

## РЕГУЛЯЦИЯ АКТИВНОСТИ АДЕНИЛАТЦИКЛАЗЫ В СЕМЕННИКАХ КРЫС АЦИЛИРОВАННЫМИ ПРОИЗВОДНЫМИ ПЕПТИДА 562–572 РЕЦЕПТОРА ЛЮТЕИНИЗИРУЮЩЕГО ГОРМОНА

© Е. А. Шпакова,<sup>1</sup> А. О. Шпаков<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Институт высокомолекулярных соединений РАН

и <sup>2</sup> Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова РАН,  
Санкт-Петербург;

<sup>2</sup> электронный адрес: alex\_shpakov@list.ru

Одним из направлений поиска регуляторов гормональных сигнальных систем является разработка пептидов, которые соответствуют цитоплазматическим участкам сопряженных с G-белками рецепторов (GPCR). Модификация таких пептидов гидрофобными радикалами повышает их эффективность и селективность. Однако в настоящее время не изучено, как активность пептида зависит от локализации в нем гидрофобных радикалов, их числа и химической природы. Цель работы состояла в синтезе производных пептида 562–572, модифицированных жирнокислотными радикалами и соответствующих С-концевому участку рецептора лютеинизирующего гормона (ЛГР), и в исследовании регуляторного влияния ацилированных ЛГР-пептидов на базальную и стимулированную гормонами активность аденилатциклазы (АЦ) в тканях крыс. Для выяснения влияния локализации гидрофобных радикалов и их числа осуществляли модификацию ими пептида 562–572 только с N-, только с С-конца или с обоих концов. Для изучения влияния гидрофобности были выбраны остатки пальмитиновой (Pal) и декановой (Dec) кислот. С помощью твердофазной стратегии синтезировали немодифицированный пептид NDTKI-АКК-Nle-A<sup>562–572</sup>-КА (1) и пять ацилированных его аналогов — N[K(Dec)]DTKIАКК-Nle-A<sup>562–572</sup>-КА (2), NKDTKIАКК-Nle-A<sup>562–572</sup>-[K(Dec)]А (3), N[K(Dec)]DTKIАКК-Nle-A<sup>562–572</sup>-[K(Dec)]А (4), N[K(Pal)]DTKIАКК-Nle-A<sup>562–572</sup>-КА (5) и NKDTKIАКК-Nle-A<sup>562–572</sup>-[K(Pal)]А (6). Пептид 6, модифицированный с С-конца пальмитатом, в значительной степени повышал базальную активность АЦ и снижал стимуляцию АЦ при действии хорионического гонадотропина человека (ХГЧ) в семенниках крыс, пептиды 3 и 4, модифицированные с С-конца деканоатом, были менее эффективными, но превосходили по активности немодифицированный пептид 1. Ацилированные с N-конца пептиды 2 и 5 были малоактивными. Действие пептидов характеризовалось тканевой и рецепторной специфичностью. Таким образом, модификация ЛГР-пептида 562–572 с С-конца жирнокислотными радикалами усиливает его регуляторное влияние на функциональную активность аденилатциклазной системы в семенниках крыс, что указывает на перспективность модификации GPCR-пептидов гидрофобными радикалами. Полученные данные подтверждают гипотезу о том, что гидрофобный радикал должен быть локализован в том локусе GPCR-пептида, где в рецепторе расположен трансмембранный домен.

**Ключевые слова:** аденилатциклаза, гидрофобный радикал, гонадотропин, деканоат, пальмитат, пептид, рецептор лютеинизирующего гормона, сопряженный с G-белком рецептор.

**Принятые сокращения:** АЦ — аденилатциклаза, АЦСС — аденилатциклазная сигнальная система, ЛГР — рецептор лютеинизирующего гормона, ТТГ — тиреотропный гормон, ХГЧ — хорионический гонадотропин человека, ЦПЗ — третья цитоплазматическая петля, GPCR — сопряженный с G-белком рецептор (G protein-coupled receptor), G<sub>s</sub> и G<sub>i</sub> — G-белок стимулирующего и ингибирующего типов соответственно, PACAP-38 — гипоталамический АЦ-активирующий полипептид длиной 38 аминокислотных остатков, PAR1, PAR2 — активируемые протеиназами рецепторы 1-го и 2-го типов.

Одним из перспективных направлений современной молекулярной и клеточной биологии является разработка регуляторов гормональных сигнальных систем на основе пептидов, которые по первичной структуре соответствуют функционально важным участкам рецепторов серпантинного типа, сопряженным с гетеротримерными G-белками (GPCR). На начальном этапе исследований GPCR-пептиды рассматривали как функциональные зонды для

изучения молекулярных механизмов передачи гормонального сигнала в клетку и для исследования структурно-функциональной организации рецепторных молекул и их комплексов с G-белками (Hedin et al., 1993; Shpakov, Pertseva, 2007). Однако в последние годы все больше внимания уделяется тем широким возможностям, которые открываются при использовании GPCR-пептидов и их производных в клинике для регуляции и модуляции фи-

зиологических и биохимических процессов, нарушенных в условиях патологии (Miller et al., 2009; Shpakov, 2011a). Установлено, что наибольшей активностью обладают GPCR-пептиды, которые модифицированы гидрофобными радикалами, имитирующими трансмембранные домены рецептора (Tressel et al., 2011; O'Callaghan et al., 2012). Так, модифицированные гидрофобными радикалами GPCR-пептиды, соответствующие участкам цитоплазматических петель GPCR, в первую очередь их третьей цитоплазматической петле (ЦПЗ), обладают значительно более высокой активностью в условиях *in vitro* (Covic et al., 2002a, 2002b; Шпаков и др., 2005, 2011; Shpakov et al., 2007, 2010, 2011, 2012), а также являются регуляторами ангиогенеза, эндокринных функций, обладают противовоспалительной, противовоспалительной и антивирусной активностью в условиях *in vivo* (Covic et al., 2002a, 2007; Derian et al., 2003; Kaneider et al., 2007; Agarwal et al., 2008; Cisowski et al., 2011; Sevigny et al., 2011; Шпакова и др., 2012b). В то же время немодифицированные аналоги, как правило, менее активны (Covic et al., 2002b; Shpakov et al., 2007, 2012). Потенцирующее влияние гидрофобных радикалов на биологическую активность GPCR-пептидов связывают с тем, что липофильная часть модифицированного GPCR-пептида способствует его проникновению в липидную фазу мембраны, позволяет GPCR-пептиду закоротиться в мембране вблизи белков-мишеней его регуляторного действия, стабилизирует вторичную структуру GPCR-пептида и делает ее сходной с таковой в полноразмерном рецепторе (Covic et al., 2007; Shpakov, 2011b; Tressel et al., 2011; Шпакова и др., 2012a).

Однако несмотря на значительный прогресс в создании модифицированных гидрофобными радикалами GPCR-пептидов, практически неизученным остается вопрос о том, как локализация гидрофобных радикалов, их химическая природа, а также число и взаимное расположение влияют на биологическую активность GPCR-пептида. Предполагается, что гидрофобный радикал имитирует трансмембранный домен рецептора, который граничит с соответствующим пептиду цитоплазматическим участком (Covic et al., 2007; Shpakov, 2011a; O'Callaghan et al., 2012). Если основываться на этом предположении, то гидрофобный радикал должен быть локализован в проксимальном к мембране сегменте пептида и быть сопоставимым по размеру с соседним трансмембранным доменом.

Цель работы состояла в проверке этой гипотезы. Для этого синтезировали производные пептида 562—572, модифицированные гидрофобными радикалами и соответствующие С-концевому участку рецептора лютеинизирующего гормона (ЛГР) крысы, и проводили сравнительное изучение их влияния на базальную и стимулированную

гормонами активность фермента аденилатциклазы (АЦ) — каталитического компонента аденилатциклазной сигнальной системы (АЦСС), — в семенниках крыс. Изучали влияние липофильных производных ЛГР-пептидов на стимуляцию АЦ хорионическим гонадотропином человека (ХГЧ), структурным и функциональным гомологом лютеинизирующего гормона (ЛГ), который также специфично связывается с ЛГР и активирует АЦ через посредство G-белков стимулирующего типа (G<sub>s</sub>-белков). Следует отметить, что ЛГ играет ключевую роль в регуляции синтеза и секреции стероидных гормонов репродуктивной тканью, контролирует сперматогенез, фолликулогенез и оогенез (Ziesik et al., 2007; Sofikitis et al., 2008). Для исследования рецепторной специфичности ЛГР-пептидов, модифицированных гидрофобными радикалами, изучали их влияние на регуляцию АЦ гормонами, чье действие реализуется через рецепторы, отличные от ЛГР, а для исследования тканевой специфичности — действие пептидов на АЦСС в миокарде и мозге крыс.

## Материал и методика

В работе использовали ХГЧ, гипофизарный АЦ-активирующий полипептид длиной 38 аминокислотных остатков (PACAP-38), изопротеренон, соматостатин и форсколин (Sigma, США). Другие реактивы были получены из фирм Sigma (США) и Fluka (Швейцария). Для определения активности АЦ использовали [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]АТФ (150 ГБк/ммоль) (ОАО Институт реакторных материалов, Россия), для разделения меченых адениновых нуклеотидов проводили колоночную хроматографию на нейтральной окиси алюминия (Sigma, США).

Пептиды были синтезированы с помощью твердофазной стратегии с использованием синтезатора NPS-4000 (Neosystem Laboratoires, Франция) (табл. 1). Синтез пептидов проводили на *para*-метилбензгидриламиновой смоле с емкостью 1.16 ммоль/г, используя защищенные N<sup>α</sup>-третбутилоксикарбонильными (ВОС) группами производные аминокислот. Для образования пептидной связи применяли метод активированных эфиров. 1-Оксибензотриазолиловые эфиры аминокислот получали с помощью N,N-диизопропилкарбодимида. Раствор 1-оксибензотриазолилового эфира ВОС-аминокислоты добавляли к пептидполимеру со свободными аминогруппами. Для достижения полноты ацилирования использовали трехкратный избыток ацилирующего агента, реакцию проводили в течение 1 сут. Деблокирование и снятие пептида с полимера проводили с использованием трифторметансульфокислоты (1 мл) в трифторуксусной кислоте (10 мл) в присутствии

Т а б л и ц а 1

Структура пептидов и данные масс-спектрометрического анализа

Пептид	Структура	M <sub>эсп.</sub>	M <sub>расч.</sub>
1	NKDTKIAKK-Nle-A <sup>562—572</sup> -амид	1227.67	1227.64
2	N[K(Dec)]DTKIAKK-Nle-A <sup>562—572</sup> -KA-амид	1381.92	1382.02
3	NKDTKIAKK-Nle-A <sup>562—572</sup> -[K(Dec)]A-амид	1381.89	1382.02
4	K(Dec)]DTKIAKK-Nle-A <sup>562—572</sup> -[K(Dec)]A-амид	1735.39	1735.41
5	N[K(Pal)]DTKIAK-Nle-A <sup>562—572</sup> -KA-амид	1665.16	1665.13
6	NKDTKIAKK-Nle-A <sup>562—572</sup> -[K(Pal)]A-амид	1665.14	1665.13

Примечание. Pal и Dec — остатки пальмитиновой и декановой кислот соответственно.

скавенджер — тиоанизола (1 мл) и этандитиола (0.5 мл) (все количества приведены на 1 г пептидил-полимера) — в течение 1 ч при охлаждении льдом и еще 1.5 ч без охлаждения. Затем добавляли 100 мл диэтилового эфира, выпавший осадок отделяли фильтрованием, растворяли в 5 мл трифторуксусной кислоты, фильтровали для удаления смолы и осаждали 100 мл сухого диэтилового эфира. Для введения остатков пальмитиновой и декановой кислот в пептидную цепь использовали липофильные производные лизина, которые получали конденсацией лизина, имеющего свободную  $\epsilon$ -аминогруппу, с пентафторфениловыми эфирами пальмитиновой или декановой кислоты в присутствии триэтиламина. Липофильные производные пептидов очищали с помощью обращенно-фазной высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), для подтверждения их структуры проводили масс-спектрометрический анализ (табл. 1). Масс-спектры высокого разрешения получали с помощью tandemной масс-спектрометрии с ионизацией электрораспылением на приборе Bruker MicroTOF (США) в следующем режиме — потенциал ионизации 70 В, напряжение на капилляре 4500 В, температура высушивающего газа 180 °С. Необходимо отметить, что ЛГР-пептид 562—572, модифицированный остатками пальмитиновой кислоты с N- и C-концов, был высокогидрофобным, не растворялся в водных растворителях и не мог быть использован в биологических экспериментах.

Выделение фракций плазматических мембран из семенников крыс Wistar (5—6-месячного возраста) и определение в них активности АЦ проводили, как описано ранее (Shpakov et al., 2011). Для получения каждой фракции брали 7—8 животных. Измельченные ткани семенников гомогенизировали при 4 °С в 40 мМ Tris-HCl-буфере (рН 7.5), который содержал 5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 10 % сахарозы и коктейль ингибиторов протеаз. 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 выделения (без сахарозы) и центрифугировали в том же режиме. Выделение фракций плазматических мембран из тканей мозга и миокарда крыс проводили, как описано ранее (Shpakov et al., 2010; Шпаков и др., 2011). Полученные плазматические мембраны суспендировали в 50 мМ Tris-HCl-буфере (рН 7.4) и использовали для исследования активности АЦ.

Активность АЦ определяли, как описано ранее (Shpakov et al., 2010). Инкубацию фракций мембран в реакционной смеси проводили при 37 °С в течение 12 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.

Статистический анализ полученных данных проводили с использованием метода ANOVA (Manugistics Inc., США). Каждый эксперимент выполняли трехкратно. Данные представлены в виде средних величин и их среднестатистических ошибок из нескольких независимых экспериментов. Различия между пробами оценивали с помощью *t*-критерия Стьюдента как достоверные при  $P < 0.05$ .

## Результаты

Исследование влияния ЛГР-пептида 562—572 и его ацилированных производных в концентрации  $10^{-7}$ — $10^{-3}$  М на базальную активность АЦ во фракциях плазматиче-

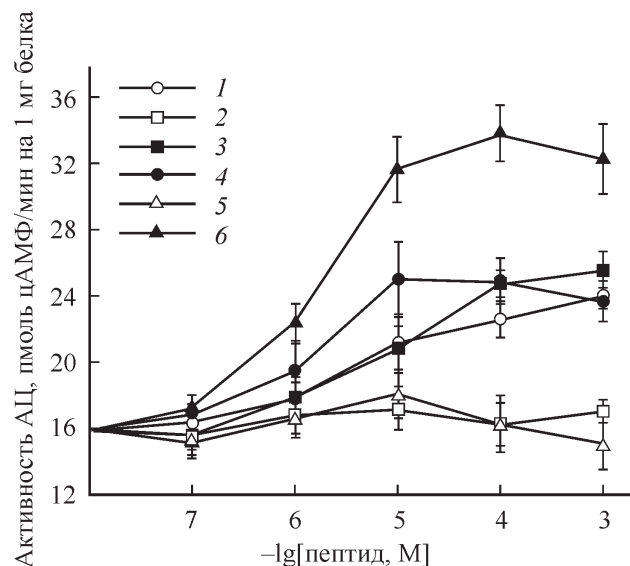


Рис. 1. Стимулирующее влияние ЛГР-пептида 562—572 и его ацилированных производных на базальную активность аденилатциклазы (АЦ) во фракциях плазматических мембран, выделенных из семенников крыс.

Кривые 1—6 — пептиды 1—6. Здесь и на рис. 3: по горизонтали — отрицательный логарифм концентрации агента (М).

ских мембран, выделенных из семенников крыс, показало, что наиболее активным среди них является пептид 6, модифицированный с C-конца пальмитатом (рис. 1). В концентрации  $10^{-5}$  М он в 2 раза повышал базальную активность АЦ, причем его стимулирующий эффект в этой концентрации приближался к максимальному и в дальнейшем при повышении концентрации до  $10^{-3}$  М существенно не менялся. Модифицированные с C-конца деканатом пептиды 3 и 4 были менее активны, чем пептид 6, а их влияние на активность АЦ по величине были сопоставимы с таковым немодифицированного пептида 1. При этом действие на АЦ пептидов 1 и 3 повышалось при увеличении концентрации с  $10^{-5}$  до  $10^{-3}$  М, в то время как эффект пептида 4, модифицированного двумя остатками декановой кислоты, достигал максимума уже при концентрации  $10^{-5}$  М (+58 %) (рис. 1). Пептиды 2 и 5, ацилированные с N-конца деканатом и пальмитатом, практически не влияли на базальную активность АЦ. Таким образом, ЛГР-пептиды, модифицированные с C-конца жирнокислотными радикалами, мимикрируют активированный гормоном рецептор и повышают базальную активность АЦ, в то время как модификация ЛГР-пептидов с N-конца в этом отношении неэффективна. Увеличение длины алифатического хвоста ацильного радикала с C<sub>9</sub> в случае деканоата до C<sub>15</sub> в случае пальмитата приводит к повышению стимулирующего действия ацилированного ЛГР-пептида на АЦ.

Изученные пептиды сравнительно слабо влияли на базальную активность АЦ во фракциях плазматических мембран, выделенных из тканей мозга и миокарда (табл. 2). Исключение составили пептиды 3 и 6, которые в концентрации  $10^{-4}$  М повышали базальную активность АЦ в мозге и миокарде. Однако здесь их эффекты были выражены намного слабее, чем в семенниках. Эти данные указывают на тканевую специфичность действия ацилированных производных ЛГР-пептида, активирующих АЦ преимущественно в той ткани (семенники), где присутствуют гомологичные им рецепторы (ЛГР).

Таблица 2

Стимуляция ЛГР-пептидом 562—572 и его ацилированными производными базальной активности АЦ во фракциях плазматических мембран семенников, миокарда и мозга крыс

Пептид, $10^{-4}$ М	Семенники	Миокард	Мозг
— (Контроль)	$15.9 \pm 0.8$	$26.9 \pm 1.2$	$24.1 \pm 1.3$
Пептид 1	$22.6 \pm 1.1$ (42)	$28.0 \pm 1.1$ (4)	$26.5 \pm 1.0$ (10)
Пептид 2	$16.3 \pm 1.3$ (3)	$26.3 \pm 0.7$	$23.1 \pm 1.5$
Пептид 3	$24.7 \pm 0.8$ (55)	$29.8 \pm 1.6$ (11)	$28.3 \pm 0.5$ (17) <sup>a</sup>
Пептид 4	$24.9 \pm 1.4$ (57)	$27.5 \pm 1.6$ (2)	$27.1 \pm 1.4$ (12)
Пептид 5	$16.3 \pm 1.7$ (3)	$28.4 \pm 1.3$ (6)	$25.7 \pm 0.6$ (7)
Пептид 6	$33.8 \pm 1.7$ (113)	$31.5 \pm 1.4$ (17) <sup>a</sup>	$29.2 \pm 1.2$ (21) <sup>a</sup>

Примечание. В скобках показано стимулирующее действие пептида (в %). <sup>a</sup>Значения активности АЦ в присутствии производных ЛГР-пептида, достоверно повышенные при  $P < 0.05$ .

В тестикулярных мембранах ХГЧ в концентрации  $10^{-8}$  М повышал базальную активность АЦ на 658 %, действуя через сопряженные с  $G_s$ -белками ЛГР, в то время как стимулирующее действие пептидного гормона РАСАР-38 ( $10^{-6}$  М) и  $\beta$ -агониста изопротеренола ( $10^{-5}$  М) было менее выражено — 279 и 136 % соответственно. Для изучения влияния ацилированных ЛГР-пептидов на стимулирующее АЦ действие гормонов тестикулярные мембраны сначала преинкубировали (5 мин,  $4^\circ\text{C}$ ) с пептидами, а затем добавляли гормон.

В присутствии  $10^{-5}$  и  $10^{-4}$  М пептида 6, модифицированного с С-конца пальмитатом, действие ХГЧ на АЦ составило 49 и 32 % от контроля (рис. 2). Значительное снижение влияния гормона наблюдали и в присутствии пептидов 3 и 4, модифицированных с С-конца деканоатом, в то время как немодифицированный пептид 1 на стимуляцию АЦ гонадотропином влиял в незначительной степени. Ингибирующее влияние пептида 4 с N- и С-концевыми деканоильными остатками на активность АЦ, вызванную ХГЧ, было сопоставимо с влиянием пептида 6. Было также обнаружено, что в присутствии ацилированных с N-конца пептидов 2 и 5, которые практически не влияли на базальную активность АЦ, стимуляция ферментом ХГЧ ослабляется, хотя и в существенно меньшей степени в сравнении с ацилированными с С-конца производными ЛГР-пептида. По своему ингибирующему влиянию на активность АЦ, вызванную гонадотропином, пептиды 2 и 5 превосходили немодифицированный пептид 1 (рис. 2). Полученные данные указывают на то, что способность ацилированных производных ЛГР-пептида 562—572 снижать действие ХГЧ на АЦ в меньшей степени зависит от локализации жирнокислотных радикалов, чем в случае стимуляции ими базальной активности АЦ.

Одной из причин ослабления стимулирующего АЦ действия ХГЧ является снижение доли высокоаффинных форм ЛГР, на что указывает сдвиг вправо концентрационной кривой стимуляции АЦ гонадотропином в присутствии пептидов 3 и 6 ( $10^{-4}$  М). Значение  $EC_{50}$  для стимулирующего влияния ХГЧ в отсутствие ацилированных ЛГР-пептидов составило 0.52 нМ, в то время как в присутствии пептидов 3 и 6 оно повышалось до 1.32 и 2.54 нМ соответственно, что указывает на снижение доли высокоаффинных форм рецептора, сопряженных с АЦ через  $G_s$ -белки (рис. 3).

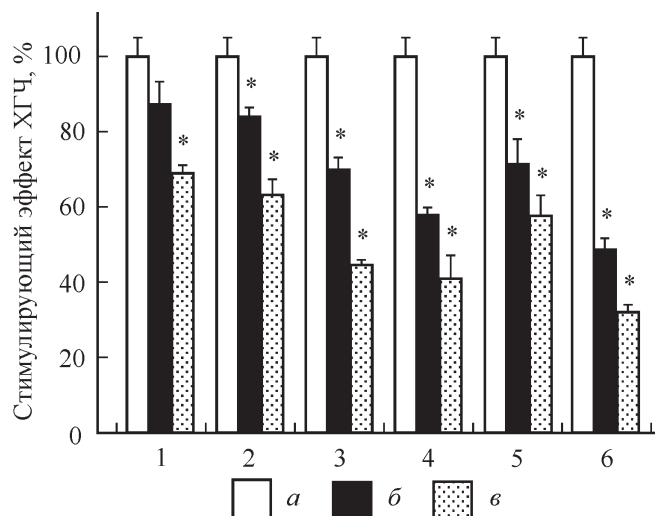


Рис. 2. Влияние ацилированных производных ЛГР-пептида 562—572 на стимуляцию АЦ хорионическим гонадотропином человека (ХГЧ) в семенниках крыс.

*a* — без пептида (контроль); *b*, *v* — пептид в концентрациях  $10^{-5}$  и  $10^{-4}$  М соответственно. Стимулирующее влияние ХГЧ ( $10^{-8}$  М) на базальную активность АЦ принято за 100 %. Данные, достоверно отличающиеся от контроля при  $P < 0.05$ , показаны звездочкой.

В пользу рецепторной специфичности действия ЛГР-пептидов свидетельствует тот факт, что в концентрации  $10^{-4}$  М, эффективной в отношении влияния ХГЧ на АЦ, они не оказывали заметного влияния на стимулирующие эффекты РАСАР-38 и изопротеренола во фракциях тестикулярных мембран (данные не представлены). Эти результаты указывают на то, что в семенниках крыс ЛГР-пептиды подавляют передачу стимулирующего АЦ

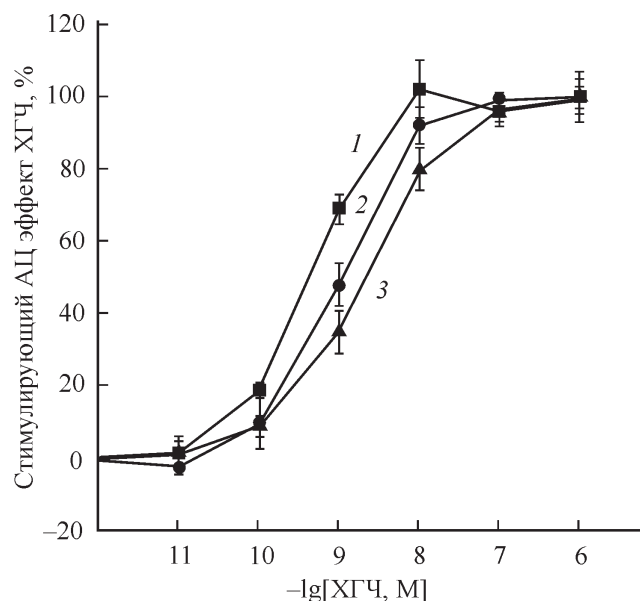


Рис. 3. Стимулирующее влияние ХГЧ на активность АЦ в присутствии пептидов 3 и 6, ацилированных с С-конца жирнокислотными радикалами.

Кривые: 1 — без пептидов (контроль), 2 — в присутствии пептида 3 ( $10^{-4}$  М), 3 — в присутствии пептида 6 ( $10^{-4}$  М). Действие гормона в концентрации  $10^{-6}$  М в каждом случае принято за 100 %.



сигнала, генерируемого ХГЧ, но не другими гормонами, активаторами АЦ.

В то же время немодифицированный пептид 1 и ацилированные деканоильными остатками пептиды 2 и 3 снижали, хотя и в незначительной степени, ингибирующее АЦ действие соматостатина ( $10^{-6}$  М), которое оценивали по влиянию гормона на стимулированную форсколином ( $10^{-5}$  М) активность фермента. Этот эффект реализуется через соматостатиновые рецепторы, сопряженные с G-белками ингибирующего типа ( $G_i$ -белки). После 5-минутной преинкубации тестикулярных мембран с пептидами 1—3 ( $10^{-4}$  М) ингибирующий эффект соматостатина составил 77, 83 и 76 % соответственно от такового в их отсутствие. Полученные данные указывают на то, что ЛГР-пептид 562—572 и его ацилированные производные могут негативно влиять на передачу ингибирующего АЦ гормонального сигнала, осуществляемую через  $G_i$ -белки.

### Обсуждение

Ранее нами и другими авторами было показано, что GPCR-пептиды, модифицированные гидрофобными радикалами (остатками жирных кислот и фрагментами трансмембранных доменов), обладают более высокой активностью как регуляторы и модуляторы гормональных сигнальных систем в сравнении с немодифицированными аналогами. Так, пальмитоилированный пептид 612—627, производный ЦПЗ рецептора тиреотропного гормона (ТТГ), многократно превосходил сходный по первичной структуре, но лишенный гидрофобного радикала пептид по способности стимулировать базальную активность АЦ и влиять на активацию фермента ТТГ (Shpakov et al., 2012). Интраназальное введение модифицированного пальмитатом пептида 612—627 приводило к повышению уровня тиреоидных гормонов и сходно с тем, как это происходит при использовании тиролиберина, рилизинг-фактора ТТГ. При этом немодифицированный аналог в условиях *in vivo* был неактивен (Шпакова и др., 2012б). Модифицированные пальмитатом пептиды, соответствующие ЦПЗ активируемого протеиназами рецептора 2-го типа (PAR2), с высокой эффективностью и селективностью ингибировали активацию PAR2 в нейтрофилах, ацинарных клетках поджелудочной железы, культуре клеток SW620 аденокарциномы толстой кишки, причем один из них — модифицированный пальмитатом с N-конца пептид 270—287 — практически полностью блокировал стимулированный агонистами PAR2 кальциевый ток (Sevigny et al., 2011; Michael et al., 2013). Пептид R(Pal)CLSSSA-VANRS (P1pal-12) и его укороченный аналог P1pal-7, соответствующие ЦПЗ рецептора PAR1, ингибировали стимуляцию PAR1-агонистами активности фосфолипазы  $C\beta$  и вызываемое ими повышение внутриклеточной концентрации  $Ca^{2+}$ , снижали агрегацию тромбоцитов, вызванную PAR1-агонистом SFLLRN-амидом, блокировали расслабляющее влияние PAR1-агониста TFLLR-амида на тонус аорты крыс (Covic et al., 2002a, 2002b; Abdel-Latif, Smyth, 2012). На основе пептида P1pal-7 был создан препарат PZ-128, который с высокой интенсивностью подавлял PAR1-зависимую агрегацию тромбоцитов и артериальный тромбоз у морских свинок и обезьян (Zhang et al., 2012). В настоящем исследовании нами показано, что ацилирование ЛГР-пептида 562—572 с C-конца пальмитоильным или деканоильным радикалам приводит к повышению их биологической активности, что иллюстри-

руется их способностью стимулировать АЦ в микромолярном диапазоне концентраций и отчетливо выраженным ингибирующим влиянием на активность АЦ, вызванную ХГЧ.

Анализ ранее полученных результатов по изучению модифицированных гидрофобными радикалами GPCR-пептидов показывает, что активными являются производные пептидов, модифицированные по аминокислотным остаткам, расположенным на границе с трансмембранным доменом. Так, активные пептиды, производные C-концевых участков ЦПЗ серотонинового рецепторов 6-го типа, рецепторов ТТГ и релаксина, были модифицированы остатком пальмитиновой кислоты с C-конца, где в полном размере рецепторе расположен шестой трансмембранный домен (Shpakov et al., 2007, 2010, 2012). В случае активных GPCR-пептидов, соответствующих N-концевой части или целой ЦПЗ, ацильный радикал был присоединен к N-концевым остаткам пептида и имитировал пятый трансмембранный домен, предшествующий ЦПЗ (Covic et al., 2002a, 2002b; Abdel-Latif, Smyth, 2012). Однако предположение о том, что локализация гидрофобного радикала в пептиде должна точно соответствовать местоположению трансмембранного домена, до сих пор не имело экспериментальных доказательств.

Нами показано, что модификация ЛГР-пептида 562—572 гидрофобными радикалами с N-конца, который соответствует середине ЦПЗ и отставлен от C-концевого остатка пятого трансмембранного домена ( $Le^{547}$ ) на 14 аминокислотных остатков, приводит к потере пептидом биологической активности. Мы полагаем, что низкая активность ацилированных с N-конца пептидов связана с тем, что модифицированный таким образом пептид фиксируется в мембране в инвертированном положении. В этом случае C-концевой сегмент пептида, который должен находиться вблизи мембраны, на границе с шестым трансмембранным доменом, оказывается локализованным дистально к мембране, а N-концевой сегмент, расположенный в середине гидрофильной ЦПЗ, напротив, фиксирован вблизи мембраны. Поскольку одним из основных механизмов действия GPCR-пептида на гормональную сигнальную систему является его специфическое взаимодействие с комплементарными участками рецептора (Shpakov, 2011a; Tressel et al., 2011; O'Callaghan et al., 2012), эффективное взаимодействие пептида с GPCR возможно только тогда, когда пептид будет ориентирован в мембране так же, как гомологичный ему участок в рецепторе. Это и подтверждается нашими данными о том, что среди изученных пептидов высокая биологическая активность была присуща только ацилированным с C-конца производным ЛГР-пептида 562—572. Таким образом, нами подтверждена гипотеза о том, что гидрофобный радикал в GPCR-пептидах мимикрирует трансмембранный домен GPCR.

Другой важный вопрос, касающийся конструирования биологически активных GPCR-пептидов, заключается в оптимизации длины гидрофобного радикала. Данные, полученные Кович и сотрудниками еще на начальном этапе исследований, свидетельствуют о том, что длина гидрофобного радикала должна превышать половину длины трансмембранного домена (Covic et al., 2002a, 2002b). При этом эффективным является как сегмент трансмембранного домена, представляющего собой гидрофобную  $\alpha$ -спираль, так и эквивалентный ему по длине и гидрофобности жирнокислотный радикал. Наиболее оптимальной оказалась модификация GPCR-пептида остатком

пальмитиновой кислоты, что приводило к его ацилированному производному, обладающим активностью *in vitro* и *in vivo* (Derian et al., 2003; Шпаков и др., 2005, 2011; Covic et al., 2007; Kaneider et al., 2007; Shpakov et al., 2007, 2010, 2011, 2012; Agarwal et al., 2008; Cisowski et al., 2011; Sevigny et al., 2011; Abdel-Latif, Smyth, 2012).

Однако синтез и очистка пальмитоильных производных GPCR-пептидов сопряжены с рядом трудностей, связанных с их низкой растворимостью в водных растворах, склонностью к образованию мицеллярных структур и прочных ассоциатов с гидрофобной фазой сорбента в процессе очистки пептидов с помощью обращенно-фазной ВЭЖХ. В результате синтез пальмитоильных производных GPCR-пептидов не всегда осуществим (Shpakov et al., 2007; O'Callaghan et al., 2012). Нами показано, что уменьшение длины алифатической цепи ацильного радикала с C<sub>15</sub> до C<sub>9</sub> приводит к ослаблению активации АЦ. Однако деканоильные производные были сопоставимы с пальмитоилированным пептидом 6 по их ингибирующему влиянию на стимуляцию фермента ХГЧ. Так, стимулирующее АЦ действие пептида 4 (10<sup>-5</sup> М), модифицированного деканоильными остатками с обоих концов, составило 60 % от такового пептида 6, а его ингибирующее влияние на стимуляцию АЦ гонадотропином было сходным с таковым пептида 6. Таким образом, уменьшение длины и гидрофобности жирнокислотного радикала хотя и снижает биологическую активность GPCR-пептида, но не столь значительно, чтобы его нельзя было использовать для разработки регуляторов гормональных сигнальных систем.

Одной из важнейших характеристик GPCR-пептидов является специфичность их действия. Нами показано, что ЛГР-пептид 562—572 и его ацилированные аналоги практически не влияют на действие гормонов, стимулирующих АЦ, которое осуществляется через негомологичные им рецепторы. Так, влияния на АЦ пептидного гормона RASAP-38, который специфически связывается с рецепторами VIP/RASAP-семейства, и изопротеренола, активирующего β-адренергические рецепторы, практически не менялись в присутствии ЛГР-пептидов. Это говорит о рецепторной специфичности их действия в отношении сопряженных с G<sub>s</sub>-белками GPCR. В то же время нами обнаружено, что ингибирующее АЦ действие соматостатина в семенниках крыс заметно снижается в присутствии пептидов 1—3, что необходимо учитывать при разработке и внедрении GPCR-пептидов. Ослабление ингибирующего влияния соматостатина на активность АЦ, как мы полагаем, связано со способностью изученных нами ЛГР-пептидов взаимодействовать с G<sub>i</sub>-белками и выключать их из сигнальной трансдукции, в основе чего лежит взаимодействие между отрицательно заряженным С-концевым сегментом Gα<sub>i</sub>-субъединицы и положительно заряженными сегментами ЛГР-пептида 562—572.

Ранее нами было показано, что некоторые поликатионные пептиды взаимодействуют с G-белками, преимущественно с G<sub>i</sub>-белками, по независимому от рецептора механизму и неспецифично ингибируют передачу ингибирующих АЦ гормональных сигналов (Шпаков и др., 2006, 2009; Shpakov, 2010). При этом пальмитоилированные ЛГР-пептиды 5 и 6 и модифицированный двумя деканоильными радикалами пептид 4 слабо влияли на эффект соматостатина, что, вероятно, связано с экранированием положительного заряда пептидной цепи значительным по размеру пальмитоильным радикалом или двумя деканоильными радикалами.

Таким образом, нами показано, что локализация, число и гидрофобность жирнокислотных радикалов являются важнейшими параметрами, которые должны учитываться и варьировать в процессе разработки ацилированных GPCR-пептидов, которые являются прототипами нового поколения лекарственных препаратов, контролирующих широкий спектр биохимических и физиологических процессов в организме. Нами установлено, что гидрофобный радикал имитирует трансмембранный домен рецептора и должен быть локализован в том локусе GPCR-пептида, который граничит с этим доменом. Укорочение длины алифатической цепи жирнокислотных радикалов с C<sub>15</sub> до C<sub>9</sub> снижает биологическую активность изученных нами ацилированных производных ЛГР-пептида. Однако это снижение не является критичным, что указывает на возможность использования деканоильных и близких им по физико-химическим характеристикам гидрофобных радикалов для модификации GPCR-пептидов, тем более что такие производные легче синтезируются и лучше растворимы в водных растворах.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты 12-03-31716 и 12-04-00351).

#### Список литературы

- Шпаков А. О., Гурьянов И. А., Кузнецова Л. А., Плеснева С. А., Захарова Е. Т., Власов Г. П., Перцева М. Н. 2006. Сравнительное исследование молекулярных механизмов влияния природных и синтетических поликатионных пептидов на активность аденилатциклазной сигнальной системы. Цитология. 48 (5) : 450—459.
- 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., 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., Шпакова Е. А., Тарасенко И. И., Деркач К. В. 2011. Рецепторная и тканевая специфичность действия пептидов, производных цитоплазматических участков рецепторов серпантинного типа. Биол. мембраны. 28 (6) : 453—462.
- Шпакова Е. А., Скворцова Е. А., Тарасенко И. И., Шпаков А. О. 2012а. Вторичная структура пептидов, производных третьей петли рецепторов серпантинного типа, и ее связь с их биологической активностью. Цитология. 54 (2) : 119—129.
- Шпакова Е. А., Шпаков А. О., Чистякова О. В., Мойсеев И. В., Деркач К. В. 2012б. Биологическая активность *in vitro* и *in vivo* пептидов, соответствующих третьей цитоплазматической петле рецептора тиреотропина. Докл. РАН. 443 (1) : 123—126.
- Abdel-Latif A., Smyth S. S. 2012. Preventing platelet thrombosis with a PAR1 pepducin. Circulation. 126 : 13—15.
- Agarwal A., Covic L., Sevigny L. M., Kaneider N. C., Lazariades K., Azabdaftari G., Sharifi S., Kuliopulos A. 2008. Targeting a metalloprotease-PAR1 signaling system with cell-penetrating pepducins inhibits angiogenesis, ascites, and progression of ovarian cancer. Mol. Cancer Ther. 7 : 2746—2757.
- Cisowski J., O'Callaghan K., Kuliopulos A., Yang J., Nguyen N., Deng Q., Yang E., Fogel M., Tressel S., Foley C. et al. 2011. Targeting protease-activated receptor-1 with cell-penetrating pepducins in lung cancer. Amer. J. Pathol. 179 : 513—523.

- Covic L., Gresser A. L., Talavera J., Swif 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.
- Covic L., Tchernychev B., Jacques S., Kuliopulos A. 2007. Pharmacology and *in vivo* efficacy of pepducins in hemostasis and arterial thrombosis. In: *Handbook of cell-penetrating peptides*. New York: Taylor & Francis. 245—257.
- Derian C. K., Damiano B. P., Addo M. F., Darrow A. L., D'Andrea M. R., Nedelman M., Zhang H. C., Maryanoff B. E., Andrade-Gordon P. 2003. Blockade of the thrombin protease-activated receptor-1 with a small molecule antagonist prevents thrombus formation and vascular occlusion in nonhuman primates. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 304 : 855—861.
- Hedin K. E., Duerson K., Clapham D. E. 1993. Specificity of receptor-G protein interactions: searching for the structure behind the signal. *Cell Signal.* 5 : 505—518.
- Kaneider N. C., Leger A. J., Agarwal A., Nguyen N., Perides G., Derian C., Covic L., Kuliopulos A. 2007. Role reversal for the receptor PAR1 in sepsis-induced vascular damage. *Nat. Immunol.* 8 : 1303—1312.
- Michael E. S., Kuliopulos A., Covic L., Steer M. L., Perides G. 2013. Pharmacological inhibition of PAR2 with the pepducin P2pal-18S protects mice against acute experimental biliary pancreatitis. *Amer. J. Physiol.* 304 : 516—526.
- 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. New York Acad. Sci.* 1180 : 1—12.
- O'Callaghan K., Kuliopulos A., Covic L. 2012. Targeting CXCR4 with cell-penetrating pepducins in lymphoma and lymphocytic leukemia. *J. Biol. Chem.* 287 : 12 787—12 796.
- Sevigny L. M., Zhang P., Bohm A., Lazarides K., Perides G., Covic L., Kuliopulos A. 2011. Interdicting protease-activated receptor-2—driven inflammation with cell-penetrating pepducins. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 108 : 8491—8496.
- Shpakov A. O. 2010. Natural and synthetic cationic peptides as regulators of hormone-sensitive signaling systems and molecular mechanisms of their action. *Current Topics Pept. Protein Res.* 11 : 1—30.
- Shpakov A. O. 2011a. GPCR-based peptides: structure, mechanisms of action and application. *Global J. Biochem.* 2 : 96—123.
- Shpakov A. O. 2011b. Signal protein-derived peptides as functional probes and regulators of intracellular signaling. *J. Amino Acids.* 2011 : 1—25. Doi: 10.4061/2011/656051.
- 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., 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., Shpakova E. A., Derkach K. V. 2012. The sensitivity of the adenylyl cyclase system in rat thyroidal and extrathyroidal tissues to peptides corresponding to the third intracellular loop of thyroid-stimulating hormone receptor. *Current Topics Pept. Protein Res.* 13 : 61—73.
- 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. 2010. 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.
- Sofikitis N., Giotitsas N., Tsounapi P., Baltogiannis D., Gianakakis D., Pardalidis N. 2008. Hormonal regulation of spermatogenesis and spermiogenesis. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 109 : 323—330.
- Tressel 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.
- Zhang P., Gruber A., Kasuda S., Kimmelstiel C., O'Callaghan K., Cox D. H., Bohm A., Baleja J. D., Covic L., Kuliopulos A. 2012. Suppression of arterial thrombosis without affecting hemostatic parameters with a cell-penetrating PAR1 pepducin. *Circulation.* 126 : 83—91.
- Ziecik A. J., Kaczmarek M. M., Blitek A., Kowalczyk A. E., Li X., Rahman N. A. 2007. Novel biological and possible applicable roles of LH/hCG receptor. *Mol. Cell. Endocrinol.* 269 : 51—60.

Поступила 29 V 2013

REGULATION OF ADENYLYL CYCLASE ACTIVITY IN THE RAT TESTES  
BY ACYLATED DERIVATIVES OF PEPTIDE 562—572 OF LUTEINIZING HORMONE RECEPTOR

E. A. Shpakova,<sup>1</sup> A. O. Shpakov<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Institute of Macromolecular Compounds RAS  
and <sup>2</sup> I. M. Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry RAS, St. Petersburg;  
<sup>2</sup> e-mail: alex\_shpakov@list.ru

One of directions of the search of hormonal signaling systems regulators is the development of peptides that correspond to the cytoplasmic regions of G-protein-coupled receptors (GPCR). Modification of the peptides with hydrophobic radicals increases their efficiency and selectivity. But currently is not studied as the activity of the peptide depends on the localization of the hydrophobic radicals, their number and the chemical nature. The aim of this work was the synthesis of modified by fatty acid radicals derivatives of peptide 562—572 corresponding to the C-terminal region of luteinizing hormone receptor (LHR), and the study of regulatory effects of the acylated LHR-peptides on the basal and hormone-stimulated activity of adenylyl cyclase (AC) in the rat tissues. To elucidate the effect of localization of hydrophobic radicals and their number the modification of peptide 562—572 only at the N- or C-terminus or at both ends was carried out. To study the effect of hydrophobicity the residues of palmitic (Pal) and decanoic (Dec) acids were selected. Using a solid phase strategy we

have synthesized unmodified peptide NDTKIAKK-Nle-A<sup>562–572</sup>-KA (1) and five of its acylated analogues, such as N[K(Dec)]DTKIAKK-Nle-A<sup>562–572</sup>-KA (2), NKDTKIAKK-Nle-A<sup>562–572</sup>-[K(Dec)]A (3), N[K(Dec)]DTKIAKK-Nle-A<sup>562–572</sup>-[K(Dec)]A (4), N[K(Pal)]DTKIAKK-Nle-A<sup>562–572</sup>-KA (5), and NKDTKIAKK-Nle-A<sup>562–572</sup>-[K(Pal)]A (6). Peptide 6 modified with palmitate at the C-terminus to a large extent increased the basal AC activity and reduced AC stimulating effect of human chorionic gonadotropin (hCG) in the testes of rats, peptides 3 and 4 modified with decanoate at the C-terminus were less effective, but exceeded in activity the unmodified peptide 1, while peptides 2 and 5 acylated at the N-terminus were little active. The action of peptides was characterized by the tissue and the receptor specificity. Thus, the modification of LHR-peptide 562–572 with fatty acid radicals at the C-terminus increases its regulatory effect on the functional activity of the adenylate cyclase system in the rat testes, indicating promising the modification of GPCR-peptides with hydrophobic radicals. These data support the hypothesis that the hydrophobic radical to be localized in the locus of GPCR-peptide, where a transmembrane domain is located in the receptor.

**Key words:** adenylyl cyclase, hydrophobic radical, gonadotropin, decanoate, palmitate, peptide, luteinizing hormone receptor, G protein-coupled receptor.

---