

УДК 577.152.311

РОЛЬ β 1-ТИМОЗИНА В РЕГУЛЯЦИИ
Ca²⁺-КАЛЬМОДУЛИНЗАВИСИМЫХ ПРОЦЕССОВ МОЗГА
(РЕГУЛЯЦИЯ АКТИВНОСТИ ФДЭ
ЦИКЛИЧЕСКИХ НУКЛЕОТИДОВ)

ГАЛЮЯН А. А., ЧАИЛЯН С. Г., АБРАМЯН Г. Э.

Институт биохимии им Г. Х. Бутягяна АН Армении, Ереван

С помощью метода аффинной ВЭЖХ на колонках PDE-Biosphere и CaM-Biosphere показано, что в присутствии Ca²⁺ и Mg²⁺ β 1-тимозин гипоталамуса необратимо связывается с кальмодулином. Это свойство проявлялось в существенной инактивации индуцированной кальмодулином ферментативной активности ФДЭ, ограничивающейся уровнем базальной активности фермента. Определенные графически и методом аффинной ВЭЖХ с зональным элюированием эффективные константы ингибирования и K_d свидетельствуют о явно выраженном эффекте кооперативности при взаимодействии убиквитина с кальмодулином. Предполагается, что на молекуле кальмодулина имеются специфические центры связывания, при взаимодействии с которыми β 1-тимозин приводит к подавлению активирующего действия кальмодулина на фермент.

Число работ, в которых кальмодулину приписывают регуляторную роль в различных клеточных процессах, быстро растет: список чувствительных к кальмодулину систем пополняется все новыми и новыми наименованиями. Показано, что с кальмодулином связываются Ca²⁺-зависимым образом многие белки и пептиды (β -эндорфин, АКТГ, глюкагон, соматостатин, основной белок миелина, гистоны [1], различные низкомолекулярные соединения, в том числе и лекарственные соединения [2, 3]. Однако множество наблюдаемых *in vitro* реакций, происходящих с участием кальмодулина, еще не означает возможность существования подобных взаимодействий *in vivo*. Можно предположить, что увеличение гидрофобности молекулы кальмодулина вследствие ее конформационных изменений, индуцированных связыванием Ca²⁺ [4], наряду со специфическими реакциями порождает целый ряд наблюдаемых в экспериментальных условиях неспецифических взаимодействий кальмодулина с различными белками, пептидами, компонентами мембран, обладающими гидрофобными свойствами. При этом следует отметить, что связывание кальмодулина далеко не всегда является Ca²⁺-зависимым [5], а некоторые кальмодулинзависимые ферменты обладают Ca²⁺-связывающими свойствами [6, 7]. По-видимому, лишь немногие из чувствительных к кальмодулину *in vitro* систем являются мишенями действия каль-

модулина в интактной клетке. При низком внутриклеточном уровне ионов кальция многие функции, приписываемые кальмодулину, выполняются Ca^{2+} -независимыми регуляторными механизмами. В этой связи особый интерес представляют обнаруженные в гипоталамусе пептидные системы под общим названием С-модулины [8], характерной особенностью которых является регуляция активности Ca^{2+} -кальмодулинчувствительных процессов в отсутствие Ca^{2+} и кальмодулина [9].

В представленной работе обсуждаются некоторые аспекты регуляции ферментативной активности ФДЭ циклических нуклеотидов под действием $\beta 1$ -тимозина (убиквитин 74).

Материалы и методы

В работе были использованы cAMP, cGMP, ЭГТА, препараты кальмодулина и 5'-нуклеотидазы из вида *Oryzophagus Hannah* („Sigma“, США), Dowex 1x2, трис-HCl, MgCl_2 , CaCl_2 , NaN_3 („Serva“, Германия); фенил-сефароза („Pharmacia“, Швеция), 8-[^3H]cAMP, 8-[^3H]cGMP все остальные реактивы—отечественного производства квалификации ос.ч. Очистку ФДЭ осуществляли по методу, предложенному ранее [10], с некоторыми модификациями. Измельченную ткань гипоталамуса (100 г), хранившуюся при температуре -70° , гомогенизировали 3—5 мин в 300 мл буферного раствора А, содержащего 25 мМ трис-HCl, pH 7,0, 2 мМ MgCl_2 , 0,2 М NaCl при 4° на гомогенизаторе „Политрон“. Гомогенат центрифугировали в течение 60 мин при 24000 g („Beckman G-21“, ротор JA-14, США). В супернатант добавляли CaCl_2 в конечной концентрации 2 мМ и наносили на колонку фенил-сефарозы, предварительно уравновешенную буфером В, содержащим 0,2 М NaCl. Скорость элюции составляла 3 мл/мин. ФДЭ элюировали буфером В с добавлением 0,2 мМ ЭГТА со скоростью элюции 2 мл/мин. Контроль осуществляли по изменению оптической плотности ($\lambda=280$ нм) и ФДЭ активности. Все операции проводили при 4° жидкостным хроматографом умеренного давления FPLC „Pharmacia“ (Швеция). Элюат с фенил-сефарозы, обладающий наибольшей ферментативной активностью (30 мл), концентрировали ультрафильтратором „Amicon“ (США) на мембране PM-30 (Pellicon membrane 30000). Давление в ячейке поддерживали на уровне 3,5 атм при 0° .

1 мл сконцентрированного фермента наносили на колонку с гидрофобной смолой Shodex HIC RH-814 ($0,75 \times 8$ см), предварительно уравновешенную 0,1 М фосфатным буферным раствором С, pH 7,0, 1 М $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ и 2 мМ CaCl_2 . Колонку промывали 50 мл буфера С. Элюцию ФДЭ осуществляли линейным градиентом сульфата аммония от 1 до 0 М за 60 мин в присутствии 2 мМ ЭГТА. Все операции на колонке Shodex проводили с постоянной скоростью 1 мл/мин при комнатной температуре с использованием жидкостного хроматографа высокого давления „Кнауер“ (Германия). Положение ФДЭ на

профиле элюции определяли, измеряя ферментативную активность. Фракции, обладающие наибольшей активностью и степенью активации кальмодулином, объединяли и концентрировали с использованием ультрафильтратора «Amicon» на мембране PM-30. Концентрат в количестве 1 мл наносили на tandemную систему колонок с аффинным сорбентом CaM-Biosphere (1×5 см), где в качестве иммобилизованного лиганда использовали кальмодулин, предварительно уравновешенных 0,1 М фосфатным буфером С, pH 7,0, содержащим 1,8 М сульфат аммония, 2 мМ CaCl₂, 0,1 мМ ЭГТА и 10%-ный глицерин. Колонки промывали тем же буфером, после чего первую колонку отсоединяли и регенерировали. Элюцию ФДЭ с колонки 2 на одноразовый концентрирующий патрон cAMP-Biosphere осуществляли в режиме линейного градиента сульфата аммония от 1 до 0 М в присутствии 2 мМ ЭГТА и 20%-ного глицерина при скорости потока 0,3 мл/мин за 60 мин. Полученный препарат ФДЭ, согласно данным электрофореза в ПААГ и гельпроникающей ВЭЖХ на колонке TSK-Biosphere (7,5×650 мм), был гомогенным и хранился в 40%-ном глицерине при -20° в течение одного месяца. За это время активность фермента и степень активации существенно не менялись.

Активность ФДЭ определяли по методу Thompson, Appleman [11] с применением меченого 8 [³H]сАМР или 8 [³H]сGMP. Инкубационная смесь (200 мкл) содержала 50 мМ трис-HCl, pH 7,0, 10 мМ MgCl₂, 2 мМ CaCl₂ или 2 мМ ЭГТА, 100 кБк 8 [³H]сАМР или 8 [³H]сGMP, 5 мМ β-меркаптоэтанол и 5 мкМ сАМР. Реакцию начинали добавлением фермента. Через 5—15 мин инкубации при 30° пробы кипятили 1,5 мин, охлаждали до 30° и добавляли в них 0,2 мг/мл раствора 5'-нуклеотидазы яда *Ophephagus Hannah*. Реакцию, катализируемую этим ферментом, проводили при 30° в течение 10 мин. Сорбцию негидролизованного субстрата осуществляли на ионообменнике Dowex 1×2 (Cl-форма), добавляя 1 мл суспензии смолы (1:2) в среду инкубации. После перемешивания пробы центрифугировали 5 мин при 12000 g, 0,3 мл супернатанта помещали в 5 мл сцинтиллятора ЖС-7 и проводили измерения радиоактивности на жидкостном сцинтилляционном спектрометре «Intertechnique 2000» (Франция). Скорость ферментативной реакции выражали в относительных единицах активности (о.е.а) — процент гидролиза субстрата на концентрацию субстрата в пробе за 1 мин на 1 мкл фермента (гидролиз субстрата % — мкМ/мкл·мин).

Результаты и обсуждение

Ранее было показано, что аффинная ВЭЖХ на колонках Biosphere, где в качестве неподвижной фазы применялись иммобилизованные на силикагеле Ca²⁺-кальмодулинзависимые ферменты, позволяет определять некоторые физико-химические и кинетические параметры регуляции активности этих ферментов биологически актив-

ными соединениями [12]. С помощью представленной методики аффинной ВЭЖХ на колонках PDE-Biosphere и CaM-Biosphere было изучено влияние β 1-тимозина на физико-химические параметры взаимодействия ФДЭ циклических нуклеотидов и кальмодулина.

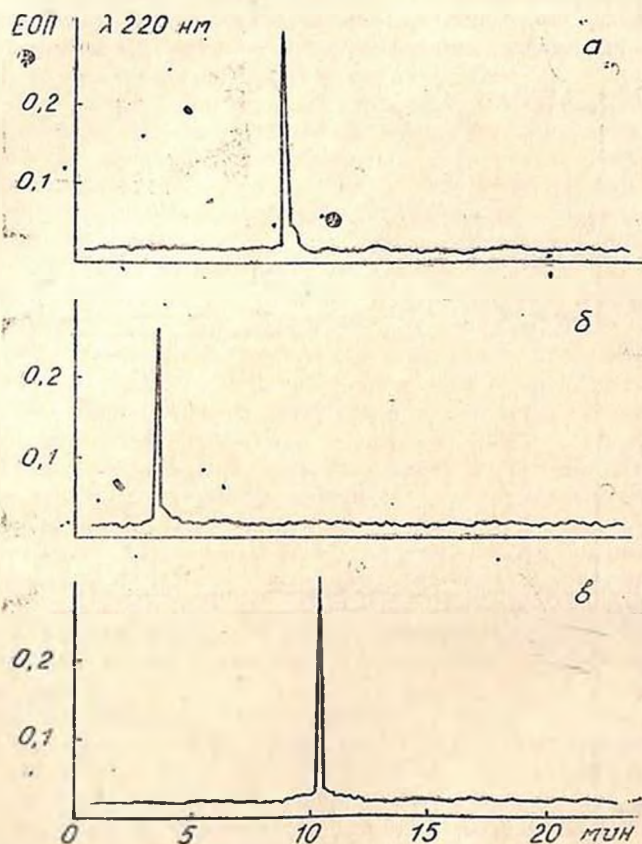


Рис. 1. Аффинная ВЭЖХ на колонке PDE-Biosphere кальмодулина (а), β 1-тимозина (б) и комплекса кальмодулин- β -тимозин (в). Эксперимент проводили в режиме изократического элюирования 0,1 М фосфатным буфером, pH 7,0 содержащим 5 мМ $MgCl_2$, 2 мМ $CaCl_2$ или 2 мМ ЭГТА и 0,5 М сульфата аммония. Скорость потока 0,5 мл/мин при температуре 36°. Обнаружение продукта осуществляли при поглощении оптической плотности λ 210 нм

На рис. 1 представлены результаты аффинной ВЭЖХ кальмодулина на колонке PDE-Biosphere. Поскольку нанесение образца на колонку происходит в присутствии высоких концентраций Ca^{2+} (0,2 мМ), во взаимодействие с PDE-Biosphere вступает комплекс Ca^{2+} -кальмодулин. Как видно из рис. 1, а, действие ЭГТА приводит

и появлению белкового пика. Таким образом, связывание $\beta 1$ -тимозина на PDE-Biosphere имеет явно выраженный Ca^{2+} -зависимый характер. При потере ионов кальция под действием хелатирующего агента происходят изменения в гидрофобных свойствах молекулы кальмодулина, приводящие к быстрой потере способности регуляторного белка связываться с иммобилизованным ферментом. На рис. 1, б представлена хроматограмма элюции $\beta 1$ -тимозина с ко-

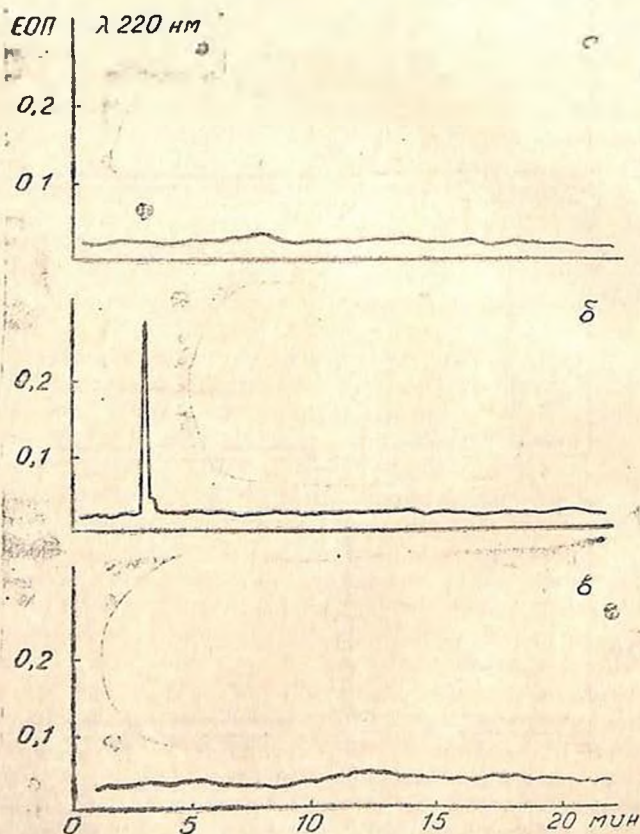


Рис. 2. Аффинная ВЭЖХ $\beta 1$ -тимозина на колонке CaM-Biosphere в присутствии: а—ионов кальция, б—ЭГТА, в—антагониста кальмодулина W-7. Условия эксперимента те же, что и на рис. 1.

лонки PDE-Biosphere, которая достигается уже при незначительном изменении элюирующей силы как в присутствии, так и в отсутствие ионов кальция. Десорбция $\beta 1$ -тимозина, по всей видимости, происходит непосредственно после его элюции, то есть с некоторой временной задержкой по отношению к началу действия элюента.

Поэтому маловероятно, что $\beta 1$ -тимозин обладает сколь-нибудь существенным сродством к молекуле ФДЭ, и связывание с иммобилизованным ферментом является следствием неспецифической сорбции на поверхности ФДЭ за счет ее гидрофобности. На рис. 1, *в* представлены результаты хроматографии кальмодулина на колонке PDE-Biosphere в присутствии $\beta 1$ -тимозина. При наличии ионов кальция и $\beta 1$ -тимозина элюция в режиме изократического элюирования приводит к появлению белкового пика, смещенного в шкале времени по отношению к пику, соответствующему белковому пику $\beta 1$ -тимозина и кальмодулина. При этом, если предположить диссоциацию комплекса кальмодулин—ФДЭ в объеме колонки в присутствии Ca^{2+} и в отсутствие $\beta 1$ -тимозина, что противоречит результатам вышеизложенного эксперимента (рис. 1, *а*), то элюция с колонки должна была привести к появлению двух белковых пиков вместо наблюдаемого одного, соответствующего пику выхода $\beta 1$ -тимозина (рис. 1, *б*). Следовательно, десорбция кальмодулина с колонки PDE-Biosphere носит явно выраженный $\beta 1$ -тимозинзависимый характер. Можно предположить, что $\beta 1$ -тимозин при избыточной концентрации ионов кальция приводит к диссоциации комплекса кальмодулин—ФДЭ за счет связывания с доступными участками: либо на молекуле ФДЭ, вследствие чего ФДЭ теряет способность связывать кальмодулин, что мало вероятно, либо на молекуле кальмодулина, и как следствие при незначительном изменении элюирующей силы наступает быстрая потеря способности кальмодулина связываться с иммобилизованным ферментом с последующей элюцией последнего. Иными словами, существует возможность непосредственного взаимодействия $\beta 1$ -тимозина с кальмодулином. Для подтверждения представленной модели были проделаны хроматографические исследования на предмет изучения связывания $\beta 1$ -тимозина на колонках CaM-Biosphere (рис. 2).

Поскольку аффинная хроматография на колонке CaM-TSK происходит при высоких концентрациях Ca^{2+} , следует полагать, что элюция $\beta 1$ -тимозина возможна при помощи действия хелатирующего агента или же антагониста кальмодулина. Однако, как видно из рис. 2, *а*, на котором представлен профиль элюции $\beta 1$ -тимозина с CaM-Biosphere, действие ЭГТА и W-7 не приводит к появлению белкового пика. При удалении же ионов кальция при нанесении на колонку образца, элюция последнего возможна, однако в данном случае связывание с лигандом является неспецифическим и достигается уже при незначительном изменении элюирующей силы (рис. 2, *б*). Таким образом, связывание $\beta 1$ -тимозина с иммобилизованным кальмодулином имеет явно выраженный Ca^{2+} -зависимый и необратимый характер. Можно предположить, что $\beta 1$ -тимозин при избыточной концентрации Ca^{2+} и Mg^{2+} взаимодействует с кальмодулин-лигандом за счет открытых (доступных) областей. Наличие указанных областей связано с присутствием избытка Ca^{2+} и Mg^{2+} . Наиболее вероятно их нахождение непосредственно на иммобилизованном лиганде, не-

желл индуцирование этих центров на поверхности $\beta 1$ -тимозина за счет независимой ассоциации $\beta 1$ -тимозина с кальмодулином. При удалении Ca^{2+} и Mg^{2+} из уравнивающего буфера, независимо от действия хелатирующего агента, происходят изменения во взаимодействии $\beta 1$ -тимозина с лигандом, приводящие к быстрой потере способности связывания с иммобилизованным кальмодулином. При

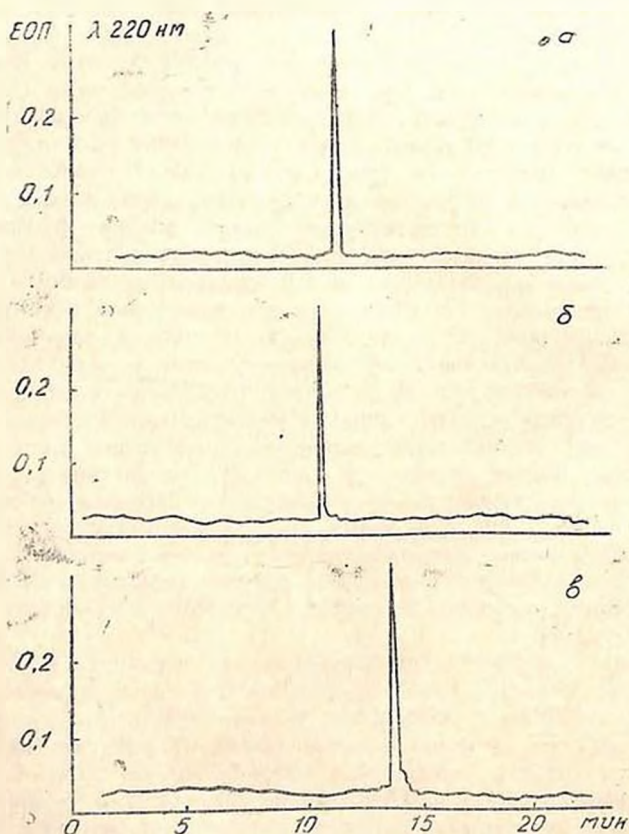


Рис. 3. Обращенно-фазовая ВЭЖХ на колонке Si—300 Biosphere C—18 кальмодулина (а), $\beta 1$ -тимозина (б) и комплекса кальмодулин- $\beta 1$ -тимозин (в). Эксперимент проводили в режиме изократического элюирования ацетонитрил / H_2O /0,1%-ная ТФУ (30—70). Скорость потока 1 мл/мин. Обнаружение продукта при λ 210 нм

193

высокой концентрации ионов кальция и магния комплекс β -тимозин—кальмодулин, по-видимому, не подвергается диссоциации в процессе элюции. Это заключение основано на результатах, представленных на рис. 2, где показано, что $\beta 1$ -тимозин связывается с иммобилизо-

панным кальмодулином Ca^{2+} -зависимым способом и не может быть элюирован под действием хелатирующего агента. Таким образом, эксперименты, проведенные с использованием CaM-Biosphere колонки, показывают, что $\beta 1$ -тимозин в присутствии ионов кальция и магния может образовать сложный комплекс с кальмодулином, изменяющий физико-химические свойства регуляторного белка. Результаты обращенно-фазовой ВЭЖХ на колонке Biosphere C-18 в режиме изократического элюирования, приведенные на рис. 3, показывают, что белковые пики соответствующие кальмодулину и $\beta 1$ -тимозину на профиле элюции лежат в различных областях. Хроматография комплекса $\beta 1$ -тимозин—кальмодулин приводит к появлению одного пика,

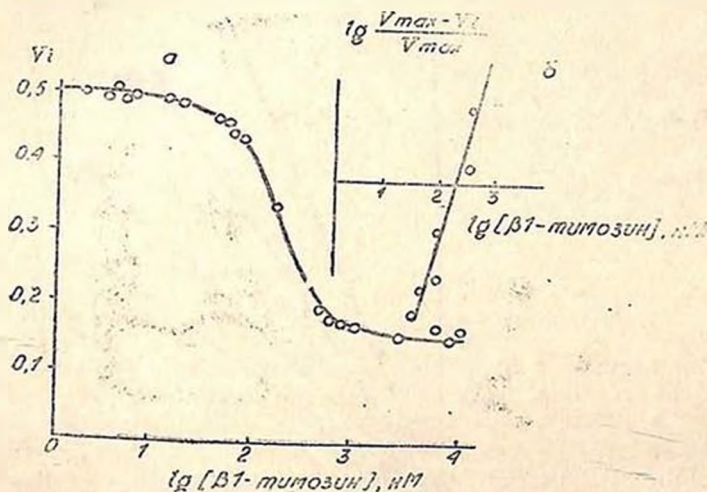


Рис. 4. Влияние $\beta 1$ -тимозина на индуцированную кальмодулином активность ФДЭ. График зависимости начальной скорости гидролиза сАМР от концентрации $\beta 1$ -тимозина (а), в координатах Хилла (б). Эксперимент проведен в присутствии 2 мМ CaCl_2 и 1 мкМ кальмодулина при концентрации субстрата сАМР 5 мкМ

сместенного в шкале времени изократического элюирования. Таким образом, $\beta 1$ -тимозин в присутствии ионов кальция и магния способен взаимодействовать с кальмодулином, что приводит к изменению гидрофобных свойств последнего. Определение параметров связывания с обращенной фазой в данном случае малоэффективно, поскольку при образовании сложного молекулярного комплекса изменения в гидрофобности при обращенно-фазовой ВЭЖХ непредсказуемы. Однако наблюдаемый эффект образования комплекса $\beta 1$ -тимозин—кальмодулин оказался несколько неожиданным в рамках известных на сегодняшний день сведений о физико-химических свойствах кальмодулина. Представленный ниже ряд кинетических экспериментов проделан с целью выяснения механизма взаимодействия $\beta 1$ -тимозина с кальмодулином.

На рис. 4 приведен график зависимости ферментативной активности ФДЭ от концентрации β 1-тимозина, который ингибирует индуцированную кальмодулином активность фермента по типу конкурентного ингибирования с эффективной K_i , близкой к 100 нМ. Тот же график, представленный в координатах Хилла, позволяет сделать заключение, что β 1-тимозин проявляет явно выраженный эффект

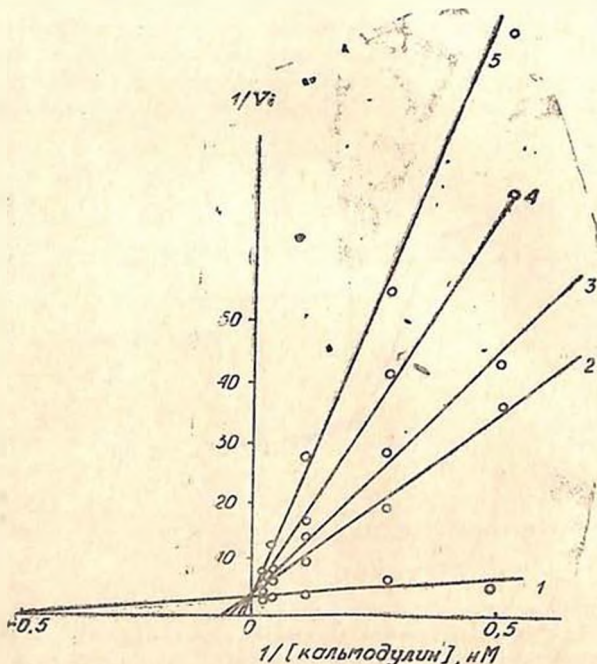


Рис. 5. Влияние β 1-тимозина на способность кальмодулина активировать ФДЭ. Зависимость начальной скорости гидролиза сАМР от концентрации кальмодулина при различных концентрациях β 1-тимозина, равных (в нМ): 1—0, 2—1, 3—10, 4—100, 5—1000. Эксперимент проводили при концентрации субстрата сАМР 5 мкМ

многоцентрового связывания при взаимодействии с комплексом Ca^{2+} -кальмодулин—ФДЭ. На рис. 5 представлена зависимость активности ФДЭ в присутствии различных концентраций β 1-тимозина от концентрации кальмодулина. Эффективная константа сродства кальмодулина к ФДЭ существенно увеличивается с ростом концентрации ингибитора. Представленный на рис. 5 эффект действия β 1-тимозина следует отнести к случаю классического конкурентного ингибирования, где он выступает в качестве ингибитора. На рис. 6 представлена зависимость эффективной константы активации ФДЭ—кальмодулин от концентрации β 1-тимозина. При высоких концентра-

циях $\beta 1$ -тимозина эффективная константа стремится к предельному значению, что свидетельствует о неполном конкурентном ингибировании активирующего действия кальмодулина. Предельная величина константы активации ФДЭ кальмодулином (K_0) составляет 120 нМ. С учетом константы активации в отсутствие ингибитора (K_a), равной 2 нМ, степень инактивирующего действия $\beta 1$ -тимозина на фермент (K_0/K_a) близка к 60. Следовательно, конкуренция $\beta 1$ -тимозина за центр связывания с кальмодулином на

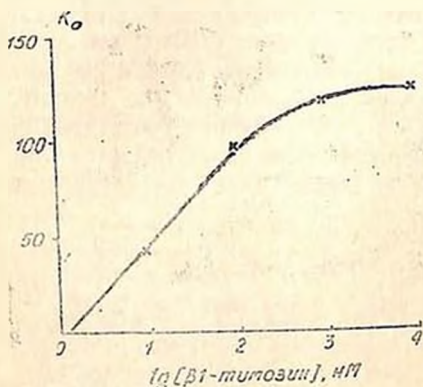


Рис. 6. График зависимости эффективной константы активации ФДЭ кальмодулином от концентрации $\beta 1$ -тимозина. Величины константы активации получены на основании данных, представленных на рис. 5 в двойных обратных координатах.

поверхности фермента невозможна, поскольку выполняются одновременно два следующих условия: ингибирующее действие $\beta 1$ -тимозина, направленное на увеличение K_a , является не полным и в отсутствие кальмодулина $\beta 1$ -тимозин не влияет на активность фермента во всем диапазоне представленных его концентраций. Поэтому можно говорить о наличии на поверхности молекулы кальмодулина центров, способных связывать $\beta 1$ -тимозин. Внутримолекулярная связь подобных центров направлена на ингибирование способности кальмодулина связываться с ФДЭ циклических нуклеотидов. О взаимодействии $\beta 1$ -тимозина с кальмодулином уже упоминалось [13], однако авторы предположили, что образование сложного комплекса связано с ферментативной активностью кальмодулин-синтазы. Очевидно, что в свете представленных в настоящей работе данных такое объяснение недостаточно, поскольку они свидетельствуют о возможности спонтанного образования комплекса без участия вышеуказанной ферментативной реакции.

Таким образом, $\beta 1$ -тимозин следует рассматривать не только как белок, являющийся своеобразным маркером для протениаз, но как возможный внутриклеточный антагонист кальмодулина.

THE ROLE OF β 1-THYMOSIN IN THE REGULATION OF CALCIUM AND CALMODULIN SENSITIVE PROCESSES (REGULATION OF PHOSPHODIESTERASE ACTIVITY)

GALOYAN A. A., CHAILYAN S. G., ABRAHAMIAN G. E.

Institute of Biochemistry, Academy of Sciences of Armenia, Yerevan.

Using an affinity high performance liquid chromatography method with zonal elution from PDE-Biosphere and CaM-Biosphere columns it was demonstrated that β 1-thymosin in the presence of Ca^{2+} and Mg^{2+} ions is able to be irreversibly coupled to calmodulin. This effect was accompanied by the inhibition of calmodulin-stimulated PDE activity. The 60-fold increase of the constant for PDE activation by calmodulin was accompanied by a significant rise in the maximal rate of cAMP hydrolysis. The Hill coefficient ($n_H=3$) pointed out to the cooperative binding of the β 1-thymosin to the calmodulin.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Malenichik D. A., Anderson S. R. Biochemistry, v. 21, p. 3489—3486, 1982.
2. Weiss B., Prozialeck W. C., Wallace T. L. Biochem. Pharmacol., v. 31, p. 2217—2226, 1982.
3. Hidaka H., Yamaki T., Totsuka T., Asano H. Mol. Pharmacol., v. 15, p. 49—53, 1979.
4. La Porte D. C., Wierman B. M., Storn D. R. Biochemistry, v. 19, p. 3814—3819, 1980.
5. Atwin B. B., Keiter C. H., Storn D. R. Advances in Cyclic Nucleotide and Protein phosphorylation Res. (eds. S. I. Strada, W. J. Thompson), v. 16, p. 227—243, Raven Press, N. Y., 1984.
6. Rodbell M. J. J. Biol. Chem., v. 250, p. 5823—5834, 1975.
7. Mahan A. S., Klee C. D. Proc. Nat. Acad. Sci., USA, v. 80, p. 4231—4235, 1983.
8. Galoyan A. A. Neurochem. Research, v. 11, № 6, p. 769—787, 1986.
9. Galoyan A. A., Bobrusin I. D., Gursits B. Ya., Abrahamian G. E. Neurochem. Research, v. 8, № 1, p. 78—86, 1989.
10. Abrahamian G. E., Kirakosova A. S., Isajanyan K. A., Galoyan A. A. Neurochem. Research, 1991, (в печати).
11. Thompson W. J., Appelman M. M. Biochemistry, v. 10, p. 311—316, 1971.
12. Галоян А. А., Чаилян С. Г., Абрамян Г. Э., Исаджян М. А., Киракосова А. С. Нейрохимия, т. 10, № 3—4, с. 140—145, 1991.
13. Ziegenhagen R., Goldberg M., Fakult W. D., Jennissen H. P. FEBS, v. 271, № 1 2, p. 71—85, 1990.

Поступила 12.XII.1991