

ПИСЬМА В РЕДАКЦИЮ

УДК 577.152.3—547.963

НОВЫЕ ГИПОТАЛАМИЧЕСКИЕ КАРДИОТРОПНЫЕ  
СОЕДИНЕНИЯ—УНИВЕРСАЛЬНЫЕ АКТИВАТОРЫ БАЗАЛЬНОЙ  
АКТИВНОСТИ КАЛЬМОДУЛИНЗАВИСИМЫХ ФЕРМЕНТОВ

ГАЛОЯН А. А., ГУРВИЦ Б. Я.

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

В составе препарата кардиотропного нейrogормона «С», выделенного из гипоталамуса быка [1, 2], ранее нами были обнаружены три кальцийнезависимых активатора высокоочищенной кальмодулин (КМ)-зависимой ФДЭ [3, 4]. Эти активаторы были нами названы С-модулинами в связи с их КМ-подобными эффектами, а также на основании предположения о том, что они являются регуляторами кардиотропного действия нейrogормона «С». С-модулины были очищены до гомогенного состояния с помощью обратно-фазовой ВЭЖХ и гель-фильтрации; величины их  $M_r$  составляют 3—8 кД. Наибольшую активность проявлял С-модулин с  $M_r \sim 4$  кД. Была установлена способность С-модулинов стимулировать базальную активность ФДЭ в 6—10 раз в отсутствие КМ и  $Ca^{2+}$ . Кинетический анализ стимулирующего действия С-модулинов выявил их высокое сродство к ферменту. Кажущаяся  $K_a$  комплекса активатор-фермент составляла 10 нг/мл.

Полученные результаты позволили предположить, что С-модулины, подобно КМ, являются стимуляторами базальной активности не только ФДЭ, но и других КМ-зависимых ферментов. Исследования действия С-модулинов на киназу легких цепей миозина (КЛЦМ), КМ-зависимую протеникиназу (ПК), киназу фосфорилазы, а также на 5'-нуклеотидазу (5'-НК) подтвердили это предположение.

КЛЦМ была выделена из скелетных мышц кролика до состояния, близкого к гомогенному, с применением аффинной хроматографии на КМ-сепарозе. Выделенная таким образом КЛЦМ не обладала ферментативной активностью даже при добавлении  $Ca^{2+}$ , что свидетельствовало о ее полном отделении от эндогенного КМ. Внесение в инкубационную смесь КМ вызывало максимальную активацию фермента. Степень фосфорилирования легких цепей-2 (ЛЦ<sub>2</sub>) миозина под действием КЛЦМ в присутствии 5 мМ Mg-АТФ регистрировали по

увеличению электрофоретической подвижности фосфорилированных ЛЦ<sub>2</sub> по сравнению с дефосфорилированными при электрофорезе миомина из скелетной мышцы кролика в ПААГ в присутствии 8 М мочевины.

Обнаружено, что добавление С-модулинов (С<sub>1</sub>, С<sub>2</sub> или С<sub>3</sub>) к препарату КЛЦМ, отделенной от КМ, вызывает сильную активацию фермента. По данным электрофореза, в ПААГ дефосфорилированные ЛЦ<sub>2</sub> в отсутствие С-модулинов фосфорилировались до 100% при добавлении в инкубационную среду наномолярных концентраций каждого из С-модулинов. Условия эксперимента подбирались таким образом, чтобы аналогичное количество фермента в присутствии избытка экзогенного КМ и Ca<sup>2+</sup> вызывало лишь частичное фосфорилирование ЛЦ<sub>2</sub> (до 30%). Полученные результаты могут свидетельствовать о том, что С-модулины, обладающие высоким сродством к ферменту, являются более мощными по сравнению с КМ активаторами КЛЦМ.

При этом чрезвычайно важен тот факт, что наблюдаемый эффект, в отличие от действия КМ, является Ca<sup>2+</sup>-независимым. Он проявлялся в присутствии в инкубационной смеси 2 мМ ЭГТА, и при замене ЭГТА на CaCl<sub>2</sub> степень активации КЛЦМ под действием С-модулинов не изменялась.

В присутствии КМ стимулирующее действие С-модулинов тормозилось, а в некоторых случаях наблюдался ингибирующий эффект.

Нами было также исследовано действие С-модулинов на КМ-зависимую ПК<sub>2</sub> из мозга крысы. Базальная активность выделенного на КМ-сепарозе фермента сохранялась на низком уровне и в присутствии Ca<sup>2+</sup> и не снижалась при добавлении ЭГТА, что свидетельствовало об отсутствии в препарате фермента эндогенного КМ. При этом ПК<sub>2</sub> проявляла высокую чувствительность к активации экзогенным КМ.

Внесение в инкубационную среду, не содержащую Ca<sup>2+</sup> и КМ, С-модулинов стимулировало базальную активность ПК<sub>2</sub> в 3—5 раз. В качестве субстрата использовался основной белок миеллина. Интересен также тот факт, что ПК<sub>2</sub>, активированная под действием КМ, тормозилась в присутствии С-модулинов.

Необходимо привести также полученные нами ранее данные об активации С-модулинами 5'-НК [5]. Хотя 5'-НК не входит в число классических КМ-зависимых ферментов, она способна активироваться под действием Ca<sup>2+</sup>, а также КМ в комплексе с Ca<sup>2+</sup>. 5'-НК по своим свойствам проявляет значительное сходство с КМ-зависимыми ферментами, способными активироваться Ca<sup>2+</sup> в отсутствие экзогенного КМ. Характерным примером этих ферментов является киназа фосфоорилазы, которая может стимулироваться Ca<sup>2+</sup> двумя путями. Активирующий эффект возникает при взаимодействии Ca<sup>2+</sup> с КМ, который, как известно, входит в качестве субъединицы в составе фермента, а также в результате связывания Ca<sup>2+</sup> в комплексе с КМ с дополнительным Ca<sup>2+</sup>-связывающим центром.

5'-НК была нами выделена из растворимой фракции гипоталамуса быка с использованием ИОХ на ДЭАЭ TSK, аффинной хроматографии на феноил-сефарозе и на конканавалин-сефарозе. Установлено, что выделенный фермент активировался более чем в 6 раз под действием КМ в комплексе с  $\text{Ca}^{2+}$ . Полумаксимальный эффект наблюдался при концентрации КМ  $5 \cdot 10^{-7}$  М [5]. С-модулины проявляли более высокое сродство к ферменту; суммарная фракция С-модулинов ( $\text{C}_1 + \text{C}_2 + \text{C}_3$ ) в концентрации 5 мкг/мл стимулировала 5'-НК в 5—8 раз в отсутствие экзогенного  $\text{Ca}^{2+}$ . При добавлении в инкубационную смесь  $10^{-4}$  М  $\text{CaCl}_2$  или  $10^{-4}$  М ЭГТА результат не изменялся.

Активирующее действие С-модулинов в отсутствие экзогенного КМ проявлялось также в отношении киназы фосфоорилазы.

Итак, полученные результаты позволяют предположить, что С-модулины, подобно КМ, являются универсальными регуляторами различных ферментов. Однако, в отличие от КМ, действие С-модулинов осуществляется  $\text{Ca}^{2+}$ -независимым способом.

Несомненный интерес представляет обнаруженный нами феномен мощной активации под действием С-модулинов  $\text{Ca}^{2+}$ -независимого фосфорилирования, катализируемого КМ-зависимыми ПК (КЛЦМ, ПК<sub>2</sub> и киназой фосфоорилазы). Проведенные нами исследования обогащают современные представления о моделях мышечной сократимости, о роли фосфорилирования, о метаболизме циклических нуклеотидов и гликогена и других процессах. Приведенные результаты свидетельствуют о том, что в основе регуляции этих процессов лежат более сложные, тонкие,  $\text{Ca}^{2+}$ -независимые механизмы с участием выделенных нами соединений гипоталамуса, действующих в наномолярных, а в некоторых случаях и в пикомолярных концентрациях, сопоставимых с их физиологическим уровнем в гипоталамусе.

## THE NEW CARDIOACTIVE COMPOUNDS OF HYPOTHALAMUS— UNIVERSAL ACTIVATORS OF BASAL ACTIVITY OF CALCIUM- CALMODULIN DEPENDENT ENZYMES

GALOYAN A. A., GURVITS B. Ya.

Institute of Biochemistry, Academy of Sciences of the Armenian, Yerevan

It was isolated in individual forms polipeptides from the hypothalamus which are activators of calcium-calmodulin-dependent enzymes (myosin light chain kinase, phosphodiesterase, protein kinase etc). Without participation of calcium and calmodulin (substances  $\text{C}_1$ ,  $\text{C}_2$  and  $\text{C}_3$ ). These compounds are universal activators of enzymes. The primary structure of  $\text{C}_1$  was estimated.



1. Галоян А. А. Докл. АН АрмССР, т. 4, № 3, с. 109—111, 1962.
2. Galoyan A. A. Neurochem. Res., v. 11, № 6, p. 769—787, 1986.
3. Галоян А. А., Гурвиц Б. Я. Нейрохимия, т. 5, № 4, с. 420—422, 1986.
4. Галоян А. А., Бобрускин И. Д., Гурвиц Б. Я., Абрамян Г. Э. Нейрохимия, т. 8, № 1, с. 78—86, 1989.
5. Галоян А. А., Гурвиц Б. Я., Шарова Н. П., Алексанян С. С. Нейрохимия, т. 6, № 4, с. 544—551, 1987.

Поступила 15.XI.1990

---

*Neurobiology of Panic Disorder (Series Frontiers in Clinical Neuroscience, v. 8). ed. C. Ballinger, J. Wiley and Sons, Baffins Lane, Chichester, 410 p., 1990.*

### *Нейробиология панических расстройств*

Большинство крупных исследовательских центров по психиатрии изучают в настоящее время расстройства, вызванные паническим состоянием. В настоящем издании представлены новейшие данные в этой развивающейся области нейropsychиатрии, включая нейробиологические аспекты панических расстройств. Особое внимание уделяется расшифровке механизма заболевания и предболезненным состояниям. Книга содержит следующие главы: «Животные модели страха», «Предклинические исследования механизмов тревожных состояний и их лечение», «Изучение панических расстройств на двойниках», «Молекулярная генетика и панические расстройства», «Новые подходы к старым проблемам», «Источники панических заболеваний», «Норадренергическое нарушение регуляции при панических расстройствах», «Паника, вызванная изопротеранолом», «Трибулин и стресс», «Клинические исследования новой нейрохимической системы», «Потенциальные механизмы индукции паники лактатом натрия», «Физиология паники», «Провокация паники кофеином—внимание к биологическим механизмам», «Ось гипоталамус-гипофиз-надпочечники при панических расстройствах», «Биологическое различие между страхом и депрессией», «Страх и иммунная система», «Простагландины—связь с ЦНС и тромбоцитами при панических расстройствах», «Сон при панике и генерализованном страхе».