



УДК 541.124:546.11.2

СВЯЗЫВАНИЕ АНАЛОГА АСТН-(4–10)-ГЕПТАПЕПТИДА СЕМАКС С ПЛАЗМАТИЧЕСКИМИ МЕМБРАНАМИ БАЗАЛЬНЫХ ЯДЕР ПЕРЕДНЕГО МОЗГА КРЫСЫ И ЕГО БИОДЕГРАДАЦИЯ

© 2004 г. О. В. Долотов, Ю. А. Золотарев, Е. М. Дорохова, Л. А. Андреева, Л. Ю. Алфеева, И. А. Гривенников[#], Н. Ф. Мясоедов

Институт молекулярной генетики РАН, 123182, Москва, пл. Курчатова, д. 2

Поступила в редакцию 13.02.2003 г. Принята к печати 12.03.2003 г.

Изучены характеристики связывания Семакса (Met-Glu-His-Phe-Pro-Gly-Pro) с плазматическими мембранами базальных ядер переднего мозга крысы и динамика его деградации при инкубации с данными мембранами. Показано, что связывание однородно меченного тритием [$G-^3H$]Семакса зависит от времени, специфично и обратимо. Специфическое связывание гептапептида зависит от ионов кальция и характеризуется величинами константы диссоциации лиганд-рецепторного комплекса K_d $2.41 \pm 1.02 \times 10^{-9}$ М и концентрации связывающих центров V_{max} $33.5 \pm 7.9 \times 10^{-15}$ моль/мг белка. Разработан метод исследования биodeградации Семакса в присутствии плазматических мембран мозга крысы, основанный на использовании однородно меченного тритием пептида и хроматографическом анализе образующихся пептидных фрагментов методом ВЭЖХ с УФ-детекцией одновременно при 220 и 254 нм. Показано, что в присутствии плазматических мембран мозга крысы время полураспада Семакса превышает 1 ч. Предполагается, что основными ферментами, ответственными за его биodeградацию, являются дипептидиламинопептидазы, приводящие к последовательному образованию пентапептида HFPGP и трипептида PGP.

Ключевые слова: гептапептид Семакс; плазматические мембраны мозга; лиганд-рецепторный комплекс; биodeградация пептидов; меченные тритием пептиды.

ВВЕДЕНИЕ

N-Концевые фрагменты адренокортикотропного гормона (АСТН) и различные виды (альфа, бета и гамма) меланоцитстимулирующего гормона входят в состав семейства меланокортиновых пептидов с выраженным действием на функции центральной нервной системы (ЦНС). Пептиды этого семейства обладают нейротрофическими, ноотропными и нейропротекторными свойствами [1]. В Институте молекулярной генетики РАН был синтезирован гептапептид Met-Glu-His-Phe-Pro-Gly-Pro (Семакс), соответствующий (4–10)-фрагменту АСТН (АСТН-(4–10)), полностью лишенный гормональной активности и обладающий свойствами ноотропа [2]. Данный пептид содержит последовательность Pro-Gly-Pro, повышающую его устойчивость к действию пептидаз. Экспериментальные исследования выявили серьезные преимущества Семакса перед природным АСТН-(4–10): полное отсутствие токсических и побочных действий, большая (более чем в 20 раз) продолжительность эффекта, относительно высокая устойчивость в организме: период его полураспада составляет несколько минут, а терапевти-

ческое действие сохраняется при однократном введении от 24 до 48 ч. Семакс, являясь регулятором функций ЦНС, в очень малых дозах (3–30 мкг/кг) обладает выраженным ноотропным эффектом. Он стимулирует функции переднего мозга: усиливает избирательное внимание в момент восприятия информации, улучшает консолидацию памяти, повышает способность к обучению [3, 4]. При этом, в отличие от большинства ноотропных препаратов непептидной природы, Семакс не вызывает истощения соответствующих функций. Клинические исследования показали высокую эффективность этого пептида при лечении интеллектуально-мнестических расстройств и астенических состояний различного генеза, а также при профилактике и лечении постнаркозных мнестических нарушений [3–6]. Большие дозы Семакса (150–300 мкг/кг) оказывают более выраженное антигипоксическое и нейропротективное действие при экспериментальном ишемическом инсульте, увеличивая выживаемость животных и уменьшая выраженность неврологического дефекта [7, 8]. Наши недавние работы выявили способность этого пептида увеличивать время жизни нервных клеток в первичных культурах, предотвращая их гибель [9, 10]. Было также показано, что Семакс способен стимулировать экспрессию

[#] Автор для переписки (тел.: (095) 196-00-14; факс: (095) 196-02-21; эл. почта: igorag@img.ras.ru).

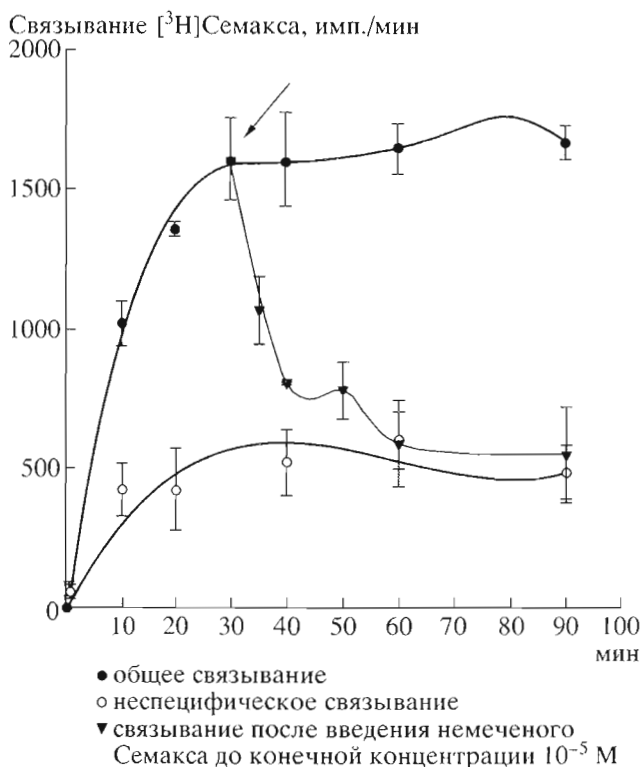


Рис. 1. Зависимость от времени связывания $[^3\text{H}]$ Семакса с плазматическими мембранами базальных ядер переднего мозга крысы. Стрелкой указано введение немеченого Семакса до конечной концентрации 10 мкМ .

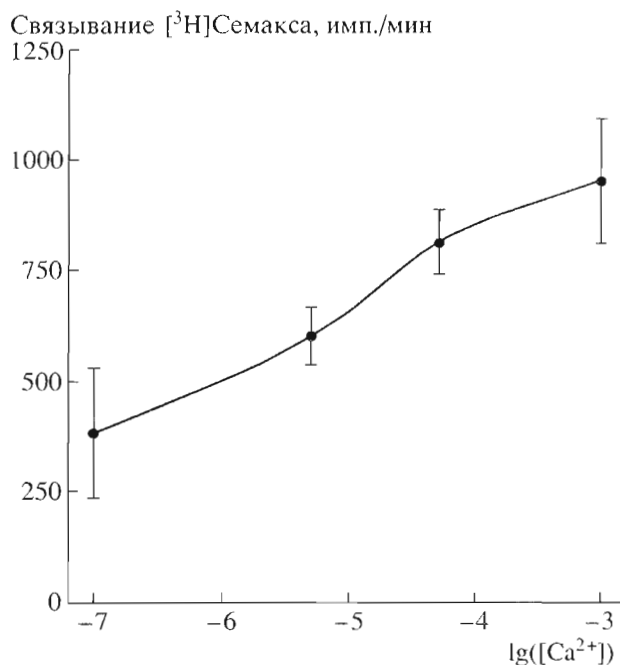


Рис. 2. Зависимость специфического связывания $[^3\text{H}]$ Семакса с плазматическими мембранами базальных ядер переднего мозга крысы от концентрации ионов кальция в среде инкубации.

мРНК для фактора роста нервов (NGF) и нейротрофического фактора мозга (BDNF) в первичных культурах глиальных клеток, полученных из базальных ядер переднего мозга крысы [11].

Следует отметить, что вопрос о действии аналогов АСТН-(4–10) через известные меланокортиновые рецепторы не решен до настоящего времени, и предполагается существование для них еще по крайней мере одного, неопisanного типа рецепторов [12, 13].

Цель настоящей работы – изучение характеристик связывания Семакса с плазматическими мембранами базальных ядер переднего мозга крысы и изучение динамики его деградации при инкубации с данными мембранами.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Важным аспектом изучения механизма действия Семакса является вопрос о том, проникает ли он внутрь клетки или действует через трансмембранные клеточные рецепторы. Предпринятые ранее попытки выявить связывание этого пептида с плазматическими мембранами, полученными из целого мозга крысы, оказались неудачными [14]. Отсутствие связывания Семакса с такими мембрана-

ми могло свидетельствовать либо о низкой концентрации связывающих центров для Семакса в целом мозге, либо о нерецепторном механизме действия этого гептапептида. С другой стороны, физиологические эффекты Семакса указывают на то, что одной из мишеней действия пептида являются базальные ядра переднего мозга – отдела, считающегося ответственным за восприятие информации и внимание. Кроме того, нами были получены данные о способности Семакса увеличивать выживаемость холинэргических нейронов в первичных культурах, полученных из переднего мозга крысы [9]. В связи с этим мы проверили предположения как о проникновении этого пептида в клетки, так и о наличии центров связывания для него на плазматических мембранах базальных ядер переднего мозга. Мы не смогли показать проникновения меченого тритием гептапептида в культивируемые первичные глиальные и нейронные клетки, полученные из эмбрионального переднего мозга крысы (данные не приведены). С другой стороны, нам удалось показать связывание $[^3\text{H}]$ Семакса с плазматическими мембранами базальных ядер переднего мозга крысы. Данные, представленные на рис. 1, показывают, что связывание зависит от времени, специфично и обратимо, что отвечает основным критериям лиганд-рецепторного взаимодействия. Специфическое связывание гептапептида зависит от присутствия в инкубационной среде ионов кальция (рис. 2), в то время как ионы магния и марганца не оказывали

влияния на его связывание с мембранами. Изо-терма связывания гептапептида при представлении в координатах Скэтчарда имеет линейный вид, и связывание наилучшим образом описывается одноцентровой моделью (рис. 3) с константой диссоциации лиганд-рецепторного комплекса $K_d = 2.41 \pm 1.02 \times 10^{-9}$ М и концентрацией связывающих центров $B_{max} = 33.5 \pm 7.9 \times 10^{-15}$ моль/мг белка.

К настоящему времени охарактеризовано пять подтипов меланокортиновых рецепторов, три из которых (обозначаемые как MC3-R, MC4-R и MC5-R) экспрессируются в мозге млекопитающих [15]. Показано, что передача сигнала от этих рецепторов внутрь клетки происходит через соответствующую G-белки и регуляция аффинности рецепторов осуществляется внеклеточными ионами кальция [16]. Интересно отметить, что количество связанного гептапептида также зависит от ионов кальция, и вопрос о принадлежности охарактеризованных нами связывающих центров к известным меланокортиновым рецепторам требует дальнейшего исследования.

Отличительной чертой действия регуляторных пептидов в организме является их быстрая деградация под действием эндогенных протеолитических ферментов. При этом образуется набор продуктов, которые также могут обладать специфической физиологической активностью [17] и, в частности, могут конкурировать за участки связывания исходного пептида. Это существенно усложняет интерпретацию экспериментальных данных по специфическому связыванию пептидов, равно как и выяснение молекулярных механизмов их действия. Вследствие этого мы изучили деградацию гептапептида Семакс при его инкубации с плазматическими мембранами, полученными из базальных ядер переднего мозга крыс. Для разделения меченных тритием фрагментов Семакса использовали ВЭЖХ в градиенте ацетонитрила смеси, состоящей из пептидных экстрактов инкубационной смеси и немеченых фрагментов Семакса (рис. 4). Использовали УФ-детекцию при

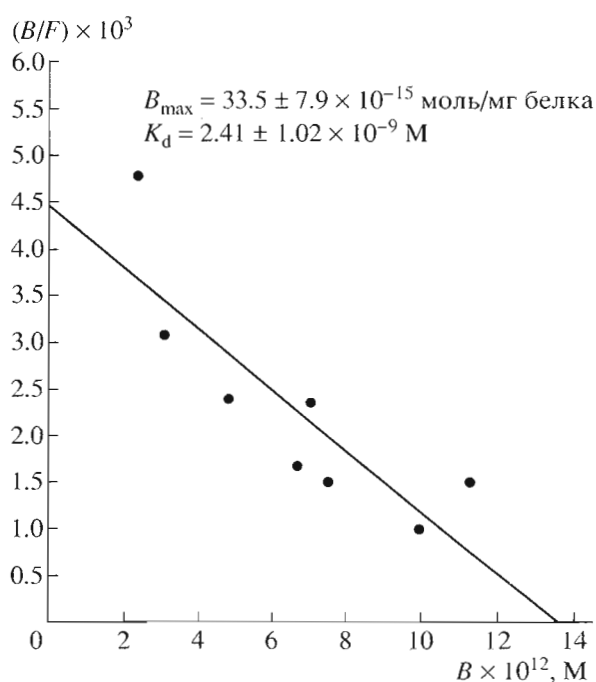


Рис. 3. Обработка результатов экспериментов по связыванию [³H]Семакса с плазматическими мембранами базальных ядер переднего мозга крысы в координатах Скэтчарда. *B* и *F* – концентрация связанного и свободного лиганда (М).

двух длинах волн. Концентрации меченых фрагментов рассчитывали по результатам жидкостного сцинтилляционного счета выделенных пептидных фракций.

Изучение деградации пептида подтвердило предположение о преимущественном отщеплении *N*-концевых аминокислот от исходной пептидной последовательности (таблица). При этом обращает на себя внимание практически полное отсутствие пептида ЕНFPGP среди идентифицированных продуктов деградации. В то же время пентапептид HFPGP является доминирующим продуктом протеолиза, преобладающим и при длительных

Анализ содержания (нМ) пептидных фрагментов при биодеградации Семакса (МЕНFPGP) в присутствии плазматических мембран переднего мозга крысы

Пептид	Молярная радиоактивность, Ки/ммоль	Время инкубации, мин					
		15	30	60	120	240	1440
PGP	15.7	0	2	17	34	43	36
ЕНFPGP	43.9	0	1	2	1	0	0
FPGP	16.3	0	0	7	11	18	6
HFPGP	41.4	31	52	96	114	103	44
МЕНFPG	41.8	7	13	14	13	7	2
МЕНFP	29.3	15	29	25	32	12	2
МЕНFPGP	45	370	344	277	157	78	13

В опыт вводили 20 мкКи/мл (440 нМ) [³H]МЕНFPGP.

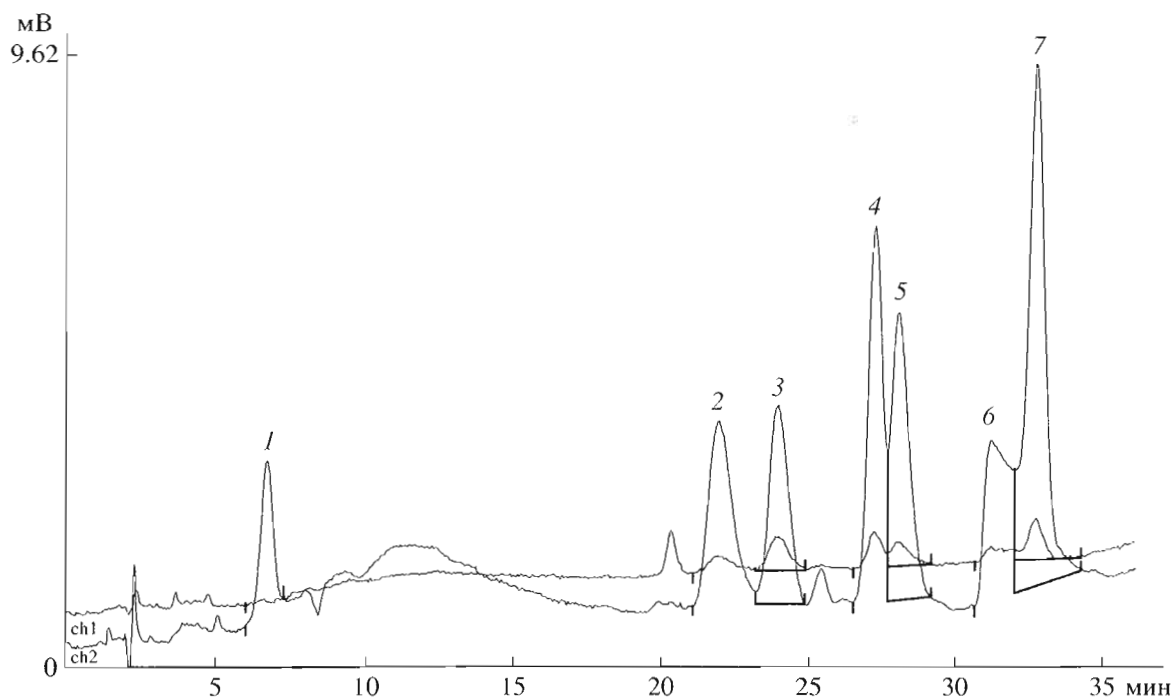


Рис. 4. Хроматография смеси пептидных фрагментов Семакса и пептидной фракции, экстрагированной из образца. Контроль при 254 (ch1) и 220 нм (ch2). Фракция 1 – пептид PGP, 2 – ENFPGP, 3 – FPGP, 4 – HFPGP, 5 – MENFPG, 6 – MENFP, 7 – MENFPGP.

временах инкубации. В этой связи важно отметить, что гептапептид Семакс и пентапептид HF-PGP – мощные ингибиторы энкефалинрасщепляющих ферментов человеческой сыворотки [18]. Возможно, здесь мы сталкиваемся с интересной ситуацией, когда нейроактивный пептид и его метаболит “регулируют” процесс своей биодegradации, ингибируя часть пептидаз. В связи с этим вопрос о том, не являются ли охарактеризованные нами центры связывания мембраносвязанными пептидазами, остается открытым. По-видимому, часть эффектов Семакса обусловлена действием пентапептида HFPGP, на что указывают имеющиеся данные о его влиянии на поведение экспериментальных животных [17]. В дальнейшем предполагается изучить способность различных продуктов degradation Семакса влиять на его связывание с плазматическими мембранами мозга.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Выделение мембран. Крыс линии Вистар (самцы) массой 200–250 г декапитировали, извлеченный передний мозг промывали холодным фосфатно-солевым буфером (10 мМ фосфат натрия, 150 мМ хлорид натрия, pH 7.4) и гомогенизировали в 10 объемах 10 мМ Трис-НСl-буфера pH 7.4, содержащего 0.32 М сахарозу, 1 мМ EDTA, 1 мМ бензамидин и 0.1 мМ фенилметилсульфонилфторид (буфер А) в гомогенизаторе тефлон–стекло.

Гомогенизацию и все последующие операции проводили при температуре 4°C. Гомогенат центрифугировали в течение 20 мин при 1000 g, осадок отбрасывали, а супернатант подвергали повторному центрифугированию при 40000 g в течение 30 мин. Плотный коричневый осадок на дне пробирки, обогащенный митохондриями, отбрасывали, а менее плотный светлый осадок суспендировали в буфере А, переносили в чистую пробирку и дважды промывали этим буфером, осаждая мембраны центрифугированием, аналогичным предыдущему. По окончании промывок осадок суспендировали в 10 мМ Трис-НСl, pH 7.4, содержащем 0.22 М сахарозу и 1 мг/мл BSA и хранили в жидком азоте. Концентрация белка в образцах мембран, определенная по методу Лоури, составляла 5–10 мг/мл.

Радиорецепторный анализ. Эксперименты по связыванию гептапептида Семакс с плазматическими мембранами проводили в 3.5-мл полистирольных пробирках. Использовался меченный тритием пептид с удельной активностью 60–120 Ки/ммоль. Синтез Семакса и его мечение радиоактивным тритием было осуществлено в ИМГ РАН. Реакционная смесь (конечный объем 1 мл) содержала 10 нМ [³H]Семакс и 1 мМ CaCl₂ в 50 мМ Трис-НСl-буфере, pH 7.4 (буфер Б) и немеченый Семакс в соответствующих концентрациях. Реакцию начинали добавлением 0.2 мг мембранного белка в 0.2 мл того же буфера. Пробирки переносили в шейкер-

инкубатор и выдерживали соответствующее время при температуре 30°C при постоянном перемешивании. По окончании инкубации пробы фильтровали через стекловолоконные фильтры GF/B (Whatman), предварительно вымоченные в 0.3% растворе полиэтиленimina в течение 2 ч при 4°C. Каждую пробирку промывали один раз холодным 50 мМ Трис-НСl pH 7.4 (3 мл) и затем три раза фильтр тем же объемом этого буфера. Фильтры сушили на воздухе и переносили в сцинтилляционные флаконы, содержащие 5 мл сцинтилляционной смеси (4 г PPO, 0.2 г POPOP на 1 л толуола). Радиоактивность определяли на сцинтилляционном счетчике "Mark-3" (Nuclear Chicago, США) с эффективностью около 30%. Неспецифическое связывание определяли как количество метки, не вытесняемое 0.1 мМ немеченым пептидом. Обратимость связывания с мембранами выявляли путем вытеснения связанной метки избытком немеченого Семакса (в среду инкубации добавляли 10 мкл 10 мМ немеченого пептида до конечной концентрации 10 мкМ).

Изучение биодеградации Семакса в присутствии плазматических мембран проводили в 50-мл полипропиленовых пробирках. Использовался меченный тритием исходный пептид с удельной активностью 45 Ки/ммоль. Реакционная смесь общим объемом 5 мл содержала 20 мкКи/мл [³H]Семакса и 1 мМ СаСl₂ в 50 мМ Трис-НСl-буфере pH 7.4. Реакцию начинали добавлением мембранного белка до концентрации 0.2 мг/мл. Пробирки переносили в шейкер-инкубатор и выдерживали соответствующее время при температуре 30°C при постоянном перемешивании. В указанные промежутки времени из инкубационной смеси отбирали аликвоты объемом 400 мкл в полипропиленовые микропробирки (Eppendorf), инкубировали 2 мин при 100°C и центрифугировали при 4°C 15 мин при 15000 g. Супернатант отбирали и хранили при -20°C.

Для определения содержания Семакса и его фрагментов в биологических пробах проводили экстрагирование пептидной фракции образцов с помощью органических растворителей, с последующей ВЭЖХ полученных экстрактов. К образцу 200 мкл прибавляли 4-кратный объем ацетонитрила. Смесь центрифугировали при 4°C 15 мин при 12000 g. Отбирали супернатант и высушивали его в роторном испарителе. Сухой остаток растворяли в 1 мл метанола. Центрифугировали при тех же условиях, супернатант снова высушивали в роторном испарителе, сухой остаток растворяли в 100 мкл дистиллированной воды.

Выделение [³H]Семакса ([³H]МЕНFPGP) и его метаболитов – [³H]ЕНFPGP, [³H]HFPGP, [³H]FPGP, [³H]МЕНFPG, [³H]МЕНFP и [³H]PGP – из полученных образцов проводили методом ВЭЖХ со спектрофотометром Beckman при длинах волн 220 и

254 нм, колонкой "Kromasil" (4 × 150 мм), зернение 5 мкм при 20°C. Полученные образцы смешивали с Семаксом и его метаболитами (по 5 мкг каждого пептида) и подвергали градиентному элюированию в смеси элюентов А (0.082% трифторуксусная кислота и 0.018% гептафтормасляная кислота) и В (80% ацетонитрил в элюенте А) с выделением пиков, соответствующих пептиду МЕНFPGP и его фрагментам. Использовали градиент от 8 (0 мин), 15 (8 мин) до 25% элюента В за 30 мин, при скорости потока 1 мл/мин (рис. 4). С помощью жидкостного сцинтилляционного счета рассчитывали содержание радиоактивности в объеме элюента, соответствующем каждому из разделяемых пиков. Молярную радиоактивность пептидных фрагментов Семакса рассчитывали по данным распределения тритиевой метки в [³H]МЕНFPGP, полученным с помощью тритиевого ЯМР, и содержания радиоактивности в пептидной фракции.

Работа выполнена при поддержке грантов Российского фонда фундаментальных исследований (гранты № 02-04-49236, 02-04-06256, 00-04-55055, 01-04-48978, 01-04-52010, 03-04-48582), гранта Президиума РАН "Физико-химическая биология" и гранта ИНТАС № INTAS YSF 2002-0336.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Strand F.L. // Ann. N. Y. Acad. Sci. 1999. V. 897. P. 1–16.
2. Пономарева-Степная М.А., Незавибатько В.Н., Антонова Л.В., Андреева Л.А., Алфеева Л.Ю., Потаман В.Н., Каменский А.А., Ашмарин И.П. // Хим.-фарм. журн. 1984. № 7. С. 790–795.
3. Пономарева-Степная М.А., Бахарев В.Д., Незавибатько В.Н., Андреева Л.А., Алфеева Л.Ю., Потаман В.Н. // Хим.-фарм. журн. 1986. № 6. С. 667–670.
4. Kaplan A.Ya., Kochetova A.G., Nezavibat'ko V.N., Rjasina T.V., Ashmarin I.P. // Neurosci. Res. Commun. 1996. V. 19. P. 115–123.
5. Ашмарин И.П., Незавибатько В.Н., Мясоедов Н.Ф., Каменский А.А., Гривенников И.А., Пономарева-Степная М.А., Андреева Л.А., Каплан А.Я., Кошелев В.Б., Рясина Т.В. // Журн. высш. нерв. деят. 1997. Т. 47. С. 420–430.
6. Каплан А.Я., Кошелев В.Б., Незавибатько В.Н., Ашмарин И.П. // Физиология человека. 1992. Т. 18. С. 104–107.
7. Волков А.В., Заржецкий Ю.В., Постнов А.Ю., Болякина Г.К., Каменский А.А., Муравьев О.Б., Мишарина Г.В., Геренко А.Н. Терминальные состояния и постреанимационная патология организма: патофизиология, клиника, профилактика и лечение. М.: Ин-т общей реаниматологии РАМН, 1992. С. 69–76.
8. Геренко А.Н., Незавибатько В.Н., Волков А.В., Каменский А.А. // Вестн. Моск. ун-та. 1991. Сер. 16. Биология. № 3. С. 24–30.

9. Grivennikov I.A., Dolotov O.V., Myasoedov N.F., Black I.B., Dreyfus C.F. // Society for Neuroscience 27th Annual Meeting, USA. 1997. V. 891, abstr. 354.13.
10. Гривенников И.А., Долотов О.В., Гольдина Ю.И. // Молекулярн. биология. 1999. Т. 33. С. 120–126.
11. Shadrina M.I., Dolotov O.V., Grivennikov I.A., Stominsky P.A., Andreeva L.A., Inozemtseva L.S., Limborska S.A., Myasoedov N.F. // Neurosci. Lett. 2001. V. 308. P. 115–118.
12. Adan R.A., Cone R.D., Burbach J.P., Gispén W.H. // Mol. Pharmacol. 1994. V. 46. P. 1182–1190.
13. Hol E.M., Verhage M., Gispén W.H., Bar P.R. // Brain Res. 1994. V. 662. P. 109–116.
14. Arefyeva I.A., Zaitzev D.A., Grivennikov I.A., Andreeva L.A., Potaman V.N., Nezavibat'ko V.N., Myasoedov N.F. // Neurosci. Res. Commun. 1992. V. 11. P. 37–44.
15. Hol E.M., Gispén W.H., Bar P.R. // Peptides. 1995. V. 16. P. 979–993.
16. Zohar M., Salomon Y.J. // Mol. Neurosci. 1993. V. 4. P. 55–62.
17. Кост Н.В., Соколов О.Ю., Габаева М.В., Гривенников И.А., Андреева Л.А., Мясоедов Н.Ф., Зозуля А.А. // Биоорган. химия. 2001. Т. 27. С. 180–183.
18. Левицкая Н.Г., Себенцова Е.А., Глазова Н.Ю., Воскресенская О.Г., Андреева Л.А., Алфеева Л.Ю., Каменский А.А., Мясоедов Н.Ф. // Докл. АН. 2000. Т. 372. С. 268–271.

The Binding of Semax, ACTH 4–10 Heptapeptide, to Plasma Membranes of the Rat Forebrain Basal Nuclei and Its Biodegradation

O. V. Dolotov, Yu. A. Zolotarev, E. M. Dorokhova, L. A. Andreeva, L. Yu. Alfeeva, I. A. Grivennikov[#], and N. F. Myasoedov

[#]Phone: +7 (095) 196-0014, fax: +7 (095) 196-0221,

e-mail: igorag@img.ras.ru

*Institute of Molecular Genetics, Russian Academy of Sciences,
pl. akademika Kurchatova 2, Moscow, 123182 Russia*

The binding characteristics of the peptide Semax (Met-Glu-His-Phe-Pro-Gly-Pro) to plasma membranes of basal nuclei of the rat forebrain and the dynamics of its degradation during its incubation with these membranes were studied. Binding of the homogeneously labeled [$G-^3H$]Semax was shown to be time-dependent, specific, and reversible. Specific binding of the heptapeptide depended on calcium ions and was characterized by the dissociation constant of the ligand–receptor complex $K_d = 2.41 \pm 1.02 \times 10^{-9}$ M and by the concentration of binding sites $B_{max} = 33.5 \pm 7.9 \times 10^{-15}$ mol/mg of protein. A method of studying Semax biodegradation in the presence of plasma membranes of rat brain was developed. It is based on the use of the peptide homogeneously labeled with tritium and on an HPLC analysis with UV detection at 220 and 254 nm of the peptide fragments formed. The half-life of Semax in the presence of the plasma membranes was demonstrated to be longer than 1 h. Dipeptidylaminopeptidases are considered to be the main enzymes responsible for its biodegradation; they successively cleave Semax to the HFPGP pentapeptide and the PGP tripeptide. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2004, vol. 30, no. 3; see also <http://www.maik.ru>.

Key words: Semax heptapeptide, plasma membranes of brain, ligand-receptor complex, peptide biodegradation, peptides labeled with tritium