

**ВЗАИМОСВЯЗЬ МЕЖДУ МИЦЕЛЛООБРАЗОВАНИЕМ
И БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТЬЮ ПЕПТИДА 562—572 РЕЦЕПТОРА
ЛЮТЕИНИЗИРУЮЩЕГО ГОРМОНА,
МОДИФИЦИРОВАННОГО ДЕКАНОИЛЬНЫМИ РАДИКАЛАМИ**

© *Е. А. Шпакова,¹ В. Н. Сорокоумов,¹ А. В. Акентьев,¹ К. В. Деркач,²
Т. Б. Тенникова,¹ А. О. Шпаков^{2,*}*

¹ *С.-Петербургский государственный университет, Институт химии,
Санкт-Петербург, 198504,
и ² Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова РАН,
Санкт-Петербург, 194223;
* электронный адрес: alex_shpakov@list.ru*

Липофильные производные пептидов, соответствующих цитоплазматическим участкам сопряженных с G-белками рецепторов (GPCR), могут функционировать как внутриклеточные агонисты. Ранее мы показали, что модифицированные с С-конца пальмитатом и деканоатом пептиды, соответствующие участку 562—572 рецептора лютеинизирующего гормона (ЛГР), активируют аденилатциклазу (АЦ) в семенниках крыс. Стимулирующее действие пептида 562—572, модифицированного деканоатами с N- и С-концов (пептид IV), достигало максимума при концентрации 10^{-5} М и снижалось при дальнейшем повышении концентрации. Предположили, что это может быть связано со способностью пептида IV к мицеллообразованию. Для проверки этого изучали взаимосвязь между биологической активностью, гидрофобностью и способностью к мицеллообразованию для пептида IV и других ацилированных производных пептида 562—572, в том числе с С-концевым деканоатом (пептид III) и пальмитатом (пептид VI). Показано, что стимулирующее влияние пептида IV в концентрации 10^{-5} М на активность АЦ в плазматических мембранах семенников и яичников крыс лишь немного уступает таковому пептида VI и превосходит соответствующее действие пептида III. В концентрации 10^{-3} М действие пептида IV снижается на 20—27 % и составляет только 50—51 и 87—88 % от таковых пептидов VI и III соответственно. Несмотря на высокую гидрофобность, при проведении обращенно-фазовой ВЭЖХ пептид IV имел аномально низкое время удерживания при элюировании с колонки Nucleosil C8, даже ниже, чем у немодифицированного пептида 562—572. Однако при повышении концентрации трифторуксусной кислоты в элюенте с 0.1 до 0.5 %, вызывающей разрушение мицеллоподобных структур, время удерживания пептида IV в значительной степени увеличивалось, в то время как для других пептидов оно не менялось. Поверхностное натяжение водного раствора пептида IV незначительно снижалось с увеличением концентрации, но при достижении концентрации $7 \cdot 10^{-6}$ М отмечали его резкое падение и выход на плато, что указывает на начало образования мицелл. Таким образом, пептид IV в концентрациях 10^{-5} М и выше образует мицеллы, что препятствует его взаимодействию с рецептором. Способность GPCR-пептидов к самоагрегации и мицеллообразованию должна учитываться при разработке их мембраноактивных аналогов.

Ключевые слова: пептид, рецептор лютеинизирующего гормона, гидрофобность, мицеллообразование, аденилатциклаза, деканоильный радикал

Принятые сокращения: АЦ — аденилатциклаза, АЦСС — аденилатциклазная сигнальная система, ККМ — критическая концентрация мицеллообразования, ЛГР — рецептор лютеинизирующего гормона, ТФУК — трифторуксусная кислота, Dec — остаток декановой кислоты, GPCR — сопряженные с G-белками рецепторы серпантинного типа (G protein-coupled receptors), Palm — остаток пальмитиновой кислоты.

В последние годы появились многочисленные свидетельства того, что синтетические пептиды, производные цитоплазматических петель, сопряженных с G-белками рецепторов серпантинного типа (GPCR), наделены активностью внутриклеточных агонистов и антагонистов. Они способны влиять на функциональную активность рецепторов и модулировать передачу через них гормонального

сигнала (Covic et al., 2002; Shpakov, Pertseva, 2007; Cisowski et al., 2011; Tressel et al., 2011; Severino et al., 2013; Shpakov, Shpakova, 2014a, 2014b). Большое значение для биологической активности GPCR-пептидов имеет модификация гидрофобными радикалами, в том числе остатками жирных кислот. Эти радикалы взаимодействуют с плазматической мембраной, что позволяет GPCR-пепти-

дам заякориваться в ней и проникать через мембрану внутрь клетки к цитоплазматическим петлям рецептора и гетеротримерным G-белкам, которые являются основными их мишенями (Tressel et al., 2011; Shpakov, Shpakova, 2014b; Шпаков, Деркач, 2015). Нами и другими авторами показано, что наибольшей активностью обладают GPCR-пептиды, модифицированные остатком пальмитиновой кислоты, который по длине сопоставим с трансмембранным участком рецептора (Covic et al., 2002; Shpakov et al., 2007, 2010; Шпакова и др., 2013; Шпакова, Шпаков, 2013; Derkach et al., 2015). Обеспечивая заякоривание GPCR-пептидов вблизи мембраны, гидрофобные радикалы стабилизируют их биологически активную конформацию и позволяют им эффективно взаимодействовать с комплементарными участками рецептора, вследствие чего модифицированные остатками жирных кислот GPCR-пептиды по активности в значительной степени превосходят немодифицированные аналоги, что показано нами в условиях *in vitro* и *in vivo* (Shpakov et al., 2007, 2010, 2012b; Шпакова и др., 2013; Шпакова, Шпаков, 2013; Деркач и др., 2014; Derkach et al., 2015).

Ранее мы показали, что ацилированные гидрофобными радикалами пептиды, соответствующие участку 562—572 третьей цитоплазматической петли рецептора лютеинизирующего гормона (ЛГР), влияют на активность чувствительной к гонадотропинам аденилатциклязной сигнальной системы (АЦСС) в семенниках крыс, а также повышают уровень тестостерона при интратестикулярном введении самцам крыс (Шпакова и др., 2013; Шпакова, Шпаков, 2013; Деркач и др., 2014). Липофильные производные пептида 562—572 повышали базальную активность фермента аденилатциклазы (АЦ), каталитического компонента АЦСС, и ослабляли активацию АЦ хорионическим гонадотропином, структурным и функциональным гомологом лютеинизирующего гормона. Регуляторное действие пептидов специфично в отношении ЛГР и выявляется только в тканях, где эти рецепторы присутствуют (Шпаков и др., 2011; Шпакова, Шпаков, 2013). Для оценки влияния длины и местоположения гидрофобных радикалов в пептиде 562—572 на его биологическую активность изучали его ацилированные производные, модифицированные деканоильными или пальмитоильными радикалами как с одного, так и с обоих концов. Наибольшей активностью обладал пептид, модифицированный с С-конца пальмитатом, который с высокой эффективностью стимулировал АЦ в семенниках крыс. Пептид, модифицированный с С-конца деканоатом, был менее активен, чем пальмитоилированный аналог, и сравним по активности с немодифицированным пептидом 562—572. Пептиды, ацилированные с N-конца, были неактивны. Довольно неожиданный результат получили в отношении пептида, модифицированного деканоильными радикалами с обоих концов. Он оказывал максимальное стимулирующее влияние на активность АЦ в концентрации 10^{-5} М, но при повышении концентрации до 10^{-3} М его влияние на АЦ снижалось. Мы предположили, что одной из причин этого являются особенности его физико-химических свойств, а именно способность пептида к мицеллообразованию.

Для проверки нашего предположения провели настоящее исследование, целью которого являлось изучение взаимосвязи между биологической активностью, гидрофобностью и способностью к мицеллообразованию пептида 562—572, ацилированного деканоильными остатками с N- и С-концов. Оценку гидрофобности проводили

с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ, критическую концентрацию мицеллообразования (ККМ) определяли измерением поверхностного натяжения методом висящей капли. Биологическую активность изучали в условиях *in vitro* по влиянию пептида на активность АЦ в плазматических мембранах, выделенных из семенников и яичников крыс. Для сравнения исследовали аналоги пептида 562—572, модифицированные одним остатком деканоата или пальмитата. Интересный с точки зрения проводимого исследования пептид 562—572, модифицированный с обоих концов пальмитатом, характеризовался очень высокой гидрофобностью, не растворялся в полярных растворителях, что не позволило использовать его в экспериментах.

Материал и методика

Пептиды синтезировали с помощью твердофазной стратегии методом последовательного наращивания цепи на *para*-метилбензгидриламиновой смоле с емкостью 1.16 ммоль/г, используя защищенные N α -третбутилоксикарбонильными группами производные аминокислот, как описано ранее (Шпакова, Шпаков, 2013). В общей сложности синтезировали 1 немодифицированный и 5 модифицированных остатками пальмитиновой (Palm) или декановой (Dec) кислот GPCR-пептидов, соответствующих С-концевому участку 562—572 третьей цитоплазматической петли ЛГР крысы: Asn-Lys-Asp-Thr-Lys-Ile-Ala-Lys-Lys-Nle-Ala^{562–572}-амид (I), Asn-Lys(Dec)-Asp-Thr-Lys-Ile-Ala-Lys-Lys-Nle-Ala^{562–572}-Lys-Ala-амид (II), Asn-Lys-Asp-Thr-Lys-Ile-Ala-Lys-Lys-Nle-Ala^{562–572}-Lys(Dec)-Ala-амид (III), Asn-Lys(Dec)-Asp-Thr-Lys-Ile-Ala-Lys-Lys-Nle-Ala^{562–572}-Lys(Dec)-Ala-амид (IV), Asn-Lys(Palm)-Asp-Thr-Lys-Ile-Ala-Lys-Lys-Nle-Ala^{562–572}-Lys-Ala-амид (V) и Asn-Lys-Asp-Thr-Lys-Ile-Ala-Lys-Lys-Nle-Ala^{562–572}-Lys(Palm)-Ala-амид (VI). Высокоочищенные образцы получали с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ, используя колонки Nucleosil C-18 и C-8 4.6 × 250 мм (для аналитических целей) и Supelco C-18 и C-8 25 × 212 мм (для препаративного разделения) и хроматограф 600E (Waters, США). Структуру пептидов подтверждали с помощью масс-спектрометрии высокого разрешения с электроспрей-ионизацией с помощью прибора MicroTOF (Bruker, США) в режиме регистрации положительных ионов (растворитель — ацетонитрил, ионизирующая добавка — трифторуксусная кислота (ТФУК), потенциал ионизации 70 В, напряжение на капилляре 4500 В, температура высушивающего газа 180 °С). Масс-спектрометрический анализ показал, что M_{эксп.} пептида I равна 1227.67 (M_{расч.} = 1227.64), M_{эксп.} пептида II — 1381.92 (M_{расч.} = 1382.02), M_{эксп.} пептида III — 1381.89 (M_{расч.} = 1382.02), M_{эксп.} пептида IV — 1735.39 (M_{расч.} = 1735.41), M_{эксп.} пептида V — 1665.16 (M_{расч.} = 1665.13), M_{эксп.} пептида VI — 1665.14 (M_{расч.} = 1665.13).

В биохимических экспериментах использовали АТФ, цАМФ, креатинфосфат и креатинфосфокиназу из мышц кролика (Sigma, США). Для определения активности АЦ использовали меченый субстрат [α -³²P]АТФ (150 Гбк/ммоль) (Всероссийское объединение «Изотоп», Россия), для разделения меченых нуклеотидов проводили колоночную хроматографию на нейтральной окиси алюминия (Sigma, США). Активность АЦ определяли радиоизотопным методом, как описано ранее (Shpakov

et al., 2012a). Реакционная смесь (общий объем 50 мкл) содержала 50 мМ Tris-HCl (pH 7.5), 5 мМ MgCl₂, 1 мМ АТФ, 37 кБк [α -³²P]-АТФ, 0.1 мМ цАМФ, 20 мМ креатинфосфата, 0.2 мг/мл креатинфосфокиназы и 50—100 мкг мембранного белка. Реакцию проводили в течение 12 мин при 37 °С. Активность фермента выражали в пмоль цАМФ/мин на 1 мг мембранного белка. Базальную активность фермента определяли в отсутствие регуляторов АЦ.

Выделение фракций плазматических мембран из семенников и яичников крыс Wistar (возраст 5 мес) и определение в них активности АЦ проводили, как описано ранее (Шпаков и др., 2010; Шпакова, Шпаков, 2013). Для получения каждой фракции брали 5 животных. Измельченные ткани семенников и яичников гомогенизировали при 4 °С в 40 мМ Tris-HCl-буфере (pH 7.5), содержащем 5 мМ MgCl₂, 10 % сахарозы и ингибиторы протеаз. Гомогенат центрифугировали при 1500 g в течение 10 мин, после чего супернатант центрифугировали при 20 000 g в течение 30 мин. Образовавшийся осадок плазматических мембран ресуспендировали в буфере выделения (без сахарозы) и центрифугировали в том же режиме. Отмытые мембраны ресуспендировали в 50 мМ Tris-HCl-буфере (pH 7.4) и использовали для определения активности АЦ.

Для оценки гидрофобности пептидов использовали обращенно-фазовую ВЭЖХ с аналитической колонкой Nucleosil C8. Эффективность разделения достигалась за счет изменения концентрации ацетонитрила в подвижной фазе. Наилучшее разделение достигнуто при использовании градиентного режима в системе вода/ацетонитрил/0.1 % ТФУК при повышении содержания ацетонитрила в смеси с 20 до 50 % (скорость потока 1 мл/мин). Для оценки относительной гидрофобности пептидов рассчитывали фактор удерживания k' , характеризующий продолжительность нахождения анализируемого соединения в неподвижной фазе относительно времени его пребывания в подвижной фазе, по формуле $k' = (t_R - t_0)/t_0$, где t_R — время удерживания исследуемого соединения, t_0 — время удерживания растворителя, которое в нашем

случае составило 4.37 ± 0.12 мин. Для расчета теоретических значений гидрофобности пептидов, которые в дальнейшем сравнивали с полученными экспериментальными результатами, использовали программу ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>). Определение ККМ для пептидов проводили на основе измерений поверхностного натяжения на установке PAT-1 (Sinterface, Германия) методом висящей капли (Winkel, 1965).

Статистический анализ данных проводили с помощью программы Microsoft Excel (AtteStat 12.5). Нормальность распределения подтверждали с помощью критерия Шапиро—Уилка. Данные представлены в виде среднего \pm стандартное отклонение ($M \pm SD$) для трех независимых экспериментов, различия оценивали с помощью t -критерия Стьюдента как достоверные при $p < 0.05$.

Результаты

Исследование влияния ацилированных производных пептида 562—572 на базальную активность АЦ во фракциях плазматических мембран, выделенных из репродуктивных тканей крыс — семенников и яичников, показало, что в обоих случаях наиболее активным был пептид VI, модифицированный с С-конца пальмитатом, причем его стимулирующее влияние на активность АЦ достигало максимума в концентрации 10^{-4} М и в дальнейшем заметно не менялось (рис. 1). Стимулирующее действие пептида IV, модифицированного с обоих концов деканоильными остатками, взятого в концентрации 10^{-5} М, хотя и уступало таковому пептида VI, но заметно превосходило соответствующее действие немодифицированного аналога и пептида III, содержащего С-концевой деканоат. В обеих тканях при повышении концентрации пептида IV отмечали ослабление его стимулирующего действия, причем в концентрации 10^{-3} М действие пептида IV было выражено слабее, чем таковое пептида III. Эти закономерности выявлены как в семенниках, так и в яичниках, что свидетельствует об однонаправленности действия

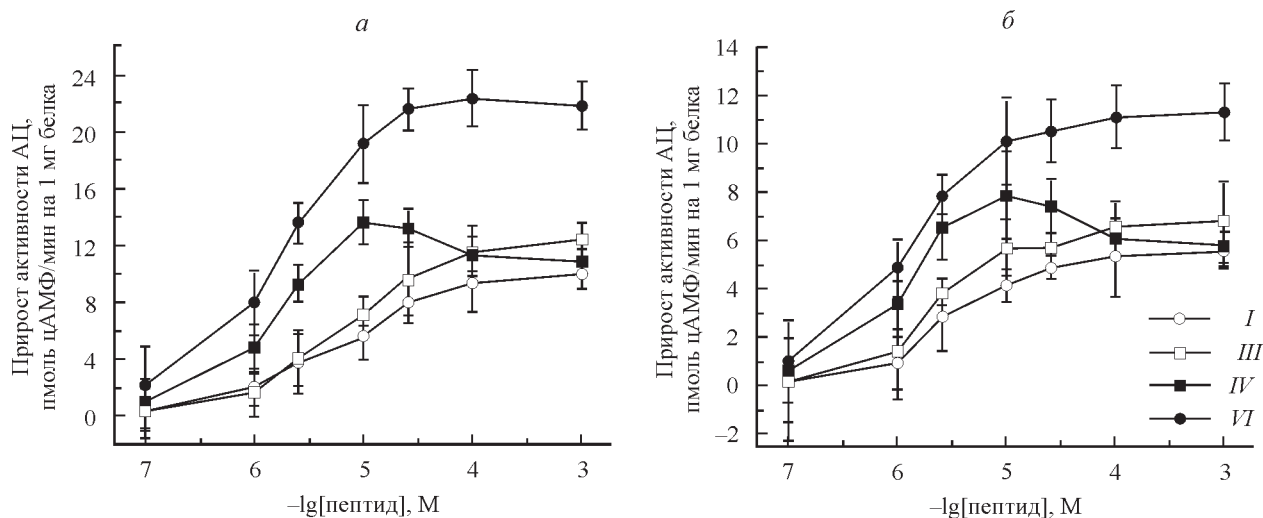


Рис. 1. Стимулирующее влияние ацилированных производных пептида 562—572 на базальную активность аденилатциклазы в плазматических мембранах, выделенных из семенников (а) и яичников (б) крыс.

I — немодифицированный пептид 562—572, III, IV и VI — ацилированные производные пептида 562—572. По оси абсцисс — отрицательный десятичный логарифм концентрации пептида, М; по оси ординат — прирост активности АЦ над базальным уровнем фермента, пмоль цАМФ/мин на 1 мг белка. Базальный уровень активности АЦ в семенниках и яичниках составляет 17.9 ± 0.7 и 12.8 ± 0.3 пмоль цАМФ/мин на 1 мг белка соответственно.

Время и фактор удерживания ацилированных производных пептида 562—572, полученных при проведении обращенно-фазовой ВЭЖХ на колонке Nucleosil C8

Ацилированный пептид	Время удерживания t_R , мин	Фактор удерживания k'
Пептид IV	6.72 ± 0.03	0.54 ± 0.04
Пептид II	17.47 ± 0.06	3.00 ± 0.10
Пептид III	22.37 ± 0.15	4.13 ± 0.17
Пептид V	26.68 ± 0.08	5.11 ± 0.18
Пептид VI	31.60 ± 0.20	6.24 ± 0.15

пептидов в репродуктивных тканях (рис. 1). Так, в семенниках соотношение величин стимулирующих эффектов пептидов IV и VI, взятых в концентрациях 10^{-5} и 10^{-3} М, составило 0.71 и 0.50, в яичниках — 0.78 и 0.51 соответственно. Стимулирующее действие пептида IV снижалось при повышении концентрации с 10^{-5} до 10^{-3} М на 20 % в семенниках и на 27 % в яичниках. У пептидов II и V, ацилированных жирнокислотными радикалами с N-конца, способность стимулировать АЦ не выявлялась (данные не представлены).

При определении гидрофобности ацилированных производных пептида 562—572 с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ на колонке Nucleosil C8 получили следующий ряд элюирования: IV < II < III < V < VI (см. таблицу). Увеличение времени удерживания ацилированных пептидов на гидрофобной фазе свидетельствует о повышении их гидрофобности и хорошо согласуется с теоретическим рядом элюирования, выстроенным на основе расчета гидрофобности с помощью программы ProtParam (II < III < VI < V < IV). Исключение составил пептид IV с аномально низким временем удерживания. Оно было ниже, чем у немодифицированного пептида I ($t_R = 13.22 \pm 0.04$ мин, $k' = 1.93 \pm 0.06$) с очень низкой гидрофобностью, и лишь немного отличалось от времени удерживания растворителя (свободного объема колонки). Расхождение между экспериментальными и теоретическими значениями гидрофобности для пептида IV может быть обусловлено ослаблением его взаимодействия с гидро-

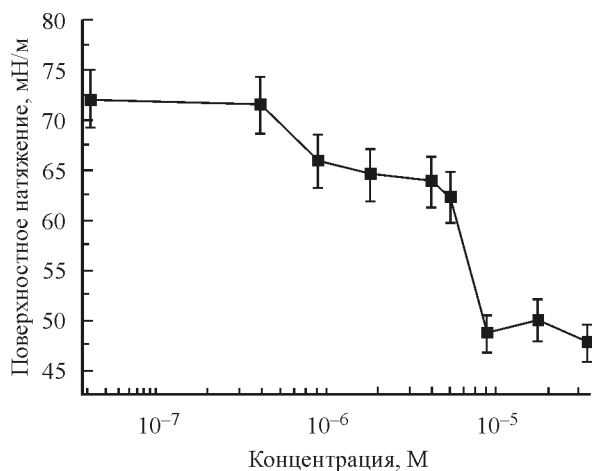


Рис. 2. Зависимость поверхностного натяжения от концентрации пептида IV.

По оси абсцисс — отрицательный десятичный логарифм концентрации пептида IV, М; по оси ординат — поверхностное натяжение, мН/м.

фобной фазой колонки. Наиболее вероятной причиной этого является образование мицеллоподобных структур молекулами пептида IV, ведущее к уменьшению площади его контакта с колонкой.

Для проверки этого исследовали элюирование пептида IV с колонки Nucleosil C8 в том же градиентном режиме, но при повышении концентрации ТФУК с 0.1 до 0.5 %. Увеличение содержания ТФУК в элюирующей смеси ведет к разрушению вторичной и третичной структур пептидов и предотвращает образование мицелл (Naeem et al., 2006). Для сравнения исследовали элюирование пептида III. Время удерживания пептида IV при повышении концентрации ТФУК резко увеличивалось — с 6.72 ± 0.03 до 21.83 ± 0.11 мин, в то время как время удерживания пептида III немного снижалось — с 22.37 ± 0.15 до 17.24 ± 0.09 мин. Эти данные указывают на способность пептида IV при низкой концентрации ТФУК (0.1 %) образовывать мицеллы, которые разрушаются при повышении концентрации кислоты до 0.5 %, в то время как в случае пептида III процесс мицеллообразования в изученных нами условиях выявлен не был.

Дополнительным подтверждением способности пептида IV к мицеллообразованию стали результаты экспериментов по поиску значения ККМ для его водного раствора. Изучили широкий диапазон концентраций пептида — от 10^{-9} до 10^{-4} М. Значение поверхностного натяжения водного раствора пептида IV постепенно снижалось с увеличением его концентрации до $5.8 \cdot 10^{-6}$ М, но затем в концентрации $8.8 \cdot 10^{-6}$ М отмечалось его резкое падение и выход на плато (рис. 2). По перегибу кривой зависимости поверхностного натяжения от логарифма концентрации пептида определили значение ККМ, которое соответствовало концентрации $7.1 \cdot 10^{-6}$ М и указывало на начало образования мицеллоподобных структур.

Обсуждение

Для повышения биологической активности GPCR-пептидов необходима модификация гидрофобными радикалами, которые сопоставимы по размеру и гидрофобности с трансмембранными участками рецепторов. Эти радикалы обеспечивают эффективный транспорт пептидов через плазматическую мембрану к мишеням их действия, способствуют их закреплению в мембране вблизи трансмембранного канала рецептора, что позволяет GPCR-пептидам эффективно взаимодействовать с комплементарными им участками рецептора, а также стабилизируют их вторичную и третичную структуры (Shpakov, 2011; Shpakov, Shpakova, 2014a, 2014b). Наиболее эффективной признана модификация GPCR-пептидов пальмитоильными радикалами, которые близки трансмембранным участкам по физико-химическим свойствам. Важно отметить, что немодифицированные пептиды обладают сравнительно низкой активностью в сравнении с пальмитоилированными аналогами, что показано нами как в экспериментах *in vitro*, так и при изучении влияния GPCR-пептидов на функции эндокринной системы *in vivo* (Деркач и др., 2014; Derkach et al., 2015). Большое значение для активности GPCR-пептидов имеет локализация в нем гидрофобного радикала — он должен располагаться в локусе пептида, который в полном размере рецепторе соседствует с трансмембранным участком. Только в этом случае гидрофобный радикал мимикрирует трансмембранный

участок рецептора и обеспечивает правильное расположение GPCR-пептида при его закоривании в плазматической мембране (Shpakov, Shpakova, 2014a). Подтверждением этого являются наши данные о том, что у производных пептида 562—572, ацилированных пальмитатом и деканоатом с N-конца, где в ЛГР расположены гидрофильные сегменты третьей цитоплазматической петли, биологическая активность отсутствует, в то время как аналоги пептида, ацилированные с C-конца, предшествующего шестому трансмембранному участку рецептора, являются биологически активными.

При изучении биологической активности пептида IV, ацилированного деканоильными радикалами сразу с обоих концов, нами выявлено парадоксальное явление снижения стимуляции им базальной активности АЦ в мембранах семенников и яичников крыс при повышении концентрации пептида IV выше 10^{-5} М. В концентрации 10^{-3} М стимулирующее действие пептида IV составило 80 (семенники) и 73 (яичники) % от максимального результата, наблюдаемого при концентрации 10^{-5} М. Для пептидов III и VI, модифицированных жирнокислотными остатками с C-конца, такой колоколообразной зависимости выявлено не было (рис. 1). Это позволило предположить, что введение в ацилированный с C-конца пептид N-концевого деканоата меняет его структуру и способность к агрегации, что и приводит к ослаблению биологической активности при повышении концентрации до 10^{-3} М.

Способность пептидов, модифицированных гидрофобными радикалами, к агрегации и формированию мицеллоподобных структур в значительной степени влияет на их биологическую активность, внутриклеточный транспорт, биодоступность и биодеградацию (Chorineau et al., 1998; Avrahami, Shai, 2004; Mas-Moruno et al., 2008; Vad et al., 2010; Sikorska, Kwiatkowska, 2013). Вследствие этого изучение способности липофильных производных GPCR-пептидов к образованию мицелл и других упорядоченных структур имеет большое значение для оценки и предсказания их специфической биологической активности. Для изучения способности пептида IV образовывать мицеллоподобные структуры мы использовали обращенно-фазовую ВЭЖХ и оценили значения ККМ для водного раствора этого пептида.

Показано, что высокогидрофобный пептид IV имеет очень низкое время удерживания, сопоставимое со временем удерживания растворителя. Время его удерживания на колонке Nucleosil C8 уступает таковому даже пептида II с наиболее низкой гидрофобностью из изученных ацилированных пептидов. В этой связи необходимо отметить, что полипептиды, имеющие третичную структуру, при прохождении через колонку с гидрофобным сорбентом элюируются значительно раньше, т. е. имеют меньшие времена удерживания, чем ожидается на основе теоретических расчетов их гидрофобности. Это вызвано тем, что гидрофобные группы аминокислот в этих полипептидах вовлечены во взаимодействие между собой, а не с гидрофобной поверхностью сорбента, что снижает эффективность взаимодействия компактно свернутой полипептидной цепи с неподвижной гидрофобной фазой (Geng, Regnier, 1994). В нашем случае основной причиной ослабления взаимодействия между пептидом IV с сорбентом, как мы полагаем, является как внутримолекулярная, так и межмолекулярная агрегация пептида, осуществляемая за счет гидрофобных взаимодействий между углеводородными цепями деканоильных остатков. Такая агрегация выключает жирнокислот-

ные радикалы из взаимодействия с гидрофобной фазой колонки.

Для проверки этого исследовали элюирование пептида IV с помощью той же элюирующей смеси, но с повышенной в 5 раз концентрацией ТФУК. Как известно, повышение концентрации ТФУК препятствует ассоциации липофильных пептидов в мицеллоподобные структуры (Naeem et al., 2006). Вследствие этого теоретически предсказанный порядок элюирования гидрофобных пептидов с обращенно-фазовой ВЭЖХ колонки, определяемый степенью их гидрофобности, должен в значительной степени совпадать с порядком их элюирования в экспериментальных условиях, что и наблюдалось в нашем случае. При элюировании пептидов смесью вода/ацетонитрил/0.5 % ТФУК с градиентом ацетонитрила 20—50 % время выхода пептида IV, содержащего два деканоильных радикала, существенно превышало время выхода пептида III с C-концевой пальмитоильной группой, который, в соответствии с теоретическими расчетами, уступал по гидрофобности пептиду IV. Другими словами, порядок элюирования в этом случае восстанавливался. Полученные данные указывают на то, что аномальное поведение пептида IV при его элюировании с обращенно-фазовой ВЭЖХ колонки смесью с низким (0.1 %) содержанием ТФУК обусловлено его самоагрегацией с образованием мицеллоподобных структур.

Доказательством способности пептида IV к образованию мицелл стали результаты исследований по измерению поверхностного натяжения его водного раствора, которые показали, что пептид IV начинает образовывать мицеллы в концентрации $7 \cdot 10^{-6}$ М. Как отмечалось выше, вблизи этой концентрации он в наибольшей степени стимулирует базальную активность АЦ во фракциях плазматических мембран семенников и яичников. В дальнейшем при повышении концентрации степень агрегации усиливается, что приводит к снижению концентрации свободного пептида, способного к функциональному взаимодействию с ЛГР. Результатом являлось парадоксальное снижение стимулирующего влияния на активность АЦ. Важно отметить, что в концентрации 10^{-5} М по своему стимулирующему действию пептид IV сопоставим с наиболее активным пептидом VI, модифицированным пальмитатом с C-конца. Однако в концентрации 10^{-3} М он в значительной степени уступал не только пептиду VI, но был менее активен в сравнении с пептидом III, который модифицирован с C-конца деканоатом.

Полученные данные указывают на то, что способность липофильных производных GPCR-пептидов к самоагрегации и мицеллообразованию должна учитываться при разработке их новых мембраноактивных аналогов. Образование межмолекулярных комплексов между GPCR-пептидами, модифицированными гидрофобными радикалами, может существенно влиять на их биологическую активность как *in vitro*, так и *in vivo*. При использовании в условиях *in vivo* образование мицеллоподобных структур GPCR-пептидами может обеспечить более эффективный их транспорт, модифицировать специфическую биологическую активность, повысить протеолитическую устойчивость, но при этом может происходить снижение или даже потеря GPCR-пептидами специфической биологической активности.

Работа выполнена при поддержке грантом СПбГУ № 12.38.220.2015 и с использованием оборудования ресурсного центра СПбГУ.

Список литературы

- Деркач К. В., Шпакова Е. А., Шпаков А. О. 2014. Пальмитоилированный пептид 562—572 рецептора лютеинизирующего гормона повышает уровень тестостерона у самцов крыс. Бюл. эксперим. биол. мед. 158 (8) : 172—176. (Derkach K. V., Shpakova E. A., Shpakov A. O. 2014. Palmitoylated peptide 562—572 of luteinizing hormone receptor increases testosterone level in male rats. Bull. Exp. Biol. Med. 158 (2) : 209—212.)
- Шпаков А. О., Деркач К. В. 2015. Новые достижения в разработке и применении GPCR-пептидов. Журн. эволюц. биохим. физиол. 51 (1) : 11—16. (Shpakov A. O., Derkach K. V. 2015. New achievements in development and application of GPCR-peptides. J. Evol. Biochem. Physiol. 51 (1) : 11—18.)
- Шпаков А. О., Деркач К. В., Бондарева В. М. 2010. Снижение чувствительности аденилатциклазы и гетеротримерных G-белков к действию хорионического гонадотропина и пептидных гормонов в тканях репродуктивной системы крыс с экспериментальным диабетом 2-го типа. Биомед. химия. 56 (6) : 700—709. (Shpakov A. O., Derkach K. V., Bondareva V. M. 2010. A decrease of the sensitivity of adenylyl cyclase and heterotrimeric G proteins to chorionic gonadotrophin and peptide hormones action in the tissues of reproductive system in rats with experimental type 2 diabetes. Biochemistry (Moscow). Suppl. Ser. B: Biomed. Chem. 4 (3) : 258—263.)
- 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. 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 Biol. 6 (1) : 16—25.)
- Шпакова Е. А., Деркач К. В., Шпаков А. О. 2013. Биологическая активность липофильных производных пептида 562—572 рецептора лютеинизирующего гормона крысы. Докл. РАН. 452 (4) : 453—456. (Shpakova E. A., Derkach K. V., Shpakov A. O. 2013. Biological activity of lipophilic derivatives of peptide 562—572 of rat luteinizing hormone receptor. Dokl. Biochem. Biophys. 452 (1) : 248—250.)
- 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. 2014. Regulation of adenylyl cyclase activity in rat testes by acylated derivatives of peptide 562—572 of a luteinizing hormone receptor. Cell Tissue Biol. 8 (2) : 152—159.)
- Avrahami D., Shai Y. 2004. A new group of antifungal and antibacterial lipopeptides derived from non-membrane active peptides conjugated to palmitic acid. J. Biol. Chem. 279 : 12 277—12 285.
- Chopineau J., Robert S., Fénart L., Cecchelli R., Lagoutte B., Paitier S., Dehouck M. P., Domurado D. 1998. Monoacylation of ribonuclease A enables its transport across an *in vitro* model of the blood-brain barrier. J. Control Release. 56 : 231—237.
- Cisowski J., O'Callaghan K., Kuliopulos A., Yang J., Nguyen N., Deng Q., Yang E., Fogel M., Tressel S., Foley C., Agarwal A., Hunt S. W., 3rd, McMurry T., Brinckerhoff L., Covic L. 2011. Targeting protease-activated receptor-1 with cell-penetrating peducins in lung cancer. Amer. J. Pathol. 179 : 513—523.
- Covic L., Gresser A. L., Talavera J., Swift S., Kuliopulos A. 2002. Activation and inhibition of G protein-coupled receptors by cell-penetrating membrane-tethered peptides. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 99 : 643—648.
- Derkach K. V., Shpakova E. A., Titov A. M., Shpakov A. O. 2015. Intranasal and intramuscular administration of lysine-palmitoylated peptide 612—627 of thyroid-stimulating hormone receptor increases the level of thyroid hormones in rats. Int. J. Pept. Res. Ther. 21 : 249—260.
- Geng X., Regnier F. E. 1984. Retention model for proteins in reversed-phase liquid chromatography. J. Chromatogr. 296 : 15—30.
- Mas-Moruno C., Cascales L., Cruz L. J., Mora P., Pérez-Payá E., Albericio F. 2008. Nanostructure formation enhances the activity of LPS-neutralizing peptides. ChemMedChem. 3 : 1748—1755.
- Naeem A., Ashraf M. T., Akram M., Khan R. H. 2006. Comparative study of effects of polyols, salts, and alcohols on trichloroacetic acid-induced state of cytochrome C. Biochemistry (Moscow). 71 : 1101—1109.
- Severino B., Incisivo G. M., Fiorino F., Bertolino A., Freccese F., Barbato F., Manganelli S., Maggioni G., Capasso D., Caliendo G., Santagada V., Sorrentino R., Roviezzo F., Perissutti E. 2013. Identification of a peducin acting as S1P3 receptor antagonist. J. Pept. Sci. 19 : 717—724.
- Shpakov A. O. 2011. Signal protein-derived peptides as functional probes and regulators of intracellular signaling. J. Amino Acids. 2011 : DOI:10.4061/2011/656051.
- Shpakov A. O., Chistyakova O. V., Derkach K. V., Moiseyuk I. V., Bondareva V. M. 2012a. 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., Pertseva M. N. 2007. The peptide strategy as a novel approach to the study of G protein-coupled signaling systems. In: Signal transduction research trends (ed. N. O. Grachevsky). Nova Science Publishers, Inc. 45—93.
- Shpakov A. O., 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 4). In: Protein purification and analysis. III. Methods and applications. iConcept Press Ltd. <http://www.iconceptpress.com/books/protein-purification-and-analysis-iii-methods-and-applications/>. 35 p.
- Shpakov A. O., Shpakova E. A., Derkach K. V. 2012b. The sensitivity of the adenylyl cyclase system in rat thyroidal and extrathyroidal tissues to peptides corresponding to the third intracellular loop of thyroid-stimulating hormone receptor. Curr. Top. Pept. Prot. Res. 13 : 61—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.
- Sikorska E., Kwiatkowska A. 2013. Micelle-bound conformations of neurohypophyseal hormone analogues modified with a Ca -disubstituted residue: NMR and molecular modelling studies. J. Biomol. Struct. Dyn. 31 : 748—764.
- Tressel S. L., Koukos G., Tchernochev B., Jacques S. L., Covic L., Kuliopulos A. 2011. Pharmacology, biodistribution, and efficacy of GPCR-based peducins in disease models. Meth. Mol. Biol. 683 : 259—275.
- Vad B., Thomsen L. A., Bertelsen K., Franzmann M., Pedersen J. M., Nielsen S. B., Vosegaard T., Valnickova Z., Skrydstrup T., Enghild J. J., Wimmer R., Nielsen N. C., Otzen D. E. 2010. Divorcing folding from function: how acylation affects the membrane-perturbing properties of an antimicrobial peptide. Biochim. biophys. acta. 1804 : 806—820.
- Winkel D. 1965. Theoretical refinement of the pendant drop method for measuring surface tensions. J. Phys. Chem. 69 : 348—350.

THE RELATIONSHIP BETWEEN PHYSICAL-CHEMICAL CHARACTERISTICS
AND BIOLOGICAL ACTIVITY OF PEPTIDE 562—572 OF LUTEINIZING HORMONE
RECEPTOR MODIFIED BY DECANOYL RADICALS AT THE N- AND C-TERMINI

*E. A. Sphakova,¹ V. N. Sorokoumov,¹ A. V. Akenti'ev,¹ K. V. Derkach,²
T. B. Tennikova, A. O. Shpakov^{2,*}*

¹ St. Petersburg State University, Institute of Chemistry, St. Petersburg, 198504,
and ² I. M. Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry RAS, St. Petersburg, 194223;

* e-mail: alex_shpakov@list.ru

Lipophilic derivatives of peptides corresponding to the cytoplasmic regions associated with the G-protein coupled receptors (GPCRs) are capable of functioning as an intracellular agonist. Previously, we have shown that peptides corresponding to region 562—572 of luteinizing hormone receptor (LHR) and modified by decanoate and palmitate at the C-terminus activate adenylyl cyclase (AC) in the testes of rats. The stimulating effect of peptide 562—572 modified by decanoates at the N- and C-termini (IV) peaked at a concentration of 10^{-5} M and then subsequently decreased with increasing concentration. We hypothesized that this may be due to ability of the peptide IV to micelle formation. To test this suggestion, we examined the relationship between biological activity, hydrophobicity and ability to micelle formation for peptide IV and other acylated derivatives of peptide 562—572 including the derivatives containing C-terminal decanoate (III) and palmitate (VI). It has been shown that the stimulating effect of peptide IV at a concentration of 10^{-5} M on AC activity in the plasma membranes of rat testes and ovaries is only slightly inferior to that of peptide VI and superior to the corresponding effect of peptide III. The effect of peptide IV at a concentration of 10^{-3} M was reduced by 20—27 % and amounted to 50—51 and 87—88 % of that of peptides VI and III, respectively. Despite the high hydrophobicity, the peptide IV had abnormally low retention time in reverse-phase HPLC when it was eluted from the Nucleosil C8 column, even lower than that of unmodified peptide 562—572. However, with increasing concentration of trifluoroacetic acid in the eluent from 0.1 to 0.5 % causing the destruction of micelle-like structures, the retention time of the peptide IV was significantly increased, whereas it remained unchanged in the case of the other peptides. Surface tension of aqueous solution of peptide IV insignificantly decreased with the increase of its concentration, but then, at peptide concentration of $7 \cdot 10^{-6}$ M, the sharp decline and the plateau were found, which indicates the beginning of the formation of micelles. Thus, at concentration of 10^{-5} M and higher the peptide IV forms micelles which prevents its interaction with the receptor. The ability of GPCR-peptides to self-aggregation and micelle formation should be taken into account when developing their membrane-active analogues.

Key words: peptide, luteinizing hormone receptor, hydrophobicity, micellization, adenylyl cyclase, decanoyl radical