



УДК 616.008.939+633.2.02+616.008.931:577.152.311

**ВЛИЯНИЕ АНТАГОНИСТА КАЛЬМОДУЛИНА W-7 НА  
РЕГУЛЯЦИЮ АКТИВНОСТИ  
КАЛЬМОДУЛИНЧУВСТВИТЕЛЬНОЙ ФДЭ ИЗ МОЗГА БЫКА  
С-МОДУЛИНОМ****АБРАМЯН Г. Э., \*БОБРУСКИН И. Д., ГУРВИЦ Б. Я., ГАЛОЯН А. А.**

Институт биохимии им. Г. Х. Бунятяна АН Армянской Республики, Ереван

\*МГУ им. М. В. Ломоносова, Москва

В присутствии ЭГТА антагонист кальмодулина W-7 ингибирует базальную активность  $\text{Ca}^{2+}$ -кальмодулинзависимой ФДЭ из мозга быка на 50% и не влияет на сродство субстрата к ферменту. Инактивация ФДЭ происходит по механизму неполного неконкурентного ингибирования с  $K \sim 25$  мкМ. Действие W-7 приводит к подавлению активности ФДЭ, стимулированной под действием С-модулина I, и сопровождается 10-кратным увеличением значения константы активации ФДЭ С-модулином, равной в других условиях  $\sim 2 \cdot 10^{-6}$  М. Однако величина эффективной константы диссоциации стремится к предельному значению при избыточных концентрациях ингибитора, что свидетельствует об аллостерическом механизме ингибирования активности комплекса (ФДЭ-С-модулин I) с  $K$  W-7  $\sim 50$  мкМ. Результаты настоящей работы указывают на неконкурентный по отношению к сАМР и С-модулину I характер связывания W-7 с ФДЭ.

Регуляция активности многих кальмодулинчувствительных (КМ) систем, в том числе и ФДЭ циклических нуклеотидов [1], лимитирована внутриклеточным уровнем содержания ионов кальция [2]. Предполагается, что при уменьшении концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  ниже  $10^{-6}$  М *in vivo* в действие вступают КМ-подобные, но  $\text{Ca}^{2+}$  независимые биологические структуры, способные заменять многие функции, выполняемые КМ [3]. К настоящему времени известны многие системы, регулирующие активность ФДЭ  $\text{Ca}^{2+}$ -независимым путем. К их числу относятся жирные кислоты и фосфолипиды [4], некоторые простагландины и гормоны, ферменты [5, 6].

Среди них особое место отводится выделенной ранее из состава кардиотропного нейrogормона С группе коронаросуживающих соединений под общим названием С-модулины [7], отражающим их основное свойство—способность  $\text{Ca}^{2+}$  независимой, аллостерической регуляции  $\text{Ca}^{2+}$ -КМ-чувствительной ФДЭ сАМР, коррелирующей с биологической активностью. Изучение характера действия С-модулинов на активность ФДЭ привело к выводу об их возможном участии в регуляции активности уровня содержания сАМР внутри клетки [8]. Однако эффект  $\text{Ca}^{2+}$ -независимой стимуляции гидролиза сАМР данными соединениями мало изучен, что затрудняет строгую интерпретацию результатов исследований.

Отсутствие высокоэффективных методов оценки избирательности С-модулинов к ФДЭ представляет собой актуальную проблему, в связи с чем в настоящей работе предпринята попытка изучения действия антагониста КМ—W-7 на активность комплекса ФДЭ · С-модулин 1 (СМ<sub>1</sub>) с целью идентифицировать избирательность ФДЭ к Ca<sup>2+</sup> -независимым модуляторам.

### Материалы и методы

В работе были использованы следующие коммерческие препараты: сАМР, ЭГТА („Calbiochem“, США), [<sup>3</sup>H] сАМР („Amersham“, Англия), трис-азид-Na („Serva“, ФРГ), трифторуксусная кислота (ТФУ), ацетонитрил („Fluka“, Швейцария), β-меркаптоэтанол („Merck“, ФРГ), хроматографические сорбенты фенилсефароза („Pharmacia“, Швеция), ДЭАЭ TSK Toyppearl 650 M („Toyo soda“, Япония), анионообменная смола Dowex 1×2(50—100 меш, „Serva“, ФРГ).

Уровень радиоактивности проб определяли с помощью жидкостного сцинтилляционного спектрометра „Intertechnique—2000“ (Франция) с использованием сцинтиллятора ЖС-7А („Союзреахим“, СССР).

ВЭЖХ проводили на хроматографе („Altex-Beckman“, США) с применением колонок C-18 Ultrasphere OSD („Altex“, США), ДЭАЭ TSK 3 SW („LKB“, Швеция) и колонки для гель-фильтрации Sphergel TSK 3000 и 2000 („Altex-Beckman“, США).

Гомогенат центрифугировали на центрифуге „Beckman“, (ротор JA-14 и JA-21, „Beckman“, США).

Активность ФДЭ определяли по методу Thompson, Appleman [9], основанному на измерении концентрации [<sup>3</sup>H]аденозина в реакционной среде, образующегося в результате двухстадийной реакции гидролиза [<sup>3</sup>H] сАМР и [<sup>3</sup>H] 5'-АМР с участием ФДЭ и 5'-нуклеотидазы.

Препарат ФДЭ получали по методу Бобрускина, Шафхина [10] в четыре хроматографические стадии: на ионообменном сорбенте ДЭАЭ TSK (4×11), аффинном—фенилсефароза (4×5,6 см), с последующей ВЭЖХ на ДЭАЭ TSK-3SW и гель-фильтрацией на колонке TSK—3000 SW (7,5×600 мм). Элюцию на всех стадиях осуществляли буфером, содержащим 25 мМ трис-НСl, рН 7,0, 1 мМ MgCl<sub>2</sub>, 1 мМ ДДТ, 0,1 мМ азид натрия. В качестве дополнительных виградиентов, в зависимости от метода хроматографии, использовали 0,2 М NaCl, 0,2 М ЭГТА и 2 мМ Ca<sup>2+</sup>.

Очистку КМ проводили по модифицированной методике Gopalakrishna, Anderson [11], предложенной ранее [10].

Дальнейшую очистку КМ проводили методом ВЭЖХ на колонке TSK ДЭАЭ (21,5×150 мм). Элюцию осуществляли линейным градиентом NaCl (150—350 мМ) в 25 мМ трис-НСl буфере, рН 7,0. Гомогенность препарата КМ проверяли методом электрофореза в 14%-ном ПААГ в присутствии 0,1%-ного ДДС-Na по методу Laemmli [12].

Препарат СМ<sub>1</sub> получали методом, предложенным ранее [7], с помощью ОФ-ВЭЖХ на колонке C-18 с использованием линейного градиента ацетонитрила в воде (0—30%) в присутствии 0,1%-ной ТФУ. Скорость потока—0,8 мл/мин. Выход продукта контролировали по поглощению в УФ-области 210—220 нм. Чистоту препаратов СМ<sub>1</sub> проверяли электрофоретическим методом в 12,5%-ном ПААГ в присутствии 8 М мочевины и 0,1%-ного ДДС-Na. По данным элек-

трофореза, препарат активатора был электрофоретически гомогенным.

## Результаты и обсуждение

На рис. 1, а, б представлены результаты эксперимента, свидетельствующие об ингибировании базальной активности ФДЭ под действием антагониста КМ—W-7. Как оказалось, W-7 в присутствии 0,2 мМ ЭГТА не утрачивает своей способности инактивировать гидролиз сАМР, но подавляет активность ФДЭ до определенного уровня. Соотношение скоростей гидролиза в отсутствие ингибитора и в присутствии его избыточных концентраций равно ~2. Иными словами,

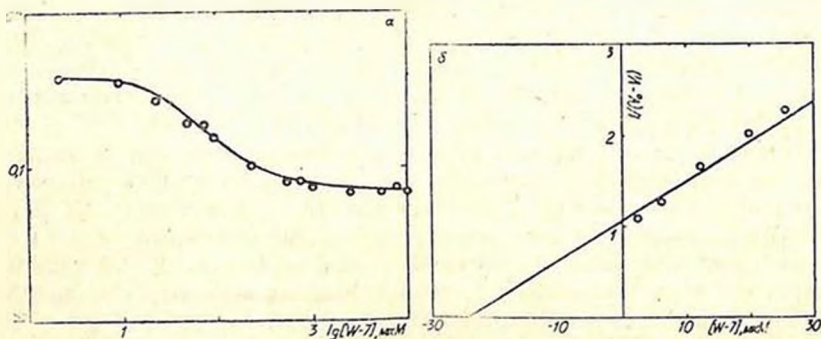


Рис. 1. а—зависимость начальной скорости гидролиза сАМР от концентраций соединения W-7; б—зависимость обратной величины начальной скорости гидролиза сАМР от концентраций W-7: по оси абсцисс—логарифмы концентраций W-7, выраженный в мкМ; по оси ординат—скорость гидролиза сАМР (5 мкМ) в отн. ед. (ОЕА); измерения выполнены в присутствии 0,2 мМ ЭГТА.

наблюдаемый эффект ингибирования, равный 50%, свидетельствует о неполной инактивации фермента, характеризующейся уменьшением максимальной скорости гидролиза сАМР с ростом концентрации ингибитора. Величина  $K$  определенная по пересечению прямой с осью абсцисс на рис. 1, б, составляет ~25 мкМ. Представленные результаты оказались несколько неожиданными в рамках известных на сегодняшний день литературных данных относительно действия антагонистов КМ [15—17].

В этой связи для уточнения характера ингибирования базальной активности ФДЭ под действием W-7 был проведен эксперимент, результаты которого представлены на рис. 2, а, свидетельствующий о том, что эффективная константа сродства субстрата к ФДЭ, равная ~100 мкМ, не претерпевает изменений при увеличении концентрации W-7 более чем на порядок. Следовательно, ингибирование является неконкурентным и неполным. В данном случае эффект инактивации под действием W-7 можно объяснить образованием комплекса (ФДЭ·W-7).

На следующем этапе работы нами была проверена возможность влияния W-7 на активность комплекса (ФДЭ·С-модулин).

На рис. 2, б представлены результаты, согласно которым в присутствии избыточных концентраций СМ<sub>1</sub> антагонист КМ не влияет на сродство сАМР к ФДЭ.



На рис. 3 представлен график зависимости начальной скорости гидролиза сАМР в присутствии различных концентраций W-7 от концентраций СМ<sub>1</sub> в координатах Лайнуивера-Берка. Линейность протекаемой реакции свидетельствует об отсутствии кооперативности.

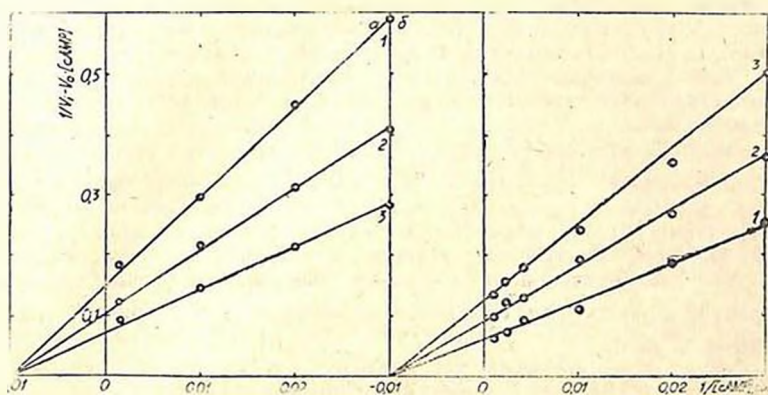


Рис. 2. Зависимость начальной скорости гидролиза сАМР в присутствии W-7 (а) и С-модулина I+W-7 (б) от концентрации субстрата в координатах Лайнуивера-Берка. По оси абсцисс—концентрация сАМР, выраженная в мкМ; по оси ординат—У. А. ФДЭ, выраженная в ОЕА (Vi). Измерения выполнены в присутствии 0,2 мМ ЭГТА и 100 нг/мл С-модулина I при фиксированных концентрациях W-7, равных (в мкМ): 1—(50), 2—(5), 3—(0)

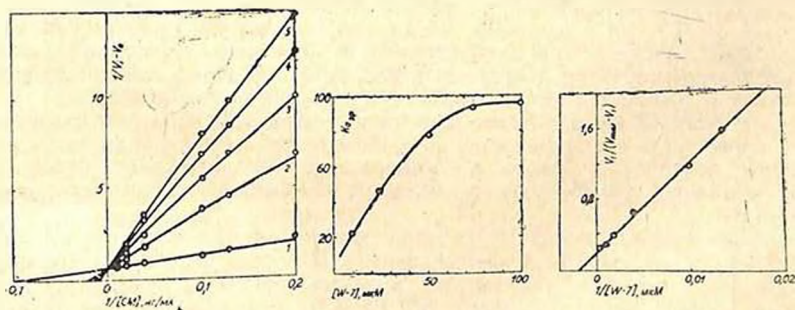


Рис. 3. Зависимость начальной скорости гидролиза сАМР от концентраций С-модулина I в присутствии W-7 в координатах Лайнуивера-Берка. Измерения выполнены в присутствии 0,2 мМ ЭГТА и различных концентрациях W-7, равных (в мкМ): 1—(0), 2—(10), 3—(25), 4—(50), 5—(100)

Рис. 4. Зависимость эффективной константы активации ФДЭ С-модулина I от концентраций W-7. По оси абсцисс—концентрация ингибитора, выраженная в мкМ, по оси ординат—значения эффективной константы активации ФДЭ под действием С-модулина I в нг/мл

Рис. 5. Зависимость начальной скорости гидролиза сАМР от концентраций W-7 в присутствии С-модулина I. Измерения выполнены в присутствии 0,2 мМ ЭГТА и 100 нг/мл С-модулина I

Эффективная константа сродства  $CM_1$  к ФДЭ увеличивается с ростом концентрации ингибитора и, как следствие, максимальная скорость гидролиза сАМР не претерпевает существенных изменений. В данном случае представленный на рис. 3 эффект действия W-7 следовало бы отнести к случаю классического конкурентного ингибирования. Однако данные на рис. 4, отражающие зависимость эффективной константы активации ФДЭ под действием  $CM_1$  от концентрации W-7, указывают на неполное конкурентное ингибирование, поскольку в области высоких концентраций значение эффективной константы ассоциации выходит на постоянный уровень, предельная величина которой составляет  $2 \cdot 10^{-4} M$ . В отсутствие W-7 значение константы ассоциации ( $K_i$ ) равно  $2 \cdot 10^{-4} M$ , а степень инактивации комплекса (ФДЭ· $CM_1$ ) составляет  $\sim 10$ . Следовательно, имеет место ингибирование, протекающее по механизму неполного конкурентного ингибирования. Построение графика зависимости скорости гидролиза сАМР от концентрации W-7 дает возможность определить  $K_i$  500 мкМ. Однако при соотношении величин  $K_i/K_a$ , равном 10,  $K_i$  равно  $\sim 50$  мкМ.

Таким образом, нами установлено, что взаимодействие W-7 с комплексом (ФДЭ· $CM_1$ ) носит неконкурентный характер, поскольку величина  $K_i$  активности комплекса под действием W-7 больше по сравнению с тем же значением в случае инактивации базальной активности фермента. Кроме того, 10-кратное увеличение  $K_i$ ,  $CM_1$  под действием W-7 вызвано аллостерическим воздействием последнего, так как в отсутствие активатора наблюдаемый процесс инактивации сопровождается только изменением константы скорости гидролиза в сторону уменьшения.

Следовательно, конкуренция антагониста КМ за центр связывания на ФДЭ невозможна, поскольку ингибирование активности комплекса (ФДЭ· $CM_1$ ) неполное. Исключена также конкуренция за каталитический центр, так как величина  $K$  остается неизменной как в присутствии, так и в отсутствие  $CM_1$ . Иначе говоря, можно предположить о наличии аллостерического участка связывания W-7 на молекуле ФДЭ. Взаимодействие антагониста КМ с ФДЭ на этом участке приводит к ингибированию способности фермента образовать активный комплекс с  $CM_1$ , а в случае отсутствия последнего образование комплекса (ФДЭ·W-7) приводит к изменению скорости гидролиза сАМР.

Факт существования W-7 связывающего участка является неожиданным, но отнюдь не исключительным. Известно, например, что фенотиазины способны связываться с молекулой ФДЭ, ингибируя не только стимуляцию активности (ФДЭ·КМ), но и базальную активность фермента [13]. Авторами показано, что гидрофобные участки на молекуле КМ, по которым происходит связывание антагонистов, отличаются по структуре от гидрофобных участков на молекуле ФДЭ, ответственных за связывание КМ.

#### THE EFFECT OF W-7, A CALMODULIN ANTAGONIST, ON THE REGULATION OF ACTIVITY OF CM-SENSITIVE PDE FROM BOVINE BRAIN BY C-MODULIN I

ABRAMYAN G. E., BOBRUSKIN I. D., GURVITS B. Ya., GALOYAN A. A.

G. Ch. Bunatyan Institute of Biochemistry, Academy of Sciences of the Armenia, Yerevan

Armenia, Yerevan

\*Lomonosov Moscow State University

W-7, a calmodulin antagonist, inhibits basal activity of  $\text{Ca}^{2+}$ , CM-dependent PDE from bovine brain by 50% in the presence of EGTA, however, it does not affect the affinity of the substrate to the enzyme. Inactivation of PDE occurs by the incomplete non-competitive mechanism with  $K_i$  equal to about 25  $\mu\text{M}$ . W-7 inhibits PDE stimulated by C-modulin I (CM-I) and leads to a 10-increase in the activation constant of the enzyme by C-modulin which under these conditions equals  $2 \times 10^{-9}$  M. However, the value of  $K_s$  achieve the limiting value at excessive inhibitor concentrations providing evidence for allosteric mechanism of the inhibition of the PDE-CM-I complex with  $K_i$  equal to about 50  $\mu\text{M}$  for W-7. Our results point out that W-7 binds to PDE non-competitively with respect to cAMP and CM-I.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Haung C. Y., Chau V. C., Chock P. B. Proc. Nat. Acad. Sci., v. 78, p. 871—874, 1981.
2. Kretsinger R. H. Am. Elsevier, New York, p. 63—72, 1977.
3. Галоян А. А. Нейрохимия, т. 6, №1, с. 3—9, 1987.
4. Wolff D. I., Brostrom C. O. Arch. Biochem. and Biophys., v. 173, p. 720—731, 1980.
5. Hamet P., Franks D. J., Tremblay J. Can. J. Biochem. and Cell Biol., v. 61 № 11, p. 1158—1163, 1983.
6. Krinks M. N., Haech J., Rhoads A., Klee C. B. —In: Advances in Cyclic Nucleotide and Protein Phosphorylation Res. (e. s. S. I. Strada, W. J. Thompson), v. 16, p. 31—47, Raven Press, N. Y., 1984.
7. Галоян А. А., Бобрускин И. Д., Гурвиц Б. Я., Абрамян Г. Э. Нейрохимия, т. 8, № 1, с. 78—86, 1989.
8. Thompson W. J., Appleton M. M. Biochemistry, v. 10, p. 311—316, 1971.
9. Бобрускин И. Д., Шайхин С. М., Муратова М. В., Баранова Л. А., Северин Е. С. Биохимия, т. 52, вып. 8, с. 1344—1352, 1987.
10. Gopalakrishna R., Anderson W., B. Biochem. and Biophys. Res. Commun., v. 104 p. 830—836, 1982.
11. Lactmil U. K. Nature, v. 227, p. 680—683, 1970.
12. Балденков Г. Н., Меньшиков М. Ю., Феоктистов Н. А., Ткачук В. А. Биохимия, т. 50, вып. 7, с. 1141—1150, 1985.

Поступила 5.III 1990