

N-ПАЛЬМИТОИЛИРОВАННЫЙ ПЕПТИД 232—245 МЕЛАНКОРТИНОВОГО РЕЦЕПТОРА 4-ГО ТИПА КРЫСЫ С АКТИВНОСТЬЮ АГОНИСТА

© A. O. Шпаков,^{1,*} E. A. Шпакова,² И. И. Тарасенко,² К. В. Деркач¹

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

² Институт высокомолекулярных соединений РАН, Санкт-Петербург;

* электронный адрес: alex_shpakov@list.ru

Меланокортиновые рецепторы 4-го типа (M_4P) играют ключевую роль в регуляции пищевого поведения, нейроэндокринных функций, энергетического обмена. Изменения их функциональной активности приводят к ожирению, метаболическому синдрому, депрессии и ментальным расстройствам, что делает поиск селективных регуляторов M_4P одной из актуальных проблем молекулярной эндокринологии. Перспективным направлением в разработке таких регуляторов является конструирование пептидов, соответствующих функционально важным участкам M_4P . Цель работы состояла в изучении влияния впервые синтезированного нами N-пальмитоилированного пептида Palm-Thr-Gly-Thr-Ile-Arg-Gln-Gly-Ala-Asn-(Nle)-Lys-Gly-Ala-Ile^{232—245}-амида (Palm-232—245), структурно соответствующего C-концевой половине третьей цитоплазматической петле (ЦП-3) M_4P крысы, на функциональную активность аденилатциклазной сигнальной системы (АЦСС) во фракциях синаптосомальных мембран, выделенных из мозга самцов крыс. Показано, что в концентрации 10^{-7} М и выше пептид Palm-232—245 стимулирует базальную активность аденилатциклазы (АЦ) в синаптосомных мембранах и повышает в них базальный уровень ГТФ-связывания со значениями EC_{50} 71 и 267 нМ соответственно. При совместном действии низких концентраций пептида (10^{-7} — 10^{-6} М) и агонистов M_4P — α -меланоцитстимулирующего гормона (α -МСГ) и THIQ (10^{-7} М) — наблюдали аддитивность их стимулирующего действия на АЦ, которая исчезала при повышении концентрации пептида до 10^{-4} — 10^{-3} М. В синаптосомных мембранах, преинкубированных с пептидом (10^{-5} М), максимальное стимулирующее влияние M_4P -агонистов на активность АЦ было ниже, чем в контроле, а значения EC_{50} , напротив, повышались. В случае совместного действия пептида и гормонов (γ -МСГ, серотонина и PACAP-38), которые активируют АЦ через другие рецепторы, аддитивность их стимулирующих эффектов сохранялась во всем диапазоне концентраций пептида. Действие пептида не выявлялось в миокардных и тестикularных мембранных, где отсутствуют гомологичные ему M_4P . Таким образом, N-пальмитоилированный пептид Palm-232—245 специфично активирует АЦСС в мозге крыс, действуя как внутриклеточный M_4P -агонист, что может быть использовано для создания препаратов, стимулирующих меланокортиновую систему мозга и зависимые от нее физиологические процессы.

Ключевые слова: аденилатциклаза, агонист, гетеротримерный G-белок, меланокортиновый рецептор, меланоцитстимулирующий гормон, мозг, пептид, третья цитоплазматическая петля.

Принятые сокращения: АЦ — аденилатциклаза, АЦСС — аденилатциклазная сигнальная система, M_4P и M_3P — меланокортиновые рецепторы 3-го и 4-го типов, α -МСГ и γ -МСГ — α - и γ -меланоцитстимулирующие гормоны, ЦП-3 — третья цитоплазматическая петля, Вос-группа — N^{α} -трет-бутилоксикарбонильная группа, G_s - и G_i -белки — G-белки стимулирующего и ингибирующего типов, GppNHp — β , γ -имидогуанозин-5'-трифосфат, GPCR — G protein-coupled receptor, PACAP-38 — pituitary adenyl cyclase-activating polypeptide-38, THIQ — N [(1*R*)-1-[(4-хлорофенил)метил]-2-[4-циклогексил-4-(1*H*-1,2,4-триазол-1-илметил)-1-пиперидинил]-2-оксоэтил]-1,2,3,4-тетрагидро-3-изохинолинкарбоксамид.

Одним из ключевых регуляторов энергетического обмена, аппетита и метаболизма являются аркуатные ядра медиобазального гипоталамуса, в нейронах которых экспрессируются как орексигенные полипептиды, повышающие аппетит, в первую очередь агутти-подобный пептид, эндогенный антагонист меланокортиновых рецепторов (MP) 4-го типа (M_4P), так и анорексигенные пептиды, понижающие аппетит, включая проопиомеланокортин, предшественник адренокортикотропного гормона и α - и γ -меланоцитстимулирующих гормонов (α - и γ -МСГ).

В мозге α -МСГ связывается с двумя структурно близкими рецепторами — M_4P и MP 3-го типа (M_3P), а γ -МСГ является агонистом M_3P . Установлено, что M_4P экспрессируются только в ЦНС (гипоталамусе, таламусе, коре и стволе), в то время как M_3P — еще и в некоторых периферических тканях (желудке и плаценте). M_4P и M_3P относятся к суперсемейству рецепторов, функционально сопряженных с гетеротримерными G-белками (G protein-coupled receptor, GPCR). Они семь раз пронизывают плазматическую мембрану и имеют три цитоплазматиче-

ские петли (ЦП), из которых третья (ЦП-3) играет ключевую роль в связывании и активации G-белков.

Основной мишенью агонистов M_4P и M_3P является аденилатциклазная сигнальная система (АЦСС), включающая в себя MP, G-белок стимулирующего типа (G_s) и фермент аденилатциклазу (АЦ), катализирующую образование универсального вторичного посредника цАМФ (Shinyama et al., 2003). Мутации в M_4P , вызывающие снижение их функциональной активности, а также избыточная продукция агути-подобного пептида, M_4P -антагониста, приводят к нарушению пищевого поведения, дислипидемии, ожирению и метаболическому синдрому, в то время как гиперактивация этих рецепторов может стать причиной депрессивных и тревожных состояний (Nogueiras et al., 2007; Rene et al., 2010; Xu et al., 2011; Okubo, Chaki, 2013). Несмотря на то что в настоящее время разработано сравнительно много агонистов M_4P , различающихся по химической природе и механизмам действия, ни один не нашел широкого применения в клинике и не показал высокой эффективности при лечении пациентов с ожирением и метаболическими расстройствами, вызванными дисфункциями в M_4P -зависимых сигнальных путях (Fani et al., 2014). Вследствие этого разработка новых эффективных и селективных регуляторов M_4P по-прежнему остается одной из актуальных задач клеточной биологии и эндокринологии.

Одним из подходов для создания селективных регуляторов гормональных систем является разработка их внутриклеточных агонистов и антагонистов на основе синтетических пептидов, структурно соответствующих цитоплазматическим участкам GPCR, которые ответственны за их функциональное взаимодействие с гетеротримерными G-белками, β -аррестинами и другими внутриклеточными белками, компонентами сигнальных каскадов.

В большинстве GPCR наибольшее значение для сигнальной трансдукции имеют проксимальные к мембране участки ЦП-3, вследствие чего именно их, как правило, используют для конструирования GPCR-пептидов (Шпаков, 1996, 2002). Еще в 2002 г. группой Атана Кулиопулоса было обнаружено, что модификация GPCR-пептидов гидрофобными радикалами, сопоставимыми по размеру и липофильности с трансмембранными участками GPCR, повышает их биологическую активность (Covic et al., 2002). В основе этого лежит способность липофильных производных GPCR-пептидов проникать через плазматическую мембрану, засыпаясь в ней и эффективно взаимодействовать с внутриклеточными белками-мишнями, основными из которых являются гомологичный пептид рецептор и сопряженный с ним гетеротримерный G-белок (Miller et al., 2009; Shpakov, 2011; Tressel et al., 2011; O'Callaghan et al., 2012a). Ранее нами и другими авторами были синтезированы и изучены липофильные производные GPCR-пептидов, которые соответствуют цитоплазматическим участкам протеиназо-активируемых рецепторов 1-го, 2-го и 4-го типов, хемокиновых рецепторов CXCR1, CXCR2 и CXCR4, рецептора сфингозин-1-фосфата 3-го типа, серотонинового рецептора 6-го типа, релаксинового рецептора RXFP1, рецепторов лютеинизирующего и тиреотропного гормонов, рецептора N-формилпептида 1-го и 2-го типов (Covic et al., 2002; Licht et al., 2003; Shpakov et al., 2007, 2010; Agarwal et al., 2010; Jamieson et al., 2012; O'Callaghan et al., 2012b; Шпакова, Шпаков, 2013; Forsman et al., 2013; Шпаков и др., 2014; Shpakov, Shpakova, 2014a).

Цель настоящего исследования состояла в синтезе N-пальмитоилированного пептида Palm-Thr-Gly-Thr-Ile-Arg-Gln-Gly-Ala-Asn-(Nle)-Lys-Gly-Ala-Ile^{232–245}-амида (Palm-232—245), который по первичной структуре соответствует C-концевой половине ЦП-3 M_4P , и в изучении его влияния на базальную и стимулированную агонистами MP активность АЦСС во фракциях плазматических мембран мозга крыс. Для оценки тканевой и рецепторной специфичности действия пептида Palm-232—245 выясняли его влияние на активность АЦСС в миокарде и семенниках, где отсутствуют M_4P , гомологичные пептиду, а также на стимуляцию АЦ M_3P -агонистом γ -МСГ, серотонином и гипофизарным АЦ-активирующим полипептидом-38 (pituitary adenylyl cyclase-activating polypeptide-38, PACAP-38), действующими через сопряженные с G_s -белками GPCR, отличные от M_4P .

Материал и методика

Реактивы. Использовали аминокислоты, модифицированные N^{α} -трет-бутилоксикарбонильными (Вос) защитными группами, креатинфосфат, кретинфосфокиназу из мышц кролика, цАМФ, АТФ, ГТФ, β , γ -имидогуанозин-5'-трифосфат (GppNHp), дитиотреитол, дитиоэтиленгликоль, тиоанизол, Lubrol-PX, *N,N*-диизопропилкарбодимид, трифторметансульфонату, а также гормональные агенты — α -МСГ, M_3P -агонист γ -МСГ, серотонин и PACAP-38 производства фирмы Sigma-Aldrich (США); M_4P -агонист *N*—[(1*R*)-1-[(4-хлорофенил)метил]-2-[4-циклогексил-4-(1*H*-1,2,4-триазол-1-илметил)-1-пиперидинил]-2-оксоэтил]-1,2,3,4-тетрагидро-3-изохинолинкарбоксамид (THIQ) производства фирмы Tocris Bioscience (Великобритания). Для определения активности АЦ использовали [α -³²P]АТФ (150 ГБк/ммоль) (Всерегиональное объединение Изотоп, Россия), для разделения меченых нуклеотидов проводили колоночную хроматографию на нейтральной окиси алюминия II степени активности по Брокману (Sigma-Aldrich, США). Для определения GppNHp-связывания G-белков — [⁸⁻³H]-GppNHp (18.5 ГБк/ммоль) (Amersham, Англия) и нитроцеллюлозные фильтры тип НА, 0.45 мкм (Millipore, США).

Синтез пептида. N-пальмитоилированный пептид Palm-Thr-Gly-Thr-Ile-Arg-Gln-Gly-Ala-Asn-(Nle)-Lys-Gly-Ala-Ile^{232–245}-амид (Palm-232—245), который структурно соответствует ЦП-3 M_4P крысы, был синтезирован с помощью стандартного твердофазного метода с использованием *пара*-метилбензидриламинной смолы (200—400 меш) с емкостью 1.16 ммоль/г и Вос-замещенных производных аминокислот. Химически лабильный остаток Met²⁴¹ был заменен близким ему по физико-химическим свойствам норлейцином. Присоединение аминокислотных остатков к растущей полипептидной цепи осуществляли карбодиимидным методом с помощью дизопропилкарбодиимида в присутствии 1-гидроксибензотриазола. Для введения пальмитоильного остатка в молекулу пептида пальмитиновую кислоту растворяли в смеси, содержащей 50 % N-метилпирролидона и 50 % метиленхлорида, и осуществляли ее конденсацию со свободной N-концевой аминогруппой прикрепленного к смоле пептида в течение ночи. Деблокирование и удаление пептида с полимера осуществляли с помощью трифторметансульфонаты (1 мл) в трифтруксусной кислоте (10 мл), содержащей 1 мл тиоанизола

и 0.5 мл этандитиола (все количества — на 1 г пептидил-полимера), в течение 2 ч. Реакционную смесь разбавляли охлажденным диэтиловым эфиром, осадок отфильтровывали, пептид отделяли от полимера, растворяя его в трифтормукусной кислоте, повторно осаждали диэтиловым эфиром. Выпавший осадок отфильтровывали, промывали эфиром и сушили под вакуумом. Для очистки пептида сначала использовали гельпроникающую хроматографию на Sephadex G-10, затем обращенно-фазовую ВЭЖХ на колонке Vydac C18 в системе вода-ацетонитрил-0.1%-ная трифтормукусная кислота с линейным возрастающим градиентом концентрации ацетонитрила, что позволило получить пептид с содержанием основного вещества выше 95 %. Структура пептида была подтверждена с помощью ESI масс-спектрометрии высокого разрешения, по результатам которой экспериментальное значение M_r для пептида Palm-232—245 составило 1654.0041 (расчитанная M_r равна 1653.9963).

Для биологических экспериментов использовали 5-месячных самцов крыс породы Wistar, которых содержали в стандартных условиях и на стандартном рационе. Выделение фракций синаптосомных мембран из тканей мозга (коры, гиппокампа и стриатума) проводили, как описано ранее (Shpakov et al., 2010). Ткани мозга промывали в охлажденном 50 mM Tris-HCl-буфере (pH 7.4), который содержал 5 mM MgCl₂, 10 % сахарозы и ингибиторы протеаз, затем измельчали и гомогенизировали при помощи Политрона в том же буфере при охлаждении до 4 °C. Полученный гомогенат центрифугировали (1000 g, 10 мин), осадок отбрасывали, супернатант повторно центрифугировали (9000 g, 20 мин), осадок ресуспендировали в том же буфере, но без сахарозы и снова центрифугировали (35 000 g, 10 мин). Осажденные мембранные ресуспендировали в 50 mM Tris-HCl буфере (pH 7.4), содержащем 5 mM MgCl₂, и использовали для определения активности АЦ и GppNHP-связывания. Миокардные и testiculärные мембранные, которые использовали для оценки тканевой специфичности действия пептида, выделяли из миокарда и семенников крыс, как описано ранее (Шпаков и др., 2011).

Активность АЦ определяли радиоизотопным методом, как описано ранее (Shpakov et al., 2012). Реакционная смесь (общий объем 50 мкл) содержала 50 mM Tris-HCl-буфера (pH 7.5), 5 mM MgCl₂, 0.1 mM цАМФ, 1 mM АТФ, 37 КБк [α -³²P]-АТФ, 20 mM креатинфосфата, 0.2 мг/мл креатинфосфоркиназы и 25—50 мкг мембранныго белка. Реакцию проводили в течение 12 мин при 37 °C. Активность АЦ выражали в пмоль цАМФ/мин на 1 мг мембранныго белка. Базальную активность фермента определяли в отсутствие гормонов и негормональных агентов.

Определение ГТФ-связывающей способности гетеротримерных G-белков проводили с помощью их мечения негидролизуемым аналогом ГТФ — [8-³H]-GppNHP, как описано ранее (Shpakov et al., 2010). Реакционная смесь (общий объем 50 мкл) содержала 25 mM HEPES-Na-буфер (pH 7.4), 1 mM ЭДТА, 5 mM MgCl₂, 100 mM NaCl, 1 mM дигиотреитола, 0.1 % бычьего сывороточного альбумина, 1 мкМ немеченого GppNHP и 18—37 КБк [8-³H]-GppNHP. Реакцию проводили в течение 45 мин при 30 °C. После инкубации в реакционную смесь добавляли 100 мкл 20 mM K⁺/Na⁺-fosfатного буфера (pH 8.0), содержащего 0.1 % Lubrol-PX. Образцы фильтровали под вакуумом через нитроцеллюлозные

фильтры с размером пор 0.45 мкм (тип НА), трижды промывали тем же буфером (по 2 мл) и сушили. Связанную с фильтром радиоактивность определяли в сцинтилляторе с помощью счетчика LKB 1209/1215 RackBeta (Швеция). Для определения неспецифического связывания в пробы добавляли 10 мМ GppNHP. Специфическое связывание GppNHP с G-белками определяли как разность между общим и неспецифическим связыванием. Уровень ГТФ-связывания выражали в пмоль [8-³H]-GppNHP на 1 мг мембранныго белка. Для изучения влияния пептида на эффекты гормонов относительно активности АЦ и уровень ГТФ-связывания мембранные инкубировали с ним в течение 10 мин при 4 °C, затем добавляли инкубационную смесь и гормоны.

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

Результаты

Базальная активность АЦ и базальный уровень ГТФ-связывания гетеротримерных G-белков во фракциях синаптосомных мембранных мозга крыс составили соответственно 27.2 ± 1.3 пмоль цАМФ/мин и 4.5 ± 0.1 пмоль [8-³H]-GppNHP на 1 мг мембранныго белка. Пептид Palm-232—245, действуя в диапазоне концентраций от 10^{-7} до 10^{-3} M, повышал базальную активность фермента АЦ во фракциях синаптосомных мембранных мозга крыс (рис. 1). Концентрация пептида, при которой стимулирующий эффект (67 %) был максимальным, составляла 10^{-5} M, в то время как дальнейшее повышение концентрации пептида до 10^{-4} и 10^{-3} M, приводило к небольшому ослаблению его действия. Пептид также повышал базальный уровень ГТФ-связывания, причем в этом случае при действии пептида в концентрациях выше 10^{-5} M ослабления стимулирующего эффекта не наблюдали (рис. 1). Значения EC₅₀ и соответствующая концентрация пептида, при которой он оказывает полумаксимальное стимулирующее влияние на активность АЦ и уровень ГТФ-связывания, составили 71 и 267 нM соответственно.

Агонисты M₃P и M₄P, серотонин и PACAP-38 оказывали отчетливо выраженное стимулирующее влияние на АЦСС в синаптосомных мембранных мозга крыс. Неселективный MP-агонист α -МСГ (10^{-7} M), высокоселективный M₄P-агонист THIQ (10^{-7} M), M₃P-агонист γ -МСГ (10^{-7} M), серотонин (10^{-5} M) и PACAP-38 (10^{-6} M) повышали базальную активность АЦ на 173, 125, 76, 368 и 124 % соответственно. В тех же концентрациях эти агенты повышали уровень ГТФ-связывания на 81, 63, 44, 163 и 57 % соответственно. Далее изучали, как преинкубация синаптосомных мембранных мембранных с пептидом влияет на стимулирующие эффекты перечисленных выше гормонов.

В мембранных, преинкубированных с пептидом в низкой концентрации (10^{-7} — 10^{-6} M), стимулирующие АЦ эффекты α -МСГ и THIQ (10^{-7} M), которые действуют через гомологичные пептиду M₄P, сохранялись. Отмечалась аддитивность стимулирующего действия этих агонистов и пептида. При повышении концентрации пептида до 10^{-5} — 10^{-3} M аддитивность исчезала, причем в присутствии

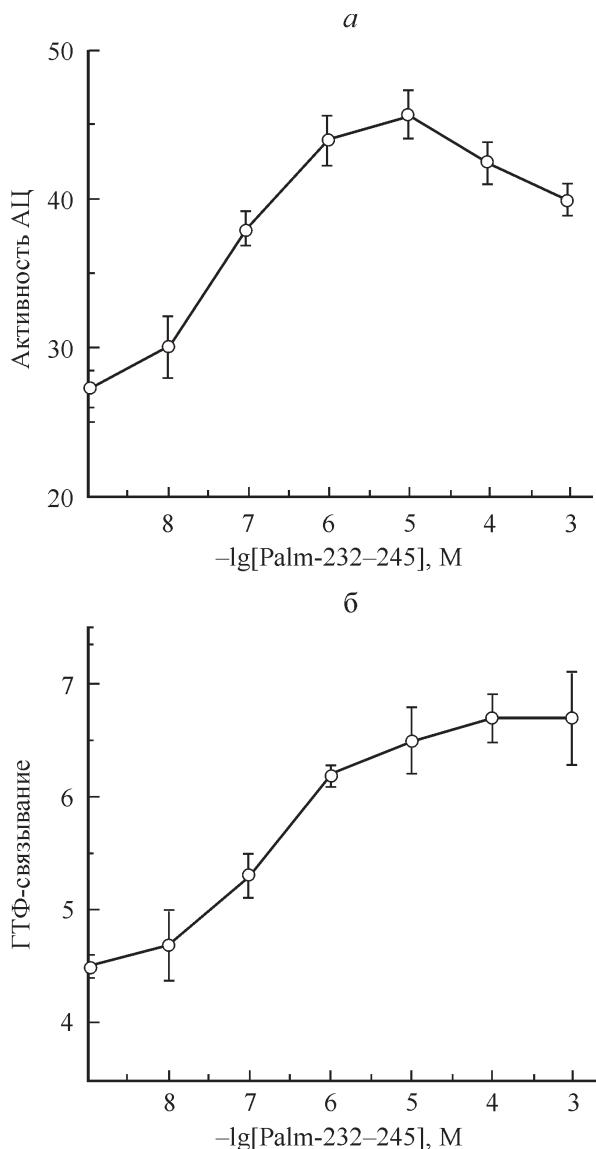


Рис. 1. Влияние пептида Palm-232—245 на базальную активность аденилатциклазы (АЦ) (а) и специфическое ГТФ-связывание гетеротримерных G-белков (б) в синаптосомных мембранных мозга крыс.

По горизонтали — отрицательный логарифм концентрации пептида М. Значения представлены как среднее значение и их ошибка. Активность АЦ выражена в pmоль цАМФ/мин на 1 мг мембранных белка, ГТФ-связывание — в pmоль [8-3H]GppNHp на 1 мг мембранных белка.

вии 10^{-3} М пептида стимуляция АЦ при действии α -МСГ и ТНIQ снижалась (табл. 1). При совместном влиянии пептида Palm-232—245 и M_4P -агонистов на уровень ГТФ-связывания была выявлена качественно сходная картина. При повышении концентрации пептида до 10^{-5} М аддитивность стимулирующего влияния пептида Palm-232—245 и M_4P -агонистов на ГТФ-связывание не выявлялась (табл. 2).

Показано также, что в мембранных, преинкубированных с пептидом Palm-232—245 в концентрации 10^{-5} М, максимальный стимулирующий АЦ эффект высокоселективного M_4P -агониста ТНIQ был ниже, чем в контрольных мембранных, а значение EC_{50} для этого эффекта повышалось (1.4 нМ против 2.5 в контроле) (рис. 2). В случае α -МСГ, неселективного MP-агониста, также наблюдалась

Таблица 1
Влияние преинкубации синаптосомных мембранных пептидом Palm-232—245 на стимуляцию базальной активности аденилатциклазы агонистами меланокортиковых рецепторов 4-го типа (α -МСГ и ТНIQ)

Концентрация пептида, М	α -МСГ, 10^{-7} М	THIQ, 10^{-7} М
	прирост к базальной активности АЦ, pmоль цАМФ/мин на 1 мг мембранных белка ($n = 9$)	
0	47.1 ± 2.2 100 %	34.0 ± 1.6 100 %
10^{-8}	50.5 ± 2.9 (49.6) ^a 102 % ^b	39.8 ± 1.6 (36.5) 109 %
10^{-7}	60.4 ± 3.0 (57.8) 104 %	48.0 ± 1.9 (44.7) 107 %
10^{-6}	62.5 ± 2.0 (63.7) 98 %	47.7 ± 2.6 (50.6) 94 %
10^{-5}	57.8 ± 3.3 (65.4) 88 %	38.4 ± 1.8 (52.3) 73 %
10^{-4}	46.8 ± 1.7 (62.2) 75 %	31.5 ± 3.1 (49.1) 64 %
10^{-3}	38.7 ± 0.9 (59.7) 65 %	23.7 ± 2.0 (46.6) 51 %

^a В скобках дано рассчитанное значение прироста активности АЦ путем суммирования приростов активности фермента, вызванных гормоном и пептидом при их раздельном действии. ^b Экспериментально наблюдаемый прирост активности АЦ по отношению к рассчитанному его значению, принятому за 100 %. Здесь и в табл. 2, 3 представлены средние значения и их стандартные отклонения.

Таблица 2
Влияние преинкубации синаптосомных мембранных пептидом Palm-232—245 на стимуляцию базального уровня ГТФ-связывания α -МСГ и ТНIQ

Концентрация пептида, М	α -МСГ, 10^{-7} М	THIQ, 10^{-7} М
	прирост к базальному уровню ГТФ-связывания, pmоль [3 H]-GppNHp на 1 мг мембранных белка ($n = 6$)	
0	3.6 ± 0.2 100 %	2.8 ± 0.1 100 %
10^{-8}	3.5 ± 0.3 (3.8) ^a 92 % ^b	3.0 ± 0.1 (3.0) 100 %
10^{-7}	4.6 ± 0.2 (4.4) 105 %	3.4 ± 0.2 (3.6) 94 %
10^{-6}	5.4 ± 0.2 (5.3) 102 %	4.2 ± 0.1 (4.5) 93 %
10^{-5}	4.7 ± 0.3 (5.6) 84 %	3.7 ± 0.2 (4.8) 77 %
10^{-4}	4.6 ± 0.1 (5.8) 79 %	2.9 ± 0.2 (5.0) 58 %
10^{-3}	4.0 ± 0.2 (5.8) 69 %	3.0 ± 2.0 (5.0) 60 %

^a В скобках дано рассчитанное значение прироста ГТФ-связывания путем суммирования приростов ГТФ-связывания, вызванных гормоном и пептидом при их раздельном действии. ^b Экспериментально наблюдаемый прирост ГТФ-связывания по отношению к рассчитанному его значению, принятому за 100 %.

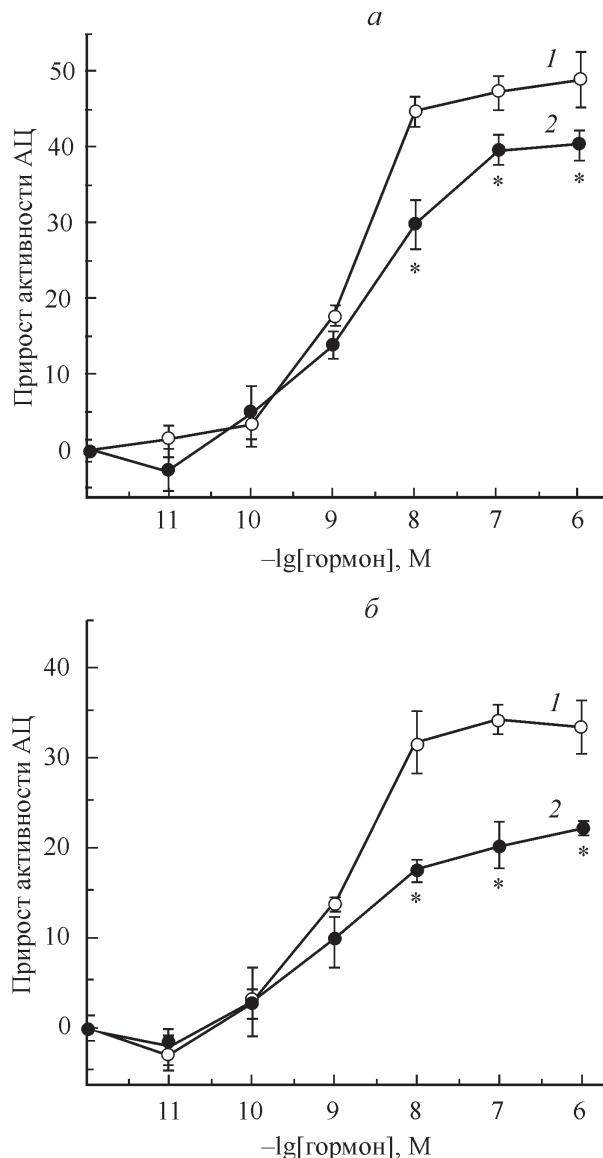


Рис. 2. Стимулирующее влияние α -меланоцитстимулирующего гормона (α -МСГ) (а) и THIQ (б) на активность АЦ в присутствии 10^{-5} М пептида Palm-232–245.

По горизонтали — отрицательный логарифм концентрации гормона, М; по вертикали — прирост к базальной (1) или к стимулированной пептидом (2) активности АЦ, пмоль цАМФ/мин на 1 мг мембранных белка. Кривые: 1 — гормон (α -МСГ или THIQ) в контрольных мембранных, 2 — гормон в мембранных, преинкубированных с пептидом Palm-232–245. Представлены средние значения и их ошибка, достоверность различий (при $P < 0.05$) показана звездочкой.

лось, хотя и менее выраженное, снижение максимального стимулирующего влияния гормона на активность АЦ и повышение значения EC_{50} (1.6 нМ против 2.9 в контроле) (рис. 2). При совместном влиянии на базальную активность АЦ пептида Palm-232–245 и гормональных агентов — M_3 Р-агониста γ -МСГ, серотонина и PACAP-38, действие которых реализуется через сопряженные с G_s -белками GPCR, отличные от M_4 Р, аддитивность их стимулирующих эффектов сохранялась во всем исследуемом диапазоне концентраций пептида (данные не представлены). Это указывает на то, что мишениями действия пептида и указанных выше гормонов являются различные рецепторы.

Таблица 3

Влияние пептида Palm-232–245 на базальную и стимулированную гормонами активность АЦ в миокардных и семенниковых мембранных крыс

Воздействие	Без пептида	Пептид, 10^{-5} М	Пептид, 10^{-4} М
	активность АЦ, пмоль цАМФ/мин на 1 мг мембранных белка ($n = 9$)		
Миокард			
(Базальная активность)	26.9 ± 1.2	25.1 ± 0.5	23.8 ± 1.4
Изопротеренол, 10^{-5} М	98.7 ± 2.5	100.6 ± 4.7	91.3 ± 1.0
Семенники			
(Базальная активность)	17.5 ± 0.6	18.3 ± 1.9	18.9 ± 0.7
Хорионический гонадотропин, 10^{-8} М	126.3 ± 5.1	130.5 ± 4.4	123.7 ± 2.8

Далее мы исследовали тканевую специфичность действия пептида Palm-232–245. Для этого изучали его влияние на базальную активность АЦ и уровень ГТФ-связывания в миокардных и семенниковых мембранных. Пептид в концентрациях 10^{-5} и 10^{-4} М, в которых он активировал АЦСС в синаптосомных мембранных, практически не влиял на АЦСС в миокарде и семенниках (табл. 3). Кроме того, преинкубация миокардных и семенниковых мембран с пептидом не влияла на стимуляцию активности АЦ β -агонистом изопротеренолом и хорионическим гонадотропином человека, значения которой в отсутствие пептида составили 267 и 622 % соответственно. Эти результаты являются дополнительным доказательством в пользу рецепторной специфичности действия пептида. Полученные данные не только свидетельствуют о том, что основной мишенью пептида Palm-232–245 являются ткани мозга, но и подтверждают точку зрения, согласно которой для проявления биологической активности GPCR-пептидов необходимо присутствие гомологичного ему рецептора, в нашем случае M_4 Р, который в миокарде и семенниках не экспрессируется.

Обсуждение

В последние годы ведется интенсивная разработка селективных и эффективных регуляторов гормональных сигнальных систем на основе модифицированных гидрофобными радикалами GPCR-пептидов, соответствующих по структуре функционально важным участкам ЦП рецепторов серпантинного типа. Наибольший интерес здесь представляют GPCR-пептиды, производные ЦП-3, поскольку в большинстве рецепторов эта петля, а точнее, проксимальные к мемbrane ее сегменты играют определяющую роль в связывании и активации гетеротримерных G-белков и в стабилизации активированной конформации самого рецептора (Шпаков, 2002). Мутации в этих сегментах, как правило, приводят к инактивации GPCR, потере им способности передавать гормональный сигнал и нарушению его процессинга в клетке, а в некоторых случаях могут перевести GPCR в гиперактивированное состояние, нечувствительное к гормональным воздействиям. В ЦП-3 рецептора M_4 Р идентифицировано несколько мутаций, которые приводят к значительному снижению базальной активности рецептора и нарушению его

взаимодействия с G-белками, и мутация Pro²³⁰Leu, которая переводит его в конститутивно активное состояние (Kim et al., 2008).

Функциональная роль ЦП-3 состоит в том, что ее N- и C-концевые сегменты, а в некоторых рецепторах и центральные участки содержат основные молекулярные детерминанты, ответственные за специфическое взаимодействие с α -субъединицами и $\beta\gamma$ -димерными комплексами G-белков, другими регуляторными и адаптерными белками, в частности с β -аррестинами. Наряду с этим ЦП-3, граничащая с пятым и шестым трансмембранными доменами, влияет на конформацию трансмембранных канала и локализованного в нем лигандсвязывающего сайта и является важнейшим структурным интерфейсом, через который волна конформационных перестроек, индуцированная связыванием лиганда, передается на ГТФ-связывающий сайт α -субъединицы G-белка. Предполагается, что липофильные производные GPCR-пептидов, структурно соответствующие ЦП-3, внедряются в цитоплазматические домены гомологичного им рецептора и взаимодействуют с комплементарными участками этих доменов, изменяя их конформацию, микроокружение и доступность для взаимодействия с G-белками. При этом они могут блокировать передачу гормонального сигнала, функционируя как внутриклеточные антагонисты, или, напротив, оказывать на гомологичный рецептор активирующее действие и в отсутствие гормона запускать сигнальные каскады, являясь, таким образом, внутриклеточными агонистами (Shpakov, 2011, 2013; O'Callaghan et al., 2012a). Обладая собственной агонистической активностью, многие липофильные производные GPCR-пептидов модулируют регуляцию гомологичного им рецептора лигандами, которые действуют на ортостерический сайт GPCR, что позволяет их отнести в большей степени к частичным агонистам.

В настоящее время разработано большое число GPCR-пептидов с активностью внутриклеточных антагонистов и полных или частичных агонистов, которые обладают специфической биологической активностью *in vitro* и *in vivo* (Miller et al., 2009; Shpakov, 2011; Tressel et al., 2011; O'Callaghan et al., 2012a). Их характерной чертой является модификация с N- или C-конца гидрофобными радикалами, которые позволяют GPCR-пептидам легко проникать через липидный бислой мембранны и заняться вблизи трансмембранного канала и проксимальных к нему цитоплазматических участков GPCR. В качестве гидрофобных радикалов обычно применяют остатки пальмитиновой, миристиновой и лизохолевой кислот, сопоставимых по размеру и гидрофобности с трансмембранными участками рецептора. Эти участки не только обладают мембраноактивными свойствами, но и стабилизируют биологически активную конформацию GPCR-пептида (Shpakov, 2013; Shpakov, Shpakova, 2014b).

В настоящей работе показано, что модифицированный пальмитатом пептид Palm-232—245, соответствующий ЦП-3 M₄P, действует как агонист этого рецептора, повышая базальную активность АЦ и уровень ГТФ-связывания G-белков в синаптосомных мембранных крыс. Его максимальные стимулирующие эффекты составляют 39 % (для активности АЦ) и 60 % (для ГТФ-связывания) от аналогичных эффектов α -МСГ, (эндогенного неселективного MP-агониста) и 54 и 78 % соответственно от эффектов THIQ (синтетического высокоселективного M₄P-агониста). Эти данные свидетельствуют о высокой

эффективности действия пептида Palm-232—245 на чувствительную к меланокортику АЦСС, которая сопоставима с таковой α -МСГ и THIQ, осуществляющих активацию M₄P путем специфического связывания с ортостерическим сайтом, локализованным в трансмембранным канале.

Стимулирующее влияние пептида на АЦ снижается в концентрации выше 10⁻⁵ М, в то время как его стимулирующее действие на ГТФ-связывание сохраняется. Стимуляция пептидом АЦ осуществляется через посредство G_s-белков, которые являются основным пулом гетеротримерных G-белков, сопряженных с M₄P. Однако M₄P могут быть сопряжены и с другими типами G-белков, в том числе с G-белками ингибирующего типа (G_i), которые опосредуют ингибирование активности АЦ (Breit et al., 2011). При этом активация G_i-белков наблюдается при действии более высоких концентраций M₄P-агонистов, а также при отсутствии функционально активных G_s-белков (Buch et al., 2009).

При совместном действии пептида Palm-232—245 в низкой концентрации (10⁻⁷—10⁻⁶ М) и гормонов (α -МСГ и THIQ), действующих на M₄P, их стимулирующее действие на АЦСС было аддитивным. В присутствии пептида в концентрации 10⁻⁵ М и выше аддитивность эффектов исчезала и начинало выявляться его ингибирующее влияние на эффекты гормонов, что может быть связано со снижением числа M₄P, способных активироваться M₄P-агонистами. Таким образом, в отношении влияния на стимуляцию АЦСС M₄P-агонистами пептид Palm-232—245 ведет себя как частичный агонист, снижая максимальный стимулирующий эффект α -МСГ и THIQ. В пользу этого свидетельствует и тот факт, что в присутствии пептида (10⁻⁵ М) повышаются значения EC₅₀ для эффектов THIQ и в меньшей степени α -МСГ. В то же время в присутствии пептида во всем диапазоне изученных концентраций практически не изменялся стимулирующий эффект M₃P-агониста γ -МСГ, который лишь в незначительной степени способен активировать M₄P, а также серотонина и PACAP-38, которые активируют рецепторы, не имеющие гомологии с M₄P. Более того, их стимулирующее влияние на активность АЦ было аддитивным по отношению к действию пептида. Эти данные свидетельствуют о рецепторной специфичности пептида Palm-232—245, действие которого реализуется через посредство гомологичных ему M₄P.

На это же указывают и исследования тканевой специфичности стимулирующего влияния пептида на АЦСС. В отличие от других типов MP, M₄P экспрессируются почти исключительно в тканях мозга. Нами обнаружено, что стимуляция пептидом базальной активности АЦ в тканях (миокард и семенники), где M₄P отсутствуют, не выявляется. Это хорошо согласуется с предлагаемыми в настоящее время молекулярными механизмами действия липофильных производных GPCR-пептидов, согласно которым для их специфической биологической активности необходимо наличие гомологичного рецептора, в котором имеются участки, комплементарные GPCR-пептиду. Ранее нами и другими авторами было установлено, что GPCR-пептиды, структурно соответствующие цитоплазматическим участкам лютеинизирующего и тиреотропного гормонов, серотонинового рецептора 6-го типа, релаксинового рецептора RXFP1, протеиназо-активируемого рецептора 1-го типа, активны только в тех клетках или тканях, где экспрессируются гомологичные им рецепторы (Covic et al., 2002; Swift et al., 2006; Shpakov et al.,

2010; Шпаков и др., 2011, 2014; Шпакова, Шпаков, 2013). Так, стимулирующее влияние С-пальмитоилированного пептида 612—627-K(Pal)A, производного ЦП-3 рецептора тиреотропного гормона, на активность АЦСС отчетливо выражено в тканях щитовидной железы, основной мишени действия тиреотропного гормона, но не выявляется в мозге и миокарде, где эти рецепторы отсутствуют или экспрессируются в следовых количествах (Шпаков и др., 2014). Рецепторная и тканевая специфичность пептида Palm-232—245 имеют большое значение для разработки на его основе препаратов для коррекции функций меланокортиновой системы мозга, которые могут найти применение в медицине.

Таким образом, нами впервые синтезирован и изучен N-пальмитоилированный пептид Palm-232—245, соответствующий по первичной структуре С-концевой половине ЦП-3 рецептора M₄P крысы, который дозозависимым способом стимулирует активность АЦ и ГТФ-связывание гетеротримерных G-белков во фракциях синаптосомных мембран, выделенных из мозга крыс. Пептид модулировал стимулирующее влияние α-MCG и высокоселективного M₄P-агониста THIQ на активность АЦСС, функционируя как частичный агонист M₄P, но практически не влиял на стимуляцию АЦСС гормонами, действующими через другие типы рецепторов, в том числе через M₃P, функционально и структурно близкие M₄P. Полученные данные о специфической биологической активности пептида Palm-232—245 в условиях *in vitro* указывают на возможность создания на его основе регуляторов меланокортиновой сигнальной системы мозга в условиях *in vivo*. Такие регуляторы с активностью агонистов могут быть использованы для коррекции метаболических нарушений и нейроэндокринных дисфункций, вызванных снижением функциональной активности M₄P.

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

Список литературы

- Шпаков A. O. 1996. Молекулярные детерминанты рецепторов и ГТФ-связывающих белков, определяющие специфичность взаимодействий между ними. Журн. эвол. биохим. физиол. 32 (4) : 488—511. (Shpakov A. O. 1996. Molecular determinants of receptors and GTP-binding proteins determining specificity of their interaction. J. Evol. Biochem. Physiol. 32 (4) : 400—418.)
- Шпаков A. O. 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 A. O., Шпакова E. A., Тарасенко И. И., Деркач K. V. 2011. Рецепторная и тканевая специфичность действия пептидов, производных цитоплазматических участков рецепторов серпантинного типа. Биол. мембрany. 28 (6) : 453—462. (Shpakov A., Shpakova E. A., Tarasenko I. I., Derkach K. 2012. 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 Biology. 64 (1) : 16—25.)
- Шпаков A. O., Шпакова E. A., Тарасенко И. И., Деркач K. V. 2014. Пептид 612—627 рецептора тиреотропного гормона и его модифицированные аналоги как регуляторы аденилатциклазы в щитовидной железе крыс. Цитология. 56 (7) : 526—535. (Shpakov A. O., Shpakova E. A., Tarasenko I. I., Derkach K. V. 2014. Peptide 612—627 of thyrotropin receptor and its modified derivatives as the regulators of adenylyl cyclase in the rat thyroid gland. Tsitologiya. 56 (7) : 526—535.)
- Шпакова E. A., Шпаков A. O. 2013. Регуляция активности аденилатциклазы в семенниках крыс ацилированными производными пептида 562—572 рецептора лутенизирующего гормона. Цитология. 55 (10) : 737—744. (Shpakova E. A., Shpakov A. O. 2014. Regulation of adenylyl cyclase activity in rat testes by acylated derivatives of peptide 562—572 of a luteinizing hormone receptor. Cell Tissue Biol. (Tsitologiya). 8 (2) : 152—159.)
- Agarwal A., Tressel S. L., Kaimal R., Balla M., Lam F. H., Covic L., Kuliopoulos A. 2010. Identification of a metalloprotease-chemokine signaling system in the ovarian cancer microenvironment: implications for antiangiogenic therapy. Cancer Res. 70 : 5880—5890.
- Breit A., Büch T. R., Boekhoff I., Solinski H. J., Damm E., Gudermann T. 2011. Alternative G protein coupling and biased agonism: new insights into melanocortin-4 receptor signalling. Mol. Cell. Endocrinol. 331 : 232—240.
- Büch T. R., Heling D., Damm E., Gudermann T., Breit A. 2009. Pertussis toxin-sensitive signalling of melanocortin-4 receptors in hypothalamic GT1-7 cells defines agouti-related protein as a biased agonist. J. Biol. Chem. 284 : 26 411—26 420.
- Covic L., Gresser A. L., Talavera J., Swift S., Kuliopoulos A. 2002. Activation and inhibition of G protein-coupled receptors by cell-penetrating membrane-tethered peptides. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 99 : 643—648.
- Fani L., Bak S., Delhanty P., van Rossum E. F., van den Akker E. L. 2014. The melanocortin-4 receptor as target for obesity treatment: a systematic review of emerging pharmacological therapeutic options. Int. J. Obes. (London). 38 : 163—169.
- Forsman H., Bylund J., Oprea T. I., Karlsson A., Boulay F., Rabiet M. J., Dahlgren C. 2013. The leukocyte chemotactic receptor FPR2, but not the closely related FPR1, is sensitive to cell-penetrating pepducins with amino acid sequences descending from the third intracellular receptor loop. Biochim. biophys. acta. 1833 : 1914—1923.
- Jamieson T., Clarke M., Steele C. W., Samuel M. S., Neumann J., Jung A., Huels D., Olson M. F., Das S., Nibbs R. J., Sansom O. J. 2012. Inhibition of CXCR2 profoundly suppresses inflammation-driven and spontaneous tumorigenesis. J. Clin. Invest. 122 : 3127—3144.
- Kim D. H., Shin S. W., Baik J. H. 2008. Role of third intracellular loop of the melanocortin 4 receptor in the regulation of constitutive activity. Biochem. Biophys. Res. Commun. 365 : 439—445.
- Licht T., Tsirulnikov L., Reuveni H., Yarnitzky T., Ben-Sasson S. A. 2003. Induction of pro-angiogenic signaling by a synthetic peptide derived from the second intracellular loop of S1P3 (EDG3). Blood. 102 : 2099—2107.
- Miller J., Agarwal A., Devi L. A., Fontanini K., Hamilton J. A., Pin J. P., Shields D. C., Spek C. A., Sakmar T. P., Kuliopoulos A., Hunt S. W. 2009. Insider access: pepducin symposium explores a new approach to GPCR modulation. Ann. N. Y. Acad. Sci. 1180 : 1—12.
- Nogueiras R., Wiedmer P., Perez-Tilve D., Veyrat-Durebex C., Keogh J. M., Sutton G. M., Pfluger P. T., Castanada T. R., Neischen S., Hofmann S. M. 2007. The central melanocortin system directly controls peripheral lipid metabolism. J. Clin. Invest. 117 : 3475—3488.
- O'Callaghan K., Kuliopoulos A., Covic L. 2012a. Turning receptors on and off with intracellular pepducins: new insights into G-protein-coupled receptor drug development. J. Biol. Chem. 287 : 12 787—12 796.
- O'Callaghan K., Lee L., Nguyen N., Hsieh M. Y., Kaneder N. C., Klein A. K., Sprague K., Van Etten R. A., Kuliopoulos A., Covic L. 2012b. Targeting CXCR4 with cell-penetrating pepducins in lymphoma and lymphocytic leukemia. Blood. 119 : 1717—1725.
- Okubo T., Chaki S. 2013. Melanocortin-4 receptor antagonists for the treatment of depression and anxiety disorders. Curr. Top. Med. Chem. 7 : 1145—1151.

- Rene P., Le Gouill C., Pogozheva I. D., Lee G., Mosberg H. I., Farooqi I. S., Valenzano K. J., Bouvier M. 2010. Pharmacological chaperones restore function to MC4R mutants responsible for severe early-onset obesity. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 335 : 520—532.
- Shinyama H., Masuzaki H., Fang H., Flier J. S. 2003. Regulation of melanocortin-4 receptor signaling: agonist-mediated desensitization and internalization. *Endocrinology*. 144 : 1301—1314.
- Shpakov A. O. 2011. Signal protein-derived peptides as functional probes and regulators of intracellular signaling. *J. Amino Acids*. 2011 : Article ID: 656051. 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 : 380—400.
- Shpakov A. O., Chistyakova O. V., Derkach K. V., Moiseyuk I. V., Bondareva V. M. 2012. Intranasal insulin affects adenylyl cyclase system in rat tissues in neonatal diabetes. *Central Eur. J. Biol.* 7 : 33—47.
- 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., Shpakova E. A. 2014a. The prospects for use of peptides and their derivatives, structurally corresponding to the G protein-coupled receptors, in medicine. *Biochemistry (Moscow)*. Suppl. Ser. B: Biomed. Chem. 8 : 19—26.
- Shpakov A. O., Shpakova E. A. 2014b. The use of peptides derived from G protein-coupled receptors and heterotrimeric G proteins in the study of their structure and functions. Chapter 9. In: «Protein purification and analysis III — methods and applications». iConceptPress. 1—35. ID 12060519095046. <http://www.iconceptpress.com/books/protein-purification-and-analysis-iii-methods-and-applications/>
- 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., Kuliopoulos A. 2006. Role of the PAR1 receptor 8th helix in signaling: the 7-8-1 receptor activation mechanism. *J. Biol. Chem.* 281 : 4109—4116.
- Tressel S. L., Koukos G., Tchernychev B., Jacques S. L., Covic L., Kuliopoulos A. 2011. Pharmacology, biodistribution, and efficacy of GPCR-based pepducins in disease models. *Methods Mol. Biol.* 683 : 259—275.
- Xu Y., Elmquist J. K., Fukuda M. 2011. Central nervous control of energy and glucose balance: focus on the central melanocortin system. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1243 : 1—14.

Поступила 7 IV 2014

N-PALMITOYLATED PEPTIDE 232—245 OF RAT TYPE 4 MELANOCORTIN RECEPTOR POSSESSING AGONISTIC ACTIVITY

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

Melanocortin receptors of the type 4 (M₄R) play a key role in the regulation of feeding behavior, neuroendocrine functions, and energy metabolism. The alterations in their functional activity induce obesity, metabolic syndrome, depression, and mental disorders, which makes the search of selective regulators of M₄R to be one of the actual problems of molecular endocrinology. Promising for the development of such regulators is to design peptides corresponding to functionally important regions of M₄R. The purpose of this study was to study the influence of synthesized N-palmitoylated peptide Palm-Thr-Gly-Thr-Ile-Arg-Gln-Gly-Ala-Asn-(Nle)-Lys-Gly-Ala-Ile^{232—245}-amide (Palm-232—245) structurally corresponding to the C-terminal half of the third intracellular loop (ICL-3) of rat M₄R on functional activity of adenylyl cyclase signaling system (ACSS) in the fractions of synaptosomal membranes isolated from the brains of male rats. It has been shown that, at a concentration of 10⁻⁷ M and higher, Palm-232—245 stimulates the basal activity of adenylyl cyclase (AC) in the synaptosomal membranes and increases the basal level of GTP binding with the EC₅₀ values of 71 and 267 nM, respectively. Under the combined action of low concentrations of the peptide (10⁻⁷—10⁻⁶ M) and M₄R agonists, α-melanocyte-stimulating hormone (α-MSH) and THIQ (10⁻⁷ M), we observed an additive stimulatory effect on AC, which disappeared when the peptide concentration was increased to 10⁻⁴—10⁻³ M. In the synaptosomal membranes preincubated with 10⁻⁵ M peptide, the maximum stimulatory effect of M₄R agonists on AC activity was lower than that in controls, and EC₅₀ values for this effect, on the contrary, increased. In the case of combined action of the peptide and hormones (γ-MSH, serotonin, PACAP-38) that activate AC via the other receptors, the additivity of their stimulating effects on the ACSS persisted throughout the range of peptide concentrations. The effect of the peptide was not observed in myocardial and testicular membranes no in which there is M₄R homologous to the peptide. Thus, N-palmitoylated peptide Palm-232—245 specifically activates the ACSS in the rat brain by acting as intracellular M₄R agonist. This may be used to create drugs regulating brain melanocortin system and physiological processes that depend on it.

Key words: adenylyl cyclase, agonist, heterotrimeric G-protein, melanocortin receptor, melanocyte-stimulating hormone, brain, peptide, third cytoplasmic loop.