растворимы в подкисленном водном растворе, плохо растворялись при нейтральных значениях рН и выпадали в осадок при слабощелочных значениях рН.

Нейтрализация заряда приводит не только к повышению спиральности, но и способствует формированию пептидами спираль-спиральных структур. Суперспирали образуются вследствие гидрофобных взаимодействий между нейтрализованными заряженными АКО и неполярными АКО, которые локализованы на гидрофобной стороне амфипатической спирали. В пептидах, модифицированных остатками жирных кислот или фрагментами трансмембранных доменов, гидрофобный радикал может выполнять функцию гидрофобной фазы и стабилизировать спиральную конформацию пептида, вступая в гидрофобные взаимодействия как с неполярной, так и с нейтрализованной заряженной сторонами спирали, что вносит значительный вклад в формирование не только спираль-

ных, но и суперспиральных структур (Miller et al., 2009). Можно предположить, что остаток пальмитата в пептидах II и VI также приводит к формированию суперспиральных структур, что и отличает их от немодифицированных аналогов, которые не склонны к образованию спиралей во всем диапазоне значений рН.

ТФЭ — это неводный растворитель, который образует устойчивые комплексы с пептидами и белками, стабилизируемые водородными связями между сравнительно кислой гидроксильной группой ТФЭ и полярными или слабополярными боковыми радикалами АКО. Вследствие этого происходит экранирование заряженных групп пептидов и белков, что повышает их гидрофобность и способствует образованию спиралей (Scharge et al., 2007). Существенный вклад в этот процесс вносит способность молекул ТФЭ образовывать ди-, три- и олигомерные ассоциаты, что также стабилизирует упорядоченную структуру пептидов. В присутствии высоких концентраций ТФЭ даже пептиды, имеющие очень низкую склонность к формированию спиральных структур, приобретают способность образовывать α -спирали (Krause et al., 1996; Thenparasu, Nagaraj, 1997). Так, модельный 26-мерный пептид, который наряду с L-аминокислотами содержал две D-аминокислоты, дестабилизирующие спиральную конформацию, в 50%-ном ТФЭ образовывал протяженную спираль. Пептид, соответствующий участку 1—26 пардаксина, и его аналоги, которые в водном растворе образовывали β -складчатые структуры и β -повороты, в присутствии ТФЭ приобретали способность формировать как упорядоченные, так и искаженные α -спирали (Thenparasu, Nagaraj, 1997).

Однако в нашем случае в присутствии высоких концентраций ТФЭ не наблюдалось существенного повышения доли спиральной конформации ЛГР- и Сер₆P-пептидов, которая даже в случае пальмитоилированных пептидов не превышала 14 %. Это свидетельствует о том, что способность к формированию спиралей у пептидов, производных ЦП-3 ЛГР и Сер₆P, выражена в незначительной степени. Можно предположить, что не следует ожидать значительного повышения доли спиральной конформации этих пептидов при их взаимодействии с гидрофобной поверхностью мембраны и с комплементарными участками сигнальных белков. Таким образом, нами показано, что отсутствие у пептидов, производных ЦП рецепторов, выраженной способности к формированию спиральных структур существенно не влияет на их биологическую активность. Это хорошо согласуется с наиболее вероятным механизмом действия пептидов, производных ЦП рецепторов, в соответствии с которым пептид взаимодействует с комплементарными ему участками гомологичного рецептора, не обязательно спиральными, и этот механизм не требует образования пептидом спиральной структуры. Мы полагаем, что лабильность пространственной структуры, которая выражается в значительной доле неупорядоченной конформации, а также наличие гидрофобного якоря в виде пальмитата позволяют пептидам с высокой эффективностью проникать в пространство, образованное цитоплазматическими участками рецептора, и образовывать с ними продуктивный комплекс. Вследствие этого при разработке селективных регуляторов на основе пептидов, производных ЦП рецепторов, на первый план выходит соответствие их первичной структуры функционально важным участкам рецепторов, а не способность пептидов формировать амфипатические α -спирали.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 09-04-00746).

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 серпантинного типа в процессе передачи гормонального сигнала. Журн. эволюц. биохим. физиол. 38 (3): 205—217.

Шпаков А. О. 2009. Поликатионные пептиды как негормональные регуляторы сигнальных систем. Журн. эволюц. биохим. физиол. 45 (4): 355—367.

Шпаков А. О., Гурьянов И. А., Тарасенко И. И., Власов Г. П. 2009. Влияние поликатионных пептидов различной природы на функциональное состояние регулируемой серотонином аденилатциклазной сигнальной системы в мозге крыс. Нейрохимия. 26 (4): 302—311.

Шпаков А. О., Корольков В. И., Гурьянов И. А., Власова Е. Н., Плеснева С. А., Кузнецова Л. А., Воробьев В. И., Чихиржина Е. В., Власов Г. П., Перцева М. Н. 2004. 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., Перцева М. Н., Гурьянов И. А., Власов Г. П. 2005. Влияние пептидов, производных третьей цитоплазматической петли релаксина рецептора 1 типа, на стимуляцию релаксином ГТФ-связывающей активности G-белков. Биол. мембраны. 22 (6): 435—442.

Шпакова Е. А., Шпаков А. О. 2011. Пептиды, соответствующие цитоплазматическим участкам соматостатиновых рецепторов, с активностью агонистов и антагонистов. Докл. РАН. 437 (1): 128—131.

Agnati L. F., Fuxe K., Woods A., Genedani S., Guidolin D. 2009. Theoretical considerations on the topological organization of receptor mosaics. Curr. Protein Pept. Sci. 10: 559—569.

Bellot G., Granier S., Bourguet W., Seyer R., Rahmeh R., Mouillac B., Pascal R., Mendre C., Demene H. 2009. Structure of the third intracellular loop of the vasopressin V2 receptor and conformational changes upon binding to gC1qR. J. Mol. Biol. 388: 491—507.

Bockaert J., Claeysen S., Becamel C., Dumuis A., Marin P. 2006. Neuronal 5-HT metabotropic receptors: fine-tuning of their structure, signaling, and roles in synaptic modulation. Cell Tissue Res. 326: 553—572.

Covic L., Gresser A. L., Talavera J., Swift S., Kuliopulos A. 2002a. Activation and inhibition of G protein-coupled receptors by cell-penetrating membrane-tethered peptides. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 99: 643—648.

Covic L., Misra M., Badar J., Singh C., Kuliopulos A. 2002b. Pepducin-based intervention of thrombin-receptor signaling and systemic platelet activation. Nat. Med. 8: 1161—1165.

Dyson H. J., Wright P. E. 2005. Intrinsically unstructured proteins and their functions. Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. 6: 197—208.

Franzoni L., Nicastro G., Pertinhez T. A., Tato M., Nakaie C. R., Paiva A. C., Schreier S., Spisni A. 1997. Structure of the C-terminal fragment 300—320 of the rat angiotensin II AT_{1A} receptor and its relevance with respect to G protein coupling. J. Biol. Chem. 272: 9734—9741.

Fukushima K., Sakamoto T., Tsuji J., Kondo K., Shimozawa R. 1994. The transition of α -helix to β -structure of poly(L-lysine) induced by phosphatidic acid vesicles and its kinetics at alkaline pH. Biochim. biophys. acta. 1191: 133—140.

Johnston C. A., Siderovski D. P. 2007. Structural basis for nucleotide exchange on G α_i subunits and receptor coupling specificity. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 104: 2001—2006.

Kikkou T., Matsumoto O., Ohkubo T., Kobayashi Y., Tsujimoto G. 2008. NMR structure of an intracellular third loop peptide of human GABA_B receptor. Biochem. Biophys. Res. Commun. 366: 681—684.

Kono K., Nishii H., Takagishi T. 1993. Fusion activity of an amphiphilic polypeptide having acidic amino acid residues: generation of fusion activity by α -helix formation and charge neutralization. Biochim. biophys. acta. 1164: 81—90.

Krause E., Beyermann M., Fabian H., Dathe M., Rothe-mund S., Bienert M. 1996. Conformation of a water-soluble β -sheet model peptide. A circular dichroism and Fourier-transform infrared spectroscopic study of double D-amino acid replacements. Int. J. Pept. Protein Res. 48: 559—568.

Kusunoki K., Wakamatsu K., Sato K., Miyazawa T., Kohno T. 1998. G protein-bound conformation of mastoparan-X: heteronuclear multidimensional transferred nuclear Overhauser effect analysis of peptide uniformly enriched with ¹³C and ¹⁵N. Biochemistry. 37: 4782—4790.

Li W., Nicol F., Szoka F. C. 2004. GALA: a designed synthetic pH-responsive amphiphilic peptide with applications in drug and gene delivery. Adv. Drug Deliv. Rev. 56: 967—985.

Licht T., Tsurulnikov L., Reuveni H., Yarnitzky T., Ben-Sasson S. A. 2003. Induction of pro-angiogenic signaling by a synthetic peptide derived from the second intracellular loop of SIP3 (EDG3). Blood. 102: 2099—2107.

Marti D. N., Jelesarov I., Bosshard H. R. 2000. Interhelical ion pairing in coiled coils: solution structure of a heterodimeric leucine zipper and determination of pK_a values of Glu side chains. Biochemistry. 39: 12 804—12 818.

Miller J., Agarwal A., Devi L. A., Fontanini K., Hamilton J. A., Pin J. P., Shields D. C., Spek C. A., Sakmar T. P., Kuliopulos A., Hunt S. W. 2009. Insider access: pepducin symposium explores a new approach to GPCR modulation. Ann. N. Y. Acad. Sci. 1180: 1—12.

Naider F., Khare S., Arshava B., Severino B., Russo J., Becker J. M. 2005. Synthetic peptides as probes for conformational preferences of domains of membrane receptors. Biopolymers. 80: 199—213.

Nanoff C., Koppensteiner R., Yang Q., Fuerst E., Ahorn H., Freissmuth M. 2006. The carboxyl terminus of the G α -subunit is the latch for triggered activation of heterotrimeric G proteins. Mol. Pharmacol. 69: 397—405.

Odagaki Y., Nishi N., Koyama T. 1997. Effects of the wasp venom peptide, mastoparan, on GTP hydrolysis in rat brain membranes. Br. J. Pharmacol. 121: 1406—1412.

Okuda A., Matsumoto O., Akaji M., Taga T., Ohkudo T., Kobayashi Y. 2002. Solution structure of intracellular signal-transducing peptide derived from human β_2 -adrenergic receptor. Biochem. Biophys. Res. Commun. 291: 1297—1301.

Scharge T., Cézard C., Zielke P., Schütz A., Emmeluth C., Suhm M. A. 2007. A peptide co-solvent under scrutiny: self-aggregation of 2,2,2-trifluoroethanol. Phys. Chem. Chem. Phys. 9: 4472—4490.

Shpakov A. O. 2010. Natural and synthetic cationic peptides as regulators of hormone-sensitive signaling systems and molecular mechanisms of their action. Curr. Topics Peptide Protein Res. 11: 1—30.

Shpakov A. O. 2011. GPCR-based peptides: structure, mechanisms of action and application. Global J. Biochem. 2: 96—123.

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 skeletal muscles of rat with streptozotocin type 1 diabetes. Cent. 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. New York: Nova Sci. Publ., Inc. 45—93.

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

Shpakov A. O., Shpakova E. A., Tarasenko I. I., Derkach K. V., Chistyakova O. V., Avdeeva E. A., Vlasov G. P. 2011. The influence of peptides corresponding to the third intracellular loop of luteinizing hormone receptor on basal and hormone-stimulated activity of the adenylyl cyclase signaling system. *Global J. Biochem.* 2 : 59—73.

Shpakov A. O., Shpakova E. A., Tarasenko I. I., Derkach K. V., Vlasov G. P. 2010a. The peptides mimicking the third intracellular loop of 5-hydroxytryptamine receptors of the types 1B and 6 selectively activate G proteins and receptor-specifically inhibit serotonin signaling via the adenylyl cyclase system. *Int. J. Pept. Res. Ther.* 16 : 95—105.

Shpakov A. O., Tarasenko I. I., Shpakova E. A., Guryanov I. A., Derkach K. V., Vlasov G. P. 2010b. Molecular mechanisms of action of G protein-coupled receptor (GPCR)-derived and non-GPCR cationic peptides on adenylyl cyclase signaling system. *Curr. Topics Peptide Protein Res.* 11 : 49—65.

Smyth S. S., Woulfe D. S., Weitz J. I., Gachet C., Conley P. B., Goodman S. G., Roe M. T., Kuliopulos A., Moliterno D. J., French P. A., Steinhubl S. R., Becker R. C. 2009. G-protein-coupled receptors as signaling targets for antiplatelet therapy. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 29 : 449—457.

Swift S., Leger A. J., Talavera J., Zhang L., Bohm A., Kuliopulos A. 2006. Role of the PAR1 receptor 8th helix in signaling: the 7-8-1 receptor activation mechanism. *J. Biol. Chem.* 281 : 4109—4116.

Thennarasu S., Nagaraj R. 1997. Solution conformations of peptides representing the sequence of the toxin pardaxin and analogues in TFE-water mixtures: analysis of CD spectra. *Biopolymers.* 41 : 635—645.

Todokoro Y., Yumen I., Fukushima K., Kang S. W., Park J. S., Kohno T., Wakamatsu K., Akutsu H., Fujiwara T. 2006. Structure of tightly membrane-bound mastoparan-X, a G-protein-activating peptide, determined by solid-state NMR. *Biophys. J.* 91 : 1368—1379.

Tressell S. L., Koukos G., Tchernychev B., Jacques S. L., Covic L., Kuliopulos A. 2011. Pharmacology, biodistribution, and efficacy of GPCR-based pepducins in disease models. *Meth. Mol. Biol.* 683 : 259—275.

Trivedi V., Boire A., Tchernychev B., Kaneider N. C., Leger A. J., O'Callaghan K., Covic L., Kuliopulos A. 2009. Platelet matrix metalloprotease-1 mediates thrombogenesis by activating PAR1 at a cryptic ligand site. *Cell.* 137 : 332—343.

Ulfers A. L., McMurry J. L., Miller A., Wang L., Kendall D. A., Mierke D. F. 2002. Cannabinoid receptor-G protein interactions: G_{o1}-bound structures of IC3 and a mutant with altered G protein specificity. *Protein Sci.* 11 : 2526—2531.

Wu J., Feng M., Ruan K. H. 2008. Assembling NMR structures for the intracellular loops of the human thromboxane A₂ receptor: implication of the G protein-coupling pocket. *Arch. Biochem. Biophys.* 470 : 73—82.

Поступила 10 VI 2011

THE SECONDARY STRUCTURE OF PEPTIDES DERIVED
FROM THE THIRD INTRACELLULAR LOOP OF THE SERPENTINE TYPE RECEPTORS
AND ITS INTERRELATION WITH THEIR BIOLOGICAL ACTIVITY

E. A. Shpakova,¹ E. A. Skvortsova,² Tarasenko I. I., A. O. Shpakov^{3,*}

¹ Institute of Macromolecular Compounds RAS, ² Institute of Cytology RAS,
and ³ I. M. Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry RAS, St. Petersburg;
* e-mail: alex_shpakov@list.ru

We and other authors have shown that synthetic peptides corresponding to regions of the third intracellular loop (ICL-3) of receptors of the serpentine type are capable of activating G-protein signaling cascades and trigger them in the absence of hormone. To create on the basis of these peptides the selective regulators of hormonal signaling systems the relationship between their biological activity and secondary structure are studied. It is assumed that most suitable is a helical conformation, which allows the peptide effectively interact with signaling proteins. The aim of this study was to test the biological activity and secondary structure of synthesized by us linear peptides and their dimeric and palmitoylated analogs, corresponding to C-terminal region of the ICL-3 of luteinizing hormone receptor (LHR) and 5-hydroxytryptamine receptor of the type 6 (5-HT₆R). It is shown that LHR-peptides at the micromolar concentrations stimulate the basal activity of adenylyl cyclase (AC) and the GTP-binding of G-proteins in the plasma membranes of rat testes, while 5-HT₆R-peptides activate AC and G-proteins in the synaptosomal membranes of rat brain. The action of peptides is tissue-specific and observed in the tissues where there are homologous receptors. The most effective were palmitoylated peptides. LHR-peptide reduced the AC stimulatory effect of human chorionic gonadotropin, while 5-HT₆R-peptides the effect of 5-HT₆R-agonist, EMD-386088, and the action of the peptides was not found in the case of non-homologous receptors. Using circular dichroism spectroscopy it is shown that in neutral (pH 7) and acidic (pH 2) medium all the peptides are exist predominantly in the antiparallel β -sheet (37—42 %) and disordered conformations (33—35 %). In alkaline medium (pH 10) in the case palmitoylated peptides the increase of the contribution of the helical conformation to 12—27 % was observed. In the presence of trifluoroethanol (10—80 %), a helix-forming solvent, the contribution of helical conformation for the majority of peptides was slightly increased (for palmitoylated analogs to 14 %), however, in this case the antiparallel β -sheet and disordered conformation prevailed. The conclusion was made that the lack of clearly expressed ability to form helices in peptides derived the ICLs of receptors did not significantly affect their activity. This is consistent with proposed mechanism of peptides action, whereby peptide interacts with the complementary regions of homologous receptor that does not require the helix formation.

Key words: adenylyl cyclase, G-protein, secondary structure, circular dichroism, peptide, luteinizing hormone receptor, serotonin, 5-hydroxytryptamine receptor of the type 6, the third intracellular loop.