

ПЕПТИД 612—627 РЕЦЕПТОРА ТИРЕОТРОПНОГО ГОРМОНА И ЕГО МОДИФИЦИРОВАННЫЕ АНАЛОГИ КАК РЕГУЛЯТОРЫ АДЕНИЛАТЦИКЛАЗЫ В ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЕ КРЫС

© А. О. Шпак, ¹ Е. А. Шпакова, ² И. И. Тарасенко, ² К. В. Деркач¹

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

² Институт высокомолекулярных соединений РАН, Санкт-Петербург;
электронный адрес: alex_shpakov@list.ru

Регуляция специфической активности щитовидной железы осуществляется тиреотропным гормоном (ТТГ) через посредство рецептора ТТГ (ТТГР). Этот рецептор сопряжен с различными типами G-белков, в том числе с G_s-белками, через которые ТТГ стимулирует активность фермента аденилатциклазы (АЦ). Поскольку применение ТТГ в медицине ограничено, ведется разработка селективных регуляторов ТТГР с активностью агонистов и антагонистов. Одним из подходов к их созданию является разработка пептидов, соответствующих функционально важным участкам ТТГР, которые локализованы в его цитоплазматических петлях и вовлечены в связывание и активацию G-белков. Нами были синтезированы пептид, соответствующий С-концевому участку 612—627 третьей цитоплазматической петли ТТГР, и его производные, модифицированные остатками пальмитиновой кислоты (с N- или С-конца) или полилизинным дендримером (с N-конца), и изучено их влияние на базальную и стимулированную ТТГ активность АЦ во фракциях мембран, выделенных из щитовидной железы крыс. Наиболее активным был пептид 612—627-K(Pal)A, модифицированный пальмитатом с С-конца, где в ТТГР расположен гидрофобный трансмембранный участок. В микромолярных концентрациях он повышал активность АЦ и снижал стимулирующее АЦ влияние ТТГ. Действие 612—627-K(Pal)A было направлено на гомологичный ему ТТГР, на что указывают следующие факты: выключение G_s-белков, нижележащего компонента АЦ системы, с помощью обработки мембран холерным токсином блокировало АЦ действие пептида, и этот эффект не выявлялся в тканях, где отсутствуют ТТГР, пептид существенно не влиял на стимулирующие АЦ эффекты гормонов, действующих через другие рецепторы. Немодифицированный пептид и пептид с N-концевым дендримером значительно уступали 612—627-K(Pal)A по способности активировать АЦ в щитовидной железе, в то время как пептид, модифицированный пальмитатом с N-конца, был неактивен. В то же время пептид, модифицированный дендримером, был сопоставим с 612—627-K(Pal)A по способности ингибировать АЦ действие ТТГ, но при этом он, хотя и в меньшей степени, снижал АЦ действие других гормонов, что свидетельствует о его низкой рецепторной специфичности. Таким образом, полученные данные указывают на высокую эффективность пептида 612—627-K(Pal)A как регулятора ТТГР и на перспективы создания на его основе препаратов для контроля функций щитовидной железы в условиях патологии.

Ключевые слова: тиреотропный гормон, рецептор тиреотропного гормона, третья цитоплазматическая петля, пептид, аденилатциклаза, гетеротримерный G-белок, щитовидная железа.

Принятые сокращения: АЦ — аденилатциклаза, АЦСС — аденилатциклазная сигнальная система, ГИДФ — гуанилилимидодифосфат, КТ — коклюшный токсин, ТТГ — тиреотропный гормон, ТТГР — рецептор тиреотропного гормона, ХТ — холерный токсин, Вос — N^α-трет-бутилоксикарбонил, GPCR — G protein-coupled receptor, PACAP-38 — pituitary adenylyl cyclase-activating polypeptide-38, Pal — пальмитат.

В настоящее время заболевания щитовидной железы наряду с сахарным диабетом и болезнями сердечно-сосудистой системы являются самыми распространенными в мире. Одной из ключевых причин этих заболеваний является нарушение чувствительности этого органа к ТТГ, который вырабатывается тиреотрофами передней доли гипофиза в ответ на их стимуляцию релизинг-фактором ТТГ — тиролиберинном — и является основным регулятором синтеза и секреции тиреоидных гормонов фолликулярными клетками щитовидной железы (Farid, Szkudlinski, 2004). Изменение чувствительности этих клеток к ТТГ

может быть обусловлено мутациями в рецепторе ТТГ (ТТГР), с которым специфически связывается гормон. Эти мутации вызывают переход ТТГР в гиперактивированное, нечувствительное к действию ТТГ состояние или, напротив, снижают функциональную активность рецептора, что выражается в ослаблении передачи генерируемого ТТГ сигнала к внутриклеточным эффекторным белкам. Гиперактивация ТТГР может быть результатом связывания с ним стимулирующих антител, которые вырабатываются на внеклеточные участки рецептора. ТТГР относится к семейству сопряженных с гетеротримерными

G-белками рецепторов (G protein-coupled receptor, GPCR), которые семь раз пронизывают плазматическую мембрану и имеют семь трансмембранных участков, формирующих трансмембранный канал и соединенных между собой тремя внеклеточными и тремя цитоплазматическими петлями. Наряду с этим ТТГР имеет значительный по размеру внеклеточный N-концевой домен (эктодомен), в котором локализован сайт высокоаффинного связывания ТТГ (Szkudlinski et al., 2002). Следует отметить, что в большинстве GPCR лигандсвязывающий сайт расположен внутри трансмембранного канала, а N-концевой участок сравнительно небольшой. Эктодомен в рецепторе ТТГР выполняет функцию ингибитора активности рецептора, и его специфическое связывание с гормоном приводит к снятию ингибирующего эффекта, в результате чего наблюдается активация ТТГР и сопряженных с ним G-белков и внутриклеточных сигнальных каскадов. Большинство биологических эффектов ТТГ реализует через два типа G-белков — G_s -белки, которые стимулирующим способом сопряжены с ферментом аденилатциклазой (АЦ) и опосредуют активацию цАМФ-зависимых транскрипционных факторов, и $G_{q/11}$ -белки, через посредство которых осуществляется стимуляция фосфолипазы С, что приводит к повышению внутриклеточной концентрации катионов кальция и активации кальцийзависимых эффекторных белков (Claus et al., 2006; Kleinau et al., 2010).

Поскольку ТТГР занимает центральное место в регуляции функций щитовидной железы и всей гипоталамо-гипофизарно-тиреоидной оси, разработка селективных регуляторов этого рецептора является одной из актуальных проблем современной молекулярной эндокринологии. Применение ТТГ в качестве такого регулятора ограничено его высоким онкогенным потенциалом, быстрым нарастанием резистентности к нему тканей щитовидной железы, иммуногенностью и высокой стоимостью. В настоящее время рекомбинантный ТТГ применяется только для диагностики и кратковременной терапии дифференцированного рака щитовидной железы и для предварительной обработки пациентов с доброкачественным многоузловым зобом с целью повысить поглощение радиоактивного йода (Duntas, Cooper, 2008; Fast et al., 2009; Giusti et al., 2009).

Следует отметить, что с практической точки зрения наиболее важным представляется создание препаратов, которые обладают свойствами антагонистов ТТГР. Такие препараты могут быть использованы для лечения рака щитовидной железы, а также для блокирования стимуляции ТТГР антителами, что является непосредственной причиной болезни Грейвса и аутоиммунного тиреоидита. Одним из направлений для создания регуляторов ТТГР с активностью агонистов и антагонистов является разработка низкомолекулярных лигандов, специфически взаимодействующих с аллостерическим сайтом ТТГР, который расположен в трансмембранном канале рецептора и остается свободным при его связывании с ТТГ (Jaschke et al., 2006; Neumann et al., 2009; Шпаков, Шпакова, 2010; Gershengorn, Neumann, 2012).

Другой подход состоит в разработке селективных регуляторов ТТГР на основе синтетических пептидов, соответствующих функционально важным участкам цитоплазматических петель этого рецептора (Covic et al., 2007; Miller et al., 2009; Shpakov, Pertseva, 2007; Shpakov, 2011a, 2011b, 2013; Tressel et al., 2011). Ранее этот подход был успешно применен для создания пептидов, производ-

ных цитоплазматических петель различных типов GPCR, в том числе рецепторов лютеинизирующего и фолликулостимулирующего гормонов (Grasso et al., 1995; Mukherjee et al., 1999; Shpakov et al., 2011), которые сходны с ТТГР по структурно-функциональной организации и механизму активации (Шпаков, 2009b; Kleinau, Krause, 2009). Наиболее активными были пептиды, соответствующие второй и третьей цитоплазматическим петлям, которые играют определяющую роль во взаимодействии рецепторов с G-белками и в передаче гормонального сигнала к внутриклеточным эффекторным белкам (Шпаков, 2002, 2003). Показано также, что модификация GPCR-пептидов гидрофобными радикалами — фрагментами трансмембранных участков или сходными с ними по физико-химическим свойствам остатками жирных кислот — в значительной степени повышает эффективность и селективность их действия на гормональные сигнальные системы (Covic et al., 2002a, 2007; Shpakov, Pertseva, 2007; Miller et al., 2009; Shpakov, 2011a; Tressel et al., 2011; O'Callaghan et al., 2012). Такие липофильные производные GPCR-пептидов были названы пепдуцинами (Covic et al., 2002a). Гидрофобные радикалы мимикрируют трансмембранные участки рецептора и, как показано нами на примере пептидов, соответствующих третьей цитоплазматической петле рецептора лютеинизирующего гормона, должны располагаться в том локусе GPCR-пептида, где в полноразмерном рецепторе расположен трансмембранный участок (Шпакова, Шпаков, 2013). Гидрофобный радикал обеспечивает проникновение GPCR-пептида через плазматическую мембрану к внутриклеточным белкам-мишеням их регуляторного действия и его фиксацию в мембране, что облегчает взаимодействие GPCR-пептида с комплементарными ему участками рецептора и G-белка.

Другим подходом, облегчающим мембранный транспорт пептидов и других биомолекул, является их модификация поликатионными пептидными последовательностями — линейными либо разветвленными (Шпаков, 2009a; Shpakov, 2010). Однако исследований биологической активности таких производных GPCR-пептидов до настоящего времени не проводилось.

Цель работы состояла в изучении влияния синтезированных нами пептидов, производных С-концевого участка третьей цитоплазматической петли ТТГР, на функциональную активность аденилатциклазной сигнальной системы (АЦСС) в мембранах щитовидной железы крыс. Были изучены немодифицированный пептид Gln-Tyr-Asn-Pro-Arg-Asp-Lys-Asp-Thr-Lys-Ile-Ala-Lys-Arg-Nle-Ala⁶¹⁻⁶²⁷-амид, его производные, модифицированные С₁₆-пальмитоильными остатками, а также аналог, модифицированный с N-конца поликатионным полилизинным дендримером. Для проверки нашей гипотезы о том, что активными являются только те пепдуцины, которые имеют гидрофобный радикал, мимикрирующий трансмембранный участок, были синтезированы два пальмитоильных производных: пептид, модифицированный с С-конца, который непосредственно граничит с шестым трансмембранным участком рецептора, и пептид, модифицированный с N-конца, который не контактирует с трансмембранным участком. Присоединение дендримера к пептиду осуществляли для того, чтобы исследовать, как такая модификация, повышающая проницаемость пептида через мембрану, скажется на его биологической активности. Для оценки тканевой и рецепторной специфичности действия ТТГР-пептидов изучали их влияние

на АЦСС в мозге и миокарде, а также на стимулирующие АЦ эффекты гормонов, действие которых реализуется через рецепторы, отличные от ТТГР.

Материал и методика

В экспериментах с животными использовали 5—6-месячных самцов крыс породы Wistar, которых содержали на стандартном рационе. Эксперименты проводили в соответствии с положениями Российского национального комитета по биоэтике РАН и с международными нормами по биоэтике «Guide for the Care and Use of Laboratory Animals».

Пептиды синтезировали методом активированных эфиров с использованием *para*-метилбензгидриламиновой смолы (емкость 1.16 ммоль/г, 200—400 меш) и защищенных *N*²-*трет*-бутилоксикарбонильными (Вос) группами производных аминокислот (табл. 1). Раствор 1-оксibenзотриазолилового эфира Вос-защищенной аминокислоты, полученный с помощью *N,N*-диизопропилкарбодиимида, добавляли к пептидил-полимеру со свободными аминогруппами, используя для достижения полноты протекания реакции трехкратный избыток ацилирующего агента. Деблокирование и снятие пептида с полимерного носителя проводили с помощью 0.1 М раствора трифторметансульфокислоты в трифторуксусной кислоте в присутствии тиоанизола и этандитиола в течение 2 ч. Реакционную смесь разбавляли охлажденным диэтиловым эфиром, осадок отфильтровывали. Пептид отделяли от полимера с помощью растворения в трифторуксусной кислоте и повторного осаждения в диэтиловом эфире. Выпавший продукт отфильтровывали, промывали эфиром и высушивали под вакуумом. Для синтеза пептида 612—627-К(Pal)A в пептидную цепь с С-конца вводили остаток пальмитиновой кислоты. Для этого предварительно синтезировали пальмитоилированное производное лизина, которое получали конденсацией лизина, имеющего свободную α -аминогруппу, с пентафторфениловым эфиром пальмитиновой кислоты в присутствии триэтиламина. Пептид 3, модифицированный остатком пальмитиновой кислоты с N-конца, получали его ацилированием по свободной аминогруппе N-концевой аминокислоты с помощью 1-оксibenзотриазолилового эфира пальмитиновой кислоты. Модифицированный дендримером пептид polyLys-612—627 получали введением в пептидную цепь *ди-трет*-бутилоксикарбониллизина с целью создания на N-конце точки ветвления для

дальнейшего конструирования полилизинного дендримера.

Пептиды очищали предварительно с помощью геляпроникающей хроматографии на колонке с сефадексом G-10 в 50%-ной уксусной кислоте. Дальнейшую очистку проводили с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ. Структуру пептидов подтверждали с помощью ESI масс-спектрометрии высокого разрешения (табл. 1).

Для определения активности АЦ использовали [α -³²P]АТФ (150 ГБк/ммоль) (Всероссийское объединение «Изотоп», Россия), для разделения меченых адениновых нуклеотидов проводили колоночную хроматографию на нейтральной окиси алюминия (Sigma-Aldrich, США).

Выделение фракций мембран из щитовидной железы крыс проводили по методу (Неума, Harrison, 1984), с некоторыми модификациями. Ткани щитовидной железы промывали в охлажденном до 4 °С 40 мМ Tris-HCl-буфере (pH 7.4), который содержал 5 мМ MgCl₂ (буфер А), затем измельчали и гомогенизировали с помощью Политрона в 10 объемах буфера А, содержащего коктейль ингибиторов протеаз — 500 мкМ *O*-фенантролина, 2 мкМ пепстатина и 100 мкМ фенилметилсульфонилфторида. Гомогенат центрифугировали при 500 g в течение 15 мин. Осадок отбрасывали, а полученный супернатант центрифугировали при 10 000 g в течение 30 мин. Фракции плазматических мембран из миокарда и тканей мозга (коры, гиппокампа и стриатума) крыс получали, как описано ранее (Shpakov et al., 2010, 2011). Полученные мембраны ресуспендировали в 50 мМ Tris-HCl-буфере (pH 7.4) и использовали для определения 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 ходе ферментативной реакции, и выражали в пмоль цАМФ за 1 мин на 1 мг мембранного белка. Базальную активность фермента измеряли в отсутствие пептидов и гормонов. При изучении влияния ТТГР-пептидов на активность АЦ мембранные фракции преинкубировали с пептидом или его растворителем в течение 10 мин при 4 °С.

АДФ-рибозилирование фракций мембран щитовидной железы с бактериальными токсинами проводили, как описано ранее (Shpakov et al., 2010). Фракции мембран с концентрацией белка около 1 мг/мл инкубировали при 37 °С в течение 45 мин со 100 мкг/мл

Таблица 1

Структура пептида, соответствующего участку 612—627 ТТГР, и его аналогов, модифицированных гидрофобными радикалами и полилизинным дендримером, и данные масс-спектрометрического анализа

Структура пептида	Найдено (m/z)	Рассчитано	M, г/моль
Gln-Tyr-Asn-Pro-Arg-Asp-Lys-Asp-Thr-Lys-Ile-Ala-Lys-Arg-Nle-Ala ^{612—627} -амид (612—627, пептид 1)	950.5338 [M+2H—NH ₃] ²⁺	950.5338	1915.0750
Gln-Tyr-Asn-Pro-Arg-Asp-Lys-Asp-Thr-Lys-Ile-Ala-Lys-Arg-Nle-Ala ^{612—627} -Lys(Pal)-Ala-амид (612—627-К(Pal)A, пептид 2)	779.4752 [M+3H—NH ₃] ³⁺	779.4779	2352.4369
Pal-Gln-Tyr-Asn-Pro-Arg-Asp-Lys-Asp-Thr-Lys-Ile-Ala-Lys-Arg-Nle-Ala ^{612—627} -амид (Pal-612—627, пептид 3)	713.1056 [M+3H—H ₂ O] ³⁺	713.1070	2153.3048
Lys ₄ -Lys ₂ -Lys-Ala-Gln-Tyr-Asn-Pro-Arg-Asp-Lys-Asp-Thr-Lys-Ile-Ala-Lys-Arg-Nle-Ala ^{612—627} -амид (polyLys-612—627, пептид 4)	962.2685 [M+3H] ³⁺	962.2679	2883.7804

ХТ или 10 мкг/мл КТ в 50 мМ Tris-HCl-буфере (pH 7.8), который содержал 2 мМ MgCl₂, 1 мМ ЭДТА, 10 мМ дитиотреитол, 0.1 мМ НАД, 1 мМ НАДФ, 0.1 мМ ГИДФ (для ХТ) или ГТФ (для КТ), 1 мМ АТФ, 10 мМ тимидин и коктейль ингибиторов протеаз. АДФ-рибозилтрансферазы бактериальных токсинов предварительно активировали в присутствии 20 мМ дитиотреитола и 0.1 % SDS (для ХТ) или 1 мМ АТФ и 0.1 % Lubrol-PX (для КТ) при 37 °С в течение 15 мин. Для остановки реакции АДФ-рибозилирования суспензию мембран разводили до объема 5 мл охлажденным до 4 °С 50 мМ Tris-HCl-буфером (pH 7.5), содержащим 5 мМ MgCl₂, и центрифугировали при 37 000 g в течение 15 мин. Осадок ресуспендировали в том же буфере и использовали для определения активности АЦ. Контрольные мембраны обрабатывали так же, но без добавления токсинов.

Статистический анализ экспериментальных данных проводили с использованием метода ANOVA (Manugistics Inc., США) и представляли в виде $M \pm m$ трех независимых экспериментов. Различия между пробами оценивали с помощью *t*-критерия Стьюдента как достоверные при $P < 0.05$.

Материалы: ТТГ из гипофиза быка, питуитарный АЦ-активирующий полипептид-38 (pituitary adenylyl cyclase-activating polypeptide-38, PACAP-38), изопротеренол, серотонин, креатинфосфат, кретинфосфокиназа из мышц кролика, цАМФ, АТФ, ГТФ, гуанилилимидодифосфат (ГИДФ), коклюшный токсин (КТ), холерный токсин (ХТ), НАД, НАДФ, форсколин, тимидин, дитиотреитол и Lubrol-PX производства фирмы Sigma-Aldrich (США).

Результаты

Базальная активность АЦ в мембранах щитовидной железы крысы составила 17.7 (1.1 пмоль цАМФ/мин на 1 мг мембранного белка). Дитерпен форсколин (10^{-5} М), который непосредственно взаимодействует с каталитическим сайтом АЦ, и негидролизующий аналог ГТФ — ГИДФ (10^{-5} М), взаимодействующий с гуаниннуклеотид-связывающим сайтом α -субъединиц G-белков, повышали активность фермента на 328 и 184 % соответственно. ТТГ (10^{-8} М) стимулировал активность АЦ на 244 %, в то время как соответствующий эффект PACAP-38 (10^{-6} М) был выражен слабее и составил 68 %.

Исследование стимулирующего влияния ТТГР-пептидов на базальную активность АЦ в мембранах щито-

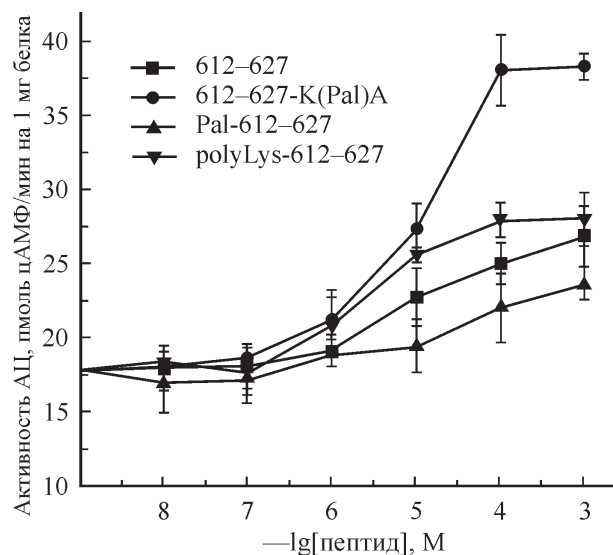


Рис. 1. Стимулирующее влияние ТТГР-пептидов на базальную активность аденилатциклазы (АЦ) в мембранах щитовидной железы крысы.

По оси абсцисс — отрицательный десятичный логарифм концентрации пептида, М; по оси ординат — активность АЦ, пмоль цАМФ/мин на 1 мг мембранного белка.

видной железы показало, что наиболее активным среди них является пальмитоилированный с С-конца пептид 612—627-K(Pal)A (рис. 1). Его максимальное стимулирующее АЦ действие составило 116 %, а значение концентрации, при которой достигался полумаксимальный эффект (EC_{50}), составило 11.3 мкМ. Максимальное АЦ действие пептида, модифицированного полилизинным дендримером, было в 2 раза меньше. Однако его стимулирующее влияние на АЦ выявлялось в более низких концентрациях, чем в случае пептида 612—627-K(Pal)A, на что указывает более низкое значение EC_{50} (4.9 мкМ). Немодифицированный пептид 612—627 существенно уступал по активности пептидам 612—627-K(Pal)A и polyLys-612—627, в то время как пептид Pal-612—627, пальмитоилированный с N-конца, практически не влиял на базальную активность АЦ.

Для оценки тканевой специфичности действия ТТГР-пептидов изучили их влияние на активность АЦСС в мозге и миокарде, где ТТГР отсутствуют или присутствуют в следовых количествах (Akamizu et al., 1990; Busut-

Т а б л и ц а 2

Влияние ТТГР-пептидов и ТТГ на базальную активность АЦ в мозге и миокарде

Добавки	Мозг	Миокард
	активность АЦ, пмоль цАМФ/мин на 1 мг мембранного белка	
Без добавок (базальная)	20.2 ± 0.5	26.8 ± 1.6
612—627, 10^{-4} М	22.1 ± 1.4 (+9)	28.2 ± 1.0 (+5)
612—627-K(Pal)A, 10^{-4} М	22.0 ± 1.1 (+9)	25.9 ± 1.8 (–)
Pal-612—627, 10^{-4} М	21.7 ± 1.3 (+7)	24.8 ± 1.3 (–)
polyLys-612—627, 10^{-4} М	22.4 ± 1.5 (+11)	29.3 ± 0.8 (+9)
ТТГ, 10^{-8} М	24.3 ± 1.3 ^a (+20)	27.0 ± 0.9 (–)

Примечание. В скобках приведены стимулирующие эффекты пептидов и ТТГ на активность АЦ в процентах (базальная активность фермента принята за 100 %). Значения представлены, как $M \pm m$ трех независимых экспериментов. ^a $P < 0.05$.

Таблица 3

**Стимулирующие эффекты ТТГР-пептидов и ТТГ на активность АЦ
в мембранах щитовидной железы, обработанных бактериальными токсинами**

Добавки	Без токсина	ХТ	КТ
	активность АЦ, пмоль цАМФ/мин на 1 мг мембранного белка		
Без добавок (базальная)	17.7 ± 1.1	53.7 ± 3.7	16.6 ± 0.8
612—627, 10 ⁻⁴ М	25.0 ± 1.4 ^a (+41)	51.2 ± 3.0 (-)	25.7 ± 2.9 ^a (+51)
612—627-K(Pal)A, 10 ⁻⁴ М	38.1 ± 2.4 ^b (+115)	56.8 ± 3.6 (+18)	39.5 ± 1.0 ^b (+129)
Pal-612—627, 10 ⁻⁴ М	22.0 ± 2.3 (+24)	48.4 ± 2.0 (-)	19.7 ± 1.4 (+18)
polyLys-612—627, 10 ⁻⁴ М	27.9 ± 1.2 ^a (+58)	55.1 ± 4.1 (+8)	28.4 ± 1.9 ^b (+67)
ТТГ, 10 ⁻⁸ М	60.9 ± 2.9 ^b (+244)	62.1 ± 5.6 (+47)	58.0 ± 2.9 ^b (+234)

Примечание. Цифры в скобках обозначают стимулирующее АЦ действие пептидов и ТТГ в процентах от базальной активности фермента в необработанных мембранах щитовидной железы (17.7 ± 1.1 пмоль цАМФ/мин на 1 мг мембранного белка), принятой за 100 %. Значения представлены, как $M \pm m$ трех независимых экспериментов. ^a — $P < 0.05$ и $P < 0.001$ соответственно.

til, Frauman, 2002; Williams, 2011). Ни один из пептидов, которые были взяты в концентрации 10⁻⁴ М, эффективной в случае мембран щитовидной железы, существенно не влиял на базальную активность АЦ во фракциях плазматических мембран тканей мозга и миокарда крыс (табл. 2). Следует отметить, что ТТГ (10⁻⁸ М) также не влиял на активность АЦ в миокарде и лишь в незначительной степени повышал ее в мозге (на 20 %). Эти данные указывают на то, что действие ТТГР-пептидов, как и ТТГ, характеризуется тканевой специфичностью и не является в тканях, где отсутствуют гомологичные пептидам рецепторы.

Для ответа на вопрос о том, на каком этапе ТТГР-пептиды оказывают свое влияние на АЦСС, исследовали участие в этом процессе G_s-белков, для чего фракции

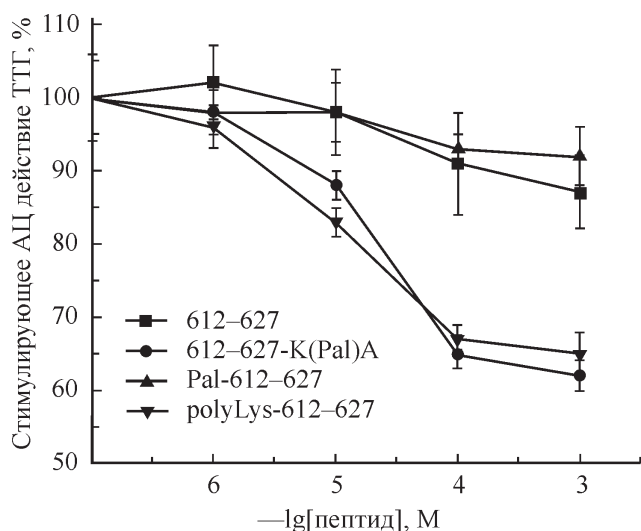


Рис. 2. Влияние ТТГР-пептидов на стимулирующее аденилатциклазу (АЦ) действие ТТГ в мембранах щитовидной железы крыс.

По оси абсцисс — отрицательный десятичный логарифм концентрации пептида, М — по оси ординат — стимулирующее АЦ действие ТТГ (10⁻⁸ М), в отсутствие пептидов принятое за 100 %.

мембран щитовидной железы крыс обрабатывали с помощью бактериальных токсинов — холерного (ХТ) и коклюшного (КТ). Обработка мембран с помощью АДФ-рибозилтрансферазы ХТ приводит к модификации боковой гуанидиновой группы аргинина в α_s-субъединице G_s-белка, что лишает его ГТФазной активности и переводит G_s-белок в перманентно активированное ГТФ-связанное состояние, в котором он нечувствителен к действию гормонов. В свою очередь обработка мембран КТ вызывает модификацию АДФ-рибозильным радикалом боковой сульфгидрильной группы цистеина, расположенного в четвертом от С-конца положении α_{i/o}-субъединицы G_{i/o}-белка, и блокирует функциональное взаимодействие G_{i/o}-белка, опосредующего ингибирование АЦ, с активированным рецептором (Freissmuth, Gilman, 1989; Guderthmann et al., 1996). Показано, что при обработке мембран ХТ активность АЦ повышалась на 203 %, что обусловлено гиперстимуляцией G_s-белков, в то время как в мембранах, обработанных КТ, активность фермента практически не менялась (табл. 3). Стимулирующее АЦ действие пептида 612—627-K(Pal)A (10⁻⁴ М) и взятого для сравнения ТТГ (10⁻⁸ М) в мембранах, обработанных ХТ, снижалось в 5—6 раз, а влияние на АЦ пептидов polyLys-612—627 и 612—627 (10⁻⁴ М) практически отсутствовало. В мембранах, обработанных КТ, стимулирующее АЦ действие ТТГР-пептидов и ТТГ сохранялось (табл. 3). Эти данные указывают на то, что ТТГР-пептиды, подобно гормону, взаимодействуют с рецепторным компонентом АЦСС, в то время как G_s-белок в этом случае выполняет функцию сопрягающего компонента, передающего стимулирующий сигнал на АЦ. Показано также, что G_{i/o}-белок, субстрат КТ, который также способен функционально сопрягаться с ТТГР, в этом процессе не участвует.

Далее изучали влияние ТТГР-пептидов на стимулирующее АЦ действие ТТГ в мембранах щитовидной железы. Показали, что пептиды 612—627-K(Pal)A и polyLys-612—627 дозозависимым способом снижают действие гормона, причем в отличие от их АЦ эффектов эффективность пептидов в этом случае является сходной (рис. 2). В концентрации 10⁻⁴ М пептиды 612—627-K(Pal)A и polyLys-612—627 снижали стимулирую-

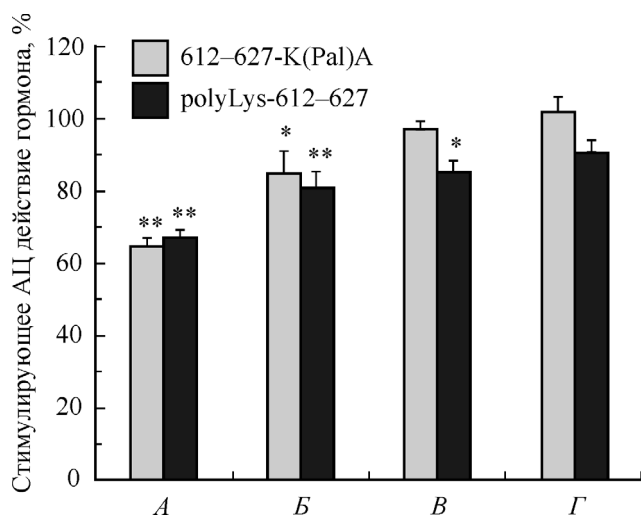


Рис. 3. Влияние пептидов 612—627-K(Pal)A и polyLys-612—627 на стимулирующее аденилатциклазу (АЦ) действие гормонов в щитовидной железе, мозге и миокарде крыс.

А — ТТГ (10^{-8} М), Б — PACAP-38 (10^{-6} М), В — серотонин (10^{-5} М), Г — изопроterenол (10^{-5} М). А, Б — щитовидная железа, В — мозг, Г — миокард. Стимулирующее АЦ влияние гормонов на активность АЦ принято за 100 %. Стимулирующее АЦ действие ТТГ и PACAP—38 в щитовидной железе составило 244 и 68 %, соответствующие эффекты серотонина в мозге и изопроterenола в миокарде — 265 и 280 %. Одна звездочка — $P < 0.05$, две — $P < 0.001$.

шее АЦ действие ТТГ на 35 и 33 % соответственно, а значения концентрации пептидов, в которых они на 50 % ингибировали это действие гормона (IC_{50}), составили 18—28 мкМ. В свою очередь ингибирующее влияние пептидов 612—627 и Pal-612—627 практически отсутствовало, что коррелирует с их низкой активностью как активаторов АЦ (рис. 2).

Для оценки рецепторной специфичности действия ТТГР-пептидов исследовали их влияние на стимулирующее АЦ действие пептидного гормона PACAP-38 в мембранах щитовидной железы, серотонина в синапсомембранных и β -агониста изопроterenола в миокардиальных мембранах, которые, так же как ТТГ, активируют АЦ через посредство сопряженных с G_s -белками GPCR. Изученные нами ТТГР-пептиды (10^{-4} М), за исключением polyLys-612—627, заметно не влияли на АЦ действие серотонина и изопроterenола. Пептид polyLys-612—627 снижал это действие на 14 и 9 %, что в абсолютном выражении составило 7.5 и 6.8 пмоль цАМФ/мин на 1 мг мембранного белка соответственно (рис. 3). Стимулирующее АЦ действие PACAP-38 в щитовидной железе в незначительной степени (на 15 и 19 %), снижалось в присутствии пептидов 612—627-K(Pal)A и polyLys-612—627 соответственно. Однако в абсолютном выражении это снижение составило только 1.8—2.3 пмоль цАМФ/мин на 1 мг мембранного белка, в то время как в случае ингибирования теми же пептидами АЦ действия ТТГ снижение в абсолютном выражении было на порядок выше — 14.2—15.1 пмоль цАМФ/мин на 1 мг мембранного белка. Полученные данные указывают на то, что изученные ТТГР-пептиды, в том числе наиболее активный пептид 612—627-K(Pal)A, специфично ингибируют осуществляемую через ТТГР стимуляцию АЦСС, но практически не затрагивают активацию этой системы гормонами, которые реализуют свое действие через другие GPCR. Исключение составляет пептид, модифицированный дендриме-

ром, в присутствии которого наблюдается снижение стимулирующего АЦ действия не только ТТГ, но и других гормонов. Это может быть связано с влиянием положительно заряженного полилизинового радикала, который, согласно нашим предыдущим исследованиям, способен взаимодействовать с G-белками и неспецифично ингибировать передачу гормональных сигналов через АЦСС (Шпаков и др., 2008).

Обсуждение

Первые данные о влиянии синтетических пептидов, соответствующих цитоплазматическим петлям GPCR, на функциональную активность гормональных сигнальных систем были получены на рубеже 1980—1990-х годов и относятся к светочувствительному белку родопсину и адренергическим рецепторам (Palm et al., 1989; Hedin et al., 1993). Позднее было показано, что GPCR-пептиды, соответствующие второй и третьей цитоплазматическим петлям рецепторов биогенных аминов, пептидных и гликопротеиновых гормонов, простагландинов и каннабиноидов, обладают биологической активностью и способны регулировать GPCR-зависимые каскады в условиях *in vitro* и *in vivo* (Covic et al., 2007; Shpakov, Pertseva, 2007; Miller et al., 2009; Dimond et al., 2011; Shpakov, 2011a). В настоящем исследовании нами были изучены пептид, соответствующий С-концевому участку 612—627 третьей цитоплазматической петли ТТГР, и его производные, модифицированные пальмитатом или полилизиновым дендримером, и обнаружено, что в микромолярных концентрациях они стимулируют активность АЦ в мембранах щитовидной железы крыс, причем их действие направлено на рецепторный компонент АЦСС и реализуется через G_s -белки. Обнаружение биологической активности у ТТГР-пептидов, в первую очередь у наиболее активного из них 612—627-K(Pal)A, подтверждает предположение о том, что С-концевой участок третьей цитоплазматической петли ТТГР является одной из ключевых детерминант, участвующих во взаимодействии рецептора с G_s -белками (Claus et al., 2006). Это предположение было сделано на основе данных сайт-направленного мутагенеза и исследований химерных ТТГР. Так, было показано, что замена неполярного остатка Ile⁶²², расположенного в С-концевом сегменте третьей петли, на другие аминокислоты приводит к полному блокированию взаимодействия мутантного ТТГР с G_s -белком (Claus et al., 2006).

Действие ТТГР-пептидов отчетливо выражено в тканях щитовидной железы, обогащенных ТТГР, и практически не выявлялось в мозге и миокарде, где эти рецепторы либо отсутствуют, либо экспрессируются в следовых количествах (Akamizu et al., 1990; Busutil, Frauman, 2002; Williams, 2011). Незначительная стимуляция ТТГР-пептидами базальной активности АЦ в мозге крыс, как мы полагаем, связана с присутствием в нейрональных клетках и астроцитах небольшого числа ТТГР (Crisanti et al., 2001).

Ранее нами было показано, что пептиды, соответствующие третьей цитоплазматической петле различных типов серотониновых рецепторов и рецептора лютеинизирующего гормона, наиболее активны в мозге и тканях репродуктивной системы, обогащенных гомологичными им рецепторами, но не влияют на АЦ в тканях, где эти рецепторы отсутствуют (Shpakov et al., 2010; Шпаков и др., 2011). Другие авторы показали, что пептиды, соответ-

вующие третьей цитоплазматической петле и С-концевому домену протеазоактивируемого рецептора 1-го типа, активны только при их действии на клетки и ткани, где экспрессируются гомологичные им рецепторы (Covic et al., 2002b; Swift et al., 2006). Эти данные указывают на непосредственное участие рецептора в механизме действия GPCR-пептида, в основе чего лежит взаимодействие последнего с комплементарными ему участками цитоплазматических петель гомологичного рецептора. Это приводит к изменению конформации петель и инициирует активацию G-белков (Covic et al., 2002a, 2007; Miller et al., 2009; Shpakov et al., 2011a).

Как отмечалось выше, пептид 612—627-K(Pal)A, в котором пальмитат расположен на С-конце, где в ТТГР расположен шестой трансмембранный участок, по активности существенно превосходит немодифицированный аналог. Ранее нами и другими авторами было показано, что GPCR-пептиды, модифицированные гидрофобными радикалами (пепдуцины), намного более активны, чем их немодифицированные аналоги (Covic et al., 2002a, 2007; Miller et al., 2009; Shpakov, 2011a, 2013). Это было продемонстрировано на примере пепдуцинов, структурно соответствующих цитоплазматическим петлям, сопряженным с G_s-белками меланокортинового рецептора 4-го типа, релаксационного рецептора RXFP1, рецептора лютеинизирующего гормона, серотонинового рецептора 6-го типа, и сопряженных с G_{q/11}- и G_i-белками протеазоактивируемых рецепторов 1-го и 2-го типов (Covic et al., 2002a, 2002b; Shpakov et al., 2007, 2010, 2011). Установлено, что локализация гидрофобного радикала в пептиде должна строго соответствовать местоположению трансмембранного участка в рецепторе (Шпакова, Шпаков, 2013). На это указывает тот факт, что пептид Pal-612—627 с пальмитоильным радикалом на N-конце, который соответствует середине третьей цитоплазматической петли и далеко отставлен от пятого трансмембранного участка, лишен специфической биологической активности.

Высокая биологическая активность пепдуцинов связана с тем, что гидрофобный радикал обеспечивает их эффективный транспорт через плазматическую мембрану и способствует заякориванию в ней, что приводит к повышению концентрации пепдуцинов вблизи рецепторов и G-белков, мишеней их регуляторного действия. Правильная локализация гидрофобного радикала обеспечивает такую ориентацию пепдуцина в мембране, которая способствует его эффективному взаимодействию с комплементарными участками гомологичного рецептора. Не исключено также, что гидрофобный радикал может проникать в трансмембранный канал рецептора, что также способствует его тесному контакту с проксимальными к мембране участками GPCR, играющими ключевую роль в связывании и активации G-белков (Tressel et al., 2011; Shpakov, 2013).

Одним из подходов, который используется для мембранного транспорта биомолекул, является присоединение к ним мембраноактивных последовательностей, в том числе поликатионных линейных или разветвленных пептидов (Шпаков, 2009a; Shpakov, 2010). Синтезированный нами пептид polyLys-612—627 был модифицирован по N-концевой аминокислоте мембраноактивным полилизинным дендримером. Выбор N-концевого сегмента для модификации был обусловлен необходимостью избежать экранирования положительно заряженного мотива Lys-Pe-Ala-Lys-Arg^{621—625}, который расположен в С-концевой части пептида и является важнейшей молекулярной де-

терминантной, ответственной за взаимодействие с G_s-белком. Несмотря на то что по способности стимулировать АЦ в мембранах щитовидной железы пептид polyLys-612—627 заметно превосходил немодифицированный аналог, он значительно уступал по этому показателю пептиду 612—627-K(Pal)A.

Нами показано, что ТТГР-пептиды снижают стимулирующее АЦ влияние ТТГ, действуя в этом случае, как аллостерические регуляторы, причем действие пептидов характеризовалось рецепторной специфичностью по отношению к гомологичному им рецептору и практически не затрагивало передачу гормонального сигнала через другие типы G_s-сопряженных рецепторов. Исключение составил пептид polyLys-612—627, который заметно снижал стимулирующее АЦ действие серотонина в мозге, изопроterenолола в миокарде и PACAP-38 в щитовидной железе. Мы полагаем, что это связано с включением в его структуру полилизинного дендримерного радикала, который, обладая сильно выраженным положительным зарядом, способен взаимодействовать с отрицательно заряженным С-концевым сегментом α_s-субъединицы G_s-белка, определяющим функциональное сопряжение последнего с рецептором. Вследствие этого нарушается передача гормонального сигнала через GPCR, что и приводит к снижению АЦ действия гормонов.

Ранее нами было показано, что поликатионные дендримеры оказывают ингибирующее влияние на передачу гормональных сигналов, реализуемых через различные типы GPCR и G-белков (Шпаков и др., 2008). Способность пептида polyLys-612—627 влиять на передачу гормонального сигнала через GPCR, отличные от ТТГР, существенно ограничивает возможности его практического применения и требует разработки других подходов для модификации GPCR-пептидов поликатионными носителями.

Высокая специфичность действия наиболее активно-го пептида 612—627-K(Pal)A в отношении ТТГР хорошо согласуется с ранее полученными данными о рецепторной специфичности других пепдуцинов. Так, пепдуцин, соответствующий третьей цитоплазматической петле серотонинового рецептора 6-го типа, снижал стимулирующее АЦ действие серотонина и в еще большей степени EMD-386088 — селективного агониста этого рецептора, но не влиял на соответствующие эффекты агонистов других типов серотонинового рецептора, также сопряженных с G_s-белками (Shpakov et al., 2010).

Пепдуцин Pal-RCLSSSAVANRS, соответствующий третьей цитоплазматической петле протеазоактивируемого рецептора 1-го типа, ингибировал усиление фосфоинозитидного обмена и повышение уровня внутриклеточного кальция, вызываемые агонистами этого рецептора, и блокировал эффекты этих агонистов на агрегацию тромбоцитов, но при этом не влиял на те же эффекты, вызываемые агонистами протеазоактивируемого рецептора 2-го типа (Covic et al., 2002b; Kubo et al., 2006). Небольшое ингибирующее влияние пептида 612—627-K(Pal)A на стимулирующее АЦ действие PACAP-38 в мембранах щитовидной железы, с нашей точки зрения, может быть связано с тем, что этот полипептидный гормон способен неспецифично взаимодействовать с ТТГР и запускать регулируемые через него цАМФ-зависимые каскады. Так, показано, что PACAP-38 повышает продукцию цАМФ в фолликулярных клетках щитовидной железы свиньи *in vitro* и повышает продукцию тироксина щитовидной железы у мышей в условиях *in vivo* (Chen et al., 1993). Наря-

ду с этим PACAP-38 ингибирует по конкурентному механизму связывание [125 I]-ТТГ с мембранами щитовидной железы, что свидетельствует о его способности занимать лигандсвязывающий сайт ТТГР, который расположен в эктодомене рецептора. Следовательно, АЦ эффект PACAP-38 в железе может реализовываться как через собственные рецепторы PAC₁ и VPAC₁, которые идентифицированы в фолликулярных и парафолликулярных клетках железы, так и через ТТГР (Fahrenkrug, Hannibal, 2011).

Таким образом, нами впервые показано, что пептиды, соответствующие С-концевому участку третьей цитоплазматической петли ТТГР крысы, стимулируют активность АЦ в мембранах щитовидной железы, действуя через ТТГР и сопряженные с ними G_s-белки, и ингибируют стимулирующий эффект ТТГ на активность АЦ. Действие ТТГР-пептидов характеризуется рецепторной специфичностью и реализуется только в щитовидной железе, где имеются гомологичные им рецепторы. Необходимость ТТГР для биологической активности пептидов обусловлена его участием в молекулярных механизмах их действия на АЦСС.

Среди изученных пептидов наиболее эффективным и селективным регулятором чувствительной к ТТГ АЦСС был пептид 612—627-К(Pal)A, модифицированный с С-конца гидрофобным остатком пальмитиновой кислоты. Этот пептид в будущем может быть использован для разработки нового поколения регуляторов гипоталамо-гипофизарно-тиреоидной оси с активностью внутриклеточных агонистов и антагонистов, контролирующих функции щитовидной железы и продукцию тиреоидных гормонов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 12-04-00351).

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. (Shpakov A. O. 2002. The molecular determinants in the serpentine type receptors, responsible for its functional coupling with the heterotrimeric G-protein. Tsitologiya. 44 (3) : 242—258.)

Шпаков А. О. 2003. Участие заряженных аминокислотных остатков цитоплазматических петель рецепторов серпантинного типа в процессе передачи гормонального сигнала. Журн. эволюц. биохим. физиол. 39 (3) : 205—217. (Shpakov A. O. 2003. Participation of charged amino acid residues of cytoplasmic loops of serpentine type receptors in the process of transmission of hormonal signal. J. Evol. Biochem. Physiol. 39 (3) : 266—280.)

Шпаков А. О. 2009a. Поликатионные пептиды как негормональные регуляторы сигнальных систем. Журн. эволюц. биохим. физиол. 45 (4) : 355—367. (Shpakov A. O. 2009a. Polycationic peptides as nonhormonal regulators of chemosignaling systems. J. Evol. Biochem. Physiol. 45 (4) : 431—446.)

Шпаков А. О. 2009b. Структурно-функциональная организация рецепторов полипептидных гормонов, содержащих LRR-повторы, и их взаимодействие с гетеротримерными G-белками. Цитология. 51 (8) : 637—649. (Shpakov A. O. 2009. Structural-functional organization of polypeptide hormones receptors containing LRR-repeats and their interaction with heterotrimeric G proteins. Tsitologiya. 51 (8) : 637—649.)

Шпаков А. О., Гурьянов И. А., Баянова Н. В., Власов Г. П. 2008. Рецептор серпантинного типа и гетеротримерный G-белок как мишени действия полилизинных дендримеров. Цито-

логия. 50 (12) : 1036—1043. (Shpakov A. O., Gur'yanov I. A., Bayanova N. V., Vlasov G. P. 2009. Receptor of the serpentine-type and heterotrimeric G protein as targets of action of polylysine dendrimers. Cell Tissue Biol. 3 (1) : 14—22.)

Шпаков А. О., Шпакова Е. А. 2010. Низкомолекулярные регуляторы рецепторов полипептидных гормонов, содержащих LGR-повторы. Биомед. химия. 56 (3) : 303—318. (Shpakov A. O., Shpakova E. A. 2010. Low-molecular regulators of polypeptide receptors containing LGR-repeats. Biochemistry (Moscow). Suppl. Ser. B: Biomed. Chem. 3 (4) : 351—360.)

Шпаков А. О., 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. (Shpakov A. O., Shpakova E. A., Tarasenko I. I., Derkach K. V. 2011. Receptor and tissue specificity of the effect of peptides corresponding to intracellular regions of the serpentine type receptors. Biochemistry (Moscow). Suppl. Ser. A: Membrane and Cell Biol. 64 (1) : 16—25.)

Шпакова Е. А., Шпаков А. О. 2013. Регуляция активности аденилатциклазы в семенниках крыс ацилированными производными пептида 562—572 рецептора лютеинизирующего гормона. Цитология. 55 (10) : 737—744. (Shpakova E. A., Shpakov A. O. 2013. Regulation of adenyl cyclase activity in rat testes by acylated derivatives of peptide 562—572 of a luteinizing hormone receptor. Cell Tissue Biol. 8 (2) : 152—159.)

Akamizu T., Ikuyama S., Saji M., Kosugi S., Kozak C., McBride O. W., Kohn L. D. 1990. Cloning, chromosomal assignment, and regulation of the rat thyrotropin receptor: expression of the gene is regulated by thyrotropin, agents that increase cAMP levels, and thyroid autoantibodies. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 87 : 5677—5681.

Busuttill B. E., Frauman A. G. 2002. TSH receptor expression in cardiac muscle tissue. J. Clin. Endocrinol. Metab. 87 : 2994.

Chen W., Inui T., Hachiya T., Ochi Y., Nakajima Y., Kajita Y. 1993. Stimulatory action of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) on thyroid gland. Biochem. Biophys. Res. Commun. 194 : 923—929.

Claus M., Neumann S., Kleinau G., Krause G., Paschke R. 2006. Structural determinants for G-protein activation and specificity in the third intracellular loop of the thyroid-stimulating hormone receptor. J. Mol. Med. (Berlin). 84 : 943—954.

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.

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.

Crisanti P., Omri B., Hughes E., Meduri G., Hery C., Clauser E., Jacquemin C., Saunier B. 2001. The expression of thyrotropin receptor in the brain. Endocrinology. 142 : 812—822.

Dimond P., Carlson K., Bouvier M., Gerard C., Xu L., Covic L., Agarwal A., Ernst O. P., Janz J. M., Schwartz T. W., Gardella T. J., Milligan G., Kuliopulos A., Sakmar T. P., Hunt S. W. 2011. G protein-coupled receptor modulation with pepducins: moving closer to the clinic. Ann. N. Y. Acad. Sci. 1226 : 34—49.

Duntas L. H., Cooper D. S. 2008. Review on the occasion of a decade of recombinant human TSH: prospects and novel uses. Thyroid. 18 : 509—516.

Fahrenkrug J., Hannibal J. 2011. Localisation of the neuropeptide PACAP and its receptors in the rat parathyroid and thyroid glands. Gen. Comp. Endocrinol. 171 : 105—113.

Farid N. R., Szkudlinski M. W. 2004. Minireview: structural and functional evolution of the thyrotropin receptor. Endocrinology. 145 : 4048—4057.

Fast S., Nielsen V. E., Bonnema S. J., Hegedus L. 2009. Time to reconsider nonsurgical therapy of benign non-toxic multinodular

- goitre: focus on recombinant human TSH augmented radioiodine therapy. *Eur. J. Endocrinol.* 160 : 517—528.
- Freissmuth M., Gilman A. G. 1989. Mutations of G α designed to alter the reactivity of the protein with bacterial toxins: substitutions of Arg¹⁸⁷ result in loss of GTPase activity. *J. Biol. Chem.* 264 : 21 907—21 914.
- Gershengorn M. C., Neumann S. 2012. Update in TSH receptor agonists and antagonists. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 97 : 4287—4292.
- Giusti M., Caputo M., Calamia I., Bagnara M., Ceresola E., Schiavo M., Mussap M., Ferone D., Minuto F., Bagnasco M. 2009. Long-term outcome of low-activity radioiodine administration preceded by adjuvant recombinant human TSH pretreatment in elderly subjects with multinodular goiter. *Thyroid Res.* 2 : 6.
- Grasso P., Leng N., Reichert L. E. 1995. A synthetic peptide corresponding to the third cytoplasmic loop (residues 533 to 555) of the testicular follicle-stimulating hormone receptor affects signal transduction in rat testis membranes and in intact cultured rat Sertoli cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* 110 : 35—41.
- Gudermann T., Kalkbrenner F., Schultz G. 1996. Diversity and selectivity of receptor-G protein interaction. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 36 : 429—460.
- Hedin K. E., Duerson K., Clapham D. E. 1993. Specificity of receptor-G protein interactions: searching for the structure behind the signal. *Cell. Signall.* 5 : 505—518.
- Heyma P., Harrison L. C. 1984. Precipitation of the thyrotropin receptor and identification of thyroid autoantigens using Graves' disease immunoglobulins. *J. Clin. Invest.* 74 : 1090—1097.
- Jäschke H., Neumann S., Moore S., Thomas C. J., Colson A. O., Costanzi S., Kleinau G., Jiang J. K., Paschke R., Raaka B. M., Krause G., Gershengorn M. C. 2006. A low molecular weight agonist signals by binding to the transmembrane domain of thyroid-stimulating hormone receptor (TSHR) and luteinizing hormone/chorionic gonadotropin receptor (LHCGR). *J. Biol. Chem.* 281 : 9841—9844.
- Kleinau G., Jaeschke H., Worth C. L., Mueller S., Gonzalez J., Paschke R., Krause G. 2010. Principles and determinants of G-protein coupling by the rhodopsin-like thyrotropin receptor. *PLoS ONE.* 5 : e9745. doi: 10.1371/journal.pone.0009745.
- Kleinau G., Krause G. 2009. Thyrotropin and homologous glycoprotein hormone receptors: structural and functional aspects of extracellular signaling mechanisms. *Endocrinol. Rev.* 30 : 133—151.
- Kubo S., Ishiki T., Doe I., Sekiguchi F., Nishikawa H., Kawai K., Matsui H., Kawabata A. 2006. Distinct activity of peptide mimetic intracellular ligands (pepducins) for proteinase-activated receptor-1 in multiple cells/tissues. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1091 : 445—459.
- 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.
- Mukherjee S., Palczewski K., Gurevich V. V., Hunzicker-Dunn M. 1999. β -arrestin-dependent desensitization of luteinizing hormone/choriogonadotropin receptor is prevented by a synthetic peptide corresponding to the third intracellular loop of the receptor. *J. Biol. Chem.* 274 : 12 984—12 989.
- Neumann S., Huang W., Titus S., Krause G., Kleinau G., Alberobello A. T., Zheng W., Southall N. T., Inglese J., Austin C. P., Celi F. S., Gavrilova O., Thomas C. J., Raaka B. M., Gershengorn M. C. 2009. Small molecule agonists for the thyrotropin receptor stimulate thyroid function in human thyrocytes and mice. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 106 : 12 471—12 476.
- 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.
- Palm D., Munch G., Dees C., Heckman M. 1989. Mapping of β -adrenoreceptor coupling domains to G $_s$ -protein by site-specific synthetic peptides. *FEBS Lett.* 254 : 89—93.
- 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. 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 : DOI : 10.4061/2011/656051.
- Shpakov A. O. 2013. Peptides corresponding to intracellular regions of GPCR as a new generation of selective drugs. *Int. J. Biochem. Res. Rev.* 3 (4) : 380—400.
- 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 (Grachevsky N. O., ed.)*. New York: Nova Sci. Publ., Inc. 45—93.
- 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.
- 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.
- Szkudlinski M. W., Fremont V., Ronin C., Weintraub B. D. 2002. Thyroid-stimulating hormone and thyroid-stimulating hormone receptor structure-function relationships. *Physiol. Rev.* 82 : 473—502.
- 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.
- Williams G. R. 2011. Extrathyroidal expression of TSH receptor. *Ann. Endocrinol. (Paris).* 72 : 68—73.

PEPTIDE 612—627 OF THYROTROPIN RECEPTOR AND ITS MODIFIED DERIVATIVES
AS THE REGULATORS OF ADENYLYL CYCLASE IN THE RAT THYROID GLAND*A. O. Shpakov,¹ E. A. Shpakova,² I. I. Tarasenko,² K. V. Derkach¹*¹ I. M. Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, RAS
and ² Institute of Macromolecular Compounds RAS, St. Petersburg;
e-mail: alex_shpakov@list.ru

The regulation of the specific activity of the thyroid gland is carried by thyroid-stimulating hormone (TSH) through TSH receptor (TSHR). This receptor is coupled to different types of G-proteins, including the G_s-proteins, through which TSH stimulates the enzyme adenylyl cyclase (AC). As the application of TSH in medicine is limited, the development of selective regulators of TSHR with agonistic and antagonistic activity is carried out. One of the approaches to their creation is to develop the peptides corresponding to functionally important regions of TSHR which are located in its intracellular loops (ICL) and are involved in the binding and activation of G-proteins. We have synthesized peptide corresponding to the C-terminal region 612—627 of the third ICL of TSHR and its derivatives modified by palmitic acid residue (at the N- or the C-terminus) or by polylysine dendrimer (at the N-terminus), and studied their effect on the basal and TSH-stimulated AC activity in the membrane fraction isolated from the rat thyroid. The most active was peptide 612—627-K(Pal)A modified by palmitate at the C-terminus, where in TSHR the hydrophobic transmembrane region is located. At the micromolar concentrations the peptide increased AC activity and reduced the AC stimulating effect of TSH. The action of the 612—627-K(Pal)A has been directed onto TSHR homologous to it, as indicated by the following facts: 1) the inhibition of G_s-protein, the downstream component of AC system, by treating the membranes with cholera toxin led to the blocking of peptide AC effect, 2) this effect was not detected in the tissues where no TSHR, 3) the peptide did not significantly affect the AC stimulating effects of hormones acting via other receptors. The unmodified peptide and the peptide with N-terminal dendrimer are far behind the 612—627-K(Pal)A in their ability to activate AC in the thyroid, while the peptide modified by palmitate at the N-terminus was inactive. At the same time, the peptide modified by dendrimer was comparable to the 612—627-K(Pal)A in the ability to inhibit the AC effect of TSH, but, although to a lesser extent that it decreased the AC effects of other hormones, demonstrating the low receptor specificity. Thus, these data point to the high efficiency of peptide 612—627-K(Pal)A, as a regulator of TSHR, and the prospects of creating the drugs based on it to control the thyroid functions in pathology.

Key words: thyroid-stimulating hormone, thyroid-stimulating hormone receptor, the third cytoplasmic loop, peptide, adenylyl cyclase, heterotrimeric G-protein, the thyroid gland.