

УДК 577.112:547.963

РЕГУЛЯЦИЯ СОКРАЩЕНИЯ ГЛАДКОЙ МУСКУЛАТУРЫ
ПЕПТИДНЫМИ ФАКТОРАМИ ГИПОТАЛАМУСАЗАКАРЯН Т. Р., БАРХУДАРЯН Н. А., ШУВАЛОВА Л. А., ОСТРОВСКАЯ М. В.,
ШАРОВА Н. П., ГАЛОЯН А. А.

Институт биохимии АН Армении, Ереван

Исследовано воздействие коронаросуживающих пептидных факторов гипоталамуса на активность киназы легких цепей миозина (КЛЦМ), выделенной из гладкой мускулатуры желудка кур и кальмодулинчувствительной ФДЭ сАМР, выделенной из гипоталамуса быка. Обнаружено, что пептидные факторы гипоталамуса вызывают Ca^{2+} -независимую активацию этих ферментов в присутствии кальмодулина. Высказывается предположение, что и в условиях *in vivo* пептидные факторы гипоталамуса могут принимать участие в Ca^{2+} -независимой регуляции активности КЛЦМ и ФДЭ сАМР, обеспечивая при этом сокращение гладкой мускулатуры, путем Ca^{2+} -независимого связывания с кальмодулином, являясь, по-существу эндогенными заместителями Ca^{2+} .

За последние годы в нашей лаборатории накоплен большой фактический материал, подтверждающий предложенную ранее Галояном А. А. концепцию о существовании в мозгу Ca^{2+} -независимой пептидной системы регуляции активности Ca^{2+} -кальмодулинзависимых ферментов [1—2]. Галояном и сотруд. установлено, что в гипоталамусе крупного рогатого скота образуются 2 группы пептидных факторов, вызывающих Ca^{2+} -независимую активацию Ca^{2+} -кальмодулинзависимых ферментов: одна из них стимулирует Ca^{2+} -независимую активацию кальмодулинчувствительной ФДЭ сАМР в 6—10 раз в отсутствие Ca^{2+} и кальмодулина [3], а другая, к которой относятся выделенные нами ранее 5 коронаросуживающих пептидных факторов [4], вызывает Ca^{2+} -независимую активацию КЛЦМ скелетной мышцы кролика— Ca^{2+} -кальмодулинчувствительного фермента, ответственного за фосфорилирование легких цепей миозина [5]. Однако необходимо отметить, что стимулирующее действие этой группы пептидных факторов гипоталамуса (ПФ₁₋₅) на активность КЛЦМ имеет место только при наличии в инкубационной среде кальмодулина [5]. Методом ферментзависимого иммуносорбентного анализа (ELISA) было обнаружено, что ПФ₁₋₅ ингибируют образование иммунокомплекса кальмодулин-антитело путем Ca^{2+} -независимого связывания с кальмодулином [6—8]. Ранее нами было показано, что ПФ₁₋₅ оказывают стимулирующее воздействие (на 20—25%) на сократительную функцию

изолированной аорты кролика в K^+ -деполяризующем растворе, содержащем 40 мМ KCl [5, 9]. Как известно, в гладкой мускулатуре КЛЦМ играет ключевую роль в запуске мышечного сокращения [10], поэтому представлялось целесообразным изучить воздействие ПФ₁₋₅ на активность КЛЦМ, выделенной из гладкой мускулатуры, а также изучить воздействие ПФ на активность кальмодулинчувствительной ФДЭ сАМР, учитывая, что факторы изменяющие активность КЛЦМ, оказывают обычно аналогичное [11] воздействие на активность ФДЭ сАМР; кроме того, изучение влияния вышеуказанных пептидных факторов гипоталамуса на активность ФДЭ сАМР дало бы возможность для сравнения механизма регуляторного действия этих пептидов с механизмом действия С-модулинов на один и тот же фермент.

Целью данной работы было исследование воздействия коронаросуживающих пептидных факторов гипоталамуса на активность КЛЦМ из гладкой мускулатуры желудка кур и на активность кальмодулинчувствительной ФДЭ сАМР из гипоталамуса быка.

Материалы и методы

Коронаросуживающие пептидные факторы гипоталамуса выделяли по методу Галояна и соавт. [4].

Высокоочищенные препараты КЛЦМ получали по методу Dabrowska и соавт. [12—13] из желудка кур. Фосфорилирование легких цепей (ЛЦ) миозина гладкой мускулатуры желудка кур с M_r 20 кД проводили в течение 25 мин при 25° в инкубационной среде, содержащей 70 мкг очищенного миозина, 20 мМ фосфатного буфера, рН 8,0, 12,5 мМ $MgCl_2$, 0,1 мМ $CaCl_2$, 40 мМ АТР, 1,5 мМ КЛЦМ и 4,5 мМ кальмодулина. Включение фосфата в ЛЦ миозина регистрировали при электрофорезе в ПААГ в присутствии 8 М мочевины по методу Reggie и соавт. [14]. Относительное содержание фосфорилированных ЛЦ в миозине определяли при анализе денситограмм гелей электрофореза, окрашенных Кумасси R-250.

Количество белка определяли по методу Lowry и соавт. [15].

Выделение ФДЭ сАМР проводили по методу Бобрускина и соавт. [16]. Для определения влияния ПФ на активность фермента в инкубационную смесь, объемом 100 мкл, содержащую 25 мМ трис-HCl буфер, рН 7,0, 1 мМ $MgCl_2$, 3 мкМ сАМР, [3H] сАМР (0,1 мкКи) и достаточное количество фермента добавляли от 0,025 до 0,05 мкг ПФ.

В работе использованы следующие реактивы: АТР („Sigma“, США), $MgCl_2$, $CaCl_2$, ацетонитрил („Merck“, ФРГ), ЭГТА, Кумасси R-250, акриламид, бисакриламид, ТЕМЕД, персульфат аммония, Лауэкс 50W×8, Амберлит CG-400, 100—200 меш („Serva“, ФРГ), сефадекс G-10, фенол-сефароза, сефакрил S-200 („Pharmacia“, Швеция), TSK ДЭАЭ 650 М („Тоуо Soda“, Япония), остальные реактивы марок х. ч. и ос. ч. („Союзхимреактив“, СССР).

Результаты и обсуждение

При исследовании влияния ПФ₁₋₅ на активность КЛЦМ, выделенной из гладкой мускулатуры желудка кур, было выявлено, что при добавлении их в инкубационную среду в концентрации 0,05 М в отсутствие Са²⁺ (при наличии в инкубационной среде 1 мМ ЭГТА) происходит активация фермента от 100 до 200% соответственно, по сравнению с контролем, не содержащем 1 мМ ЭГТА и ПФ (таблица). Стимулирующее действие ПФ₁₋₅ на активность высокоочищенного препарата КЛЦМ имело место только при наличии в инкубационной среде кальмодулина.

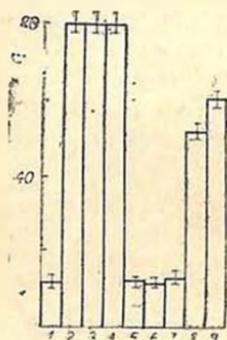


Рис. Влияние пептидных факторов (ПФ₃ и ПФ₄) гипоталамуса на активность Са²⁺-кальмодулинзависимой ФДЭ сАМР. По оси абсцисс: 1—0,1 мМ СаСl₂+3 мкМ ФДЭ сАМР (контроль 1); 2—0,1 мМ СаСl₂+3 мкМ ФДЭ сАМР+4,5 мкМ кальмодулина (К₂—контроль 2); 3—К₂+0,05 мкМ ПФ₃; 4—К₂+0,05 мкМ ПФ₄; 5—К₁+0,05 мкМ ПФ₃; 6—К₁+0,05 мкМ ПФ₄; 7—1 мМ ЭГТА+3 мкМ ФДЭ сАМР+4,5 мкМ кальмодулина (К₃—контроль 3); 8—К₃+0,05 мкМ ПФ₃; 9—К₃+0,05 мкМ ПФ₄. По оси ординат—активность ФДЭ сАМР (нмоль гидролизованного сАМР/мин)

Эти данные аналогичны результатам, полученным нами ранее при изучении воздействия ПФ₁₋₅ на активность КЛЦМ, выделенной из скелетной мышцы кролика, с той лишь разницей, что степень активации КЛЦМ, выделенной из гладкой мускулатуры под воздействием ПФ₁₋₅ значительно выше [5]. Эти результаты коррелируют также с полученными нами ранее данными о стимулирующем воздействии ПФ₁₋₅ на сократительную функцию изолированной зорты кролика [5, 9]. Данные, полученные с помощью метода ELISA о связывании ПФ с кальмодулином (как в присутствии Са²⁺, так и в его отсутствие) позволили заключить, что коронаросуживающие пептидные факторы гипоталамуса осуществляют свое воздействие на активность КЛЦМ, выделенной как из гладкой, так и из скелетной мускулатуры путем связывания с молекулой кальмодулина и образования комплекса кальмодулин-пептидный фактор, который, связываясь с каталитической субъединицей фермента, вызывает его активацию. Учитывая тот факт, что в гладкой мускулатуре КЛЦМ ответственна за запуск мышечного сокращения [10], можно сказать, что полученные новые доказательства регуляторного воздействия коронаросуживающих ПФ гипоталамуса на сократительную функцию гладкой мускулатуры.

При изучении действия ПФ₃ и ПФ₄ на активность Са²⁺-кальмодулинзависимой ФДЭ сАМР было обнаружено, что ПФ в отсутствие Са²⁺ стимулирует активность фермента приблизительно в 4 раза по сравнению с контролем, не содержащем пептидных факторов. Необходимо отметить,

что в присутствии Ca^{2+} мы не наблюдали активирующего эффекта ПФ (рисунок), а в отсутствие Ca^{2+} активирующий эффект пептидов имел место только в присутствии в инкубационной среде кальмодулина. Очевидно, что как и в случае КЛЦМ, Ca^{2+} -независимое воздействие пептидных факторов на ФДЭ сАМР осуществляется путем их связывания с молекулой кальмодулина. ПФ, по-видимому, являются

Таблица 1

Активирование киназы легких цепей миозина (КЛЦМ), выделенной из гладкой мускулатуры желудка кур под воздействием коронароресуживающих пептидных факторов гипоталамуса (ПФ)

Соед. цепи:	Относительная активность %
Ca^{2+}	0
Ca^{2+} + кальмодулин	100
Ca^{2+} + ПФ _{1-3, 4, 5}	0
ЭГГА + кальмодулин	0
ЭГГА + кальмодулин + ПФ ₁	100
ЭГГА + кальмодулин + ПФ ₂	110
ЭГГА + кальмодулин + ПФ ₃	130
ЭГГА + кальмодулин + ПФ ₄	180
ЭГГА + кальмодулин + ПФ ₅	200

Примечание. Исследуемые соединения использовали в следующих концентрациях: кальмодулин—4,5 мкМ, CaCl_2 —0,1 мМ, ЭГГА—1 мМ; КЛЦМ гладкой мышцы—1,5 мкМ; ПФ₁₋₅—0,05 мкМ. За 100%-ную активность фермента принимали такое количество КЛЦМ, которое вызывало в течение 25 мин при 25° фосфорилирование легких цепей миозина на 50%.

ся аллостерическими регуляторами кальмодулина; их связывание с кальмодулином, в зависимости от концентрации ПФ, вероятно, может приводить структуру кальмодулина в различные активные конформационные состояния. К такому выводу мы пришли при исследовании методом ELISA влияния различных концентраций ПФ на образование иммунокомплекса кальмодулин-антитело в присутствии и в отсутствие Ca^{2+} , а также при изучении совместного эффекта ПФ и известного антагониста кальмодулина трифторперазина на образование иммунокомплекса [6].

Сравнение механизма действия ПФ и С-модулинов [3] выявило существенную разницу в механизме активирующего воздействия на Ca^{2+} -кальмодулинчувствительную ФДЭ сАМР. В то время как ПФ осуществляют свое воздействие путем связывания с молекулой кальмодулина и образования активного комплекса кальмодулин-пептидный фактор, являясь, по-видимому, эндогенными заместителями Ca^{2+} , С-модулины, обладая высоким сродством к ФДЭ сАМР [3], активируют фермент как в отсутствие Ca^{2+} , так и кальмодулина.

Помимо этих двух групп пептидных факторов, образующихся в гипоталамусе крупного рогатого скота, в настоящее время известен и ряд других факторов, вызывающих Ca^{2+} -независимую активацию ФДЭ сАМР и других чувствительных к кальмодулину систем [17—19].

Таким образом, на основании полученных данных можно заключить, что коронаросуживающие пептидные факторы гипоталамуса можно причислить к числу Ca^{2+} -независимых регуляторов в клетке, которые, по-видимому, и в условиях *in vivo* могут принимать участие в регуляции активности КЛЦМ, ФДЭ сАМР и, возможно, других Ca^{2+} -кальмодулинзависимых систем (при низком внутриклеточном уровне содержания Ca^{2+}) путем Ca^{2+} -независимого связывания с кальмодулином, обеспечивая при этом и регуляцию сокращения гладкой мускулатуры, являясь, вероятно, эндогенными заместителями Ca^{2+} .

В недавно проведенных исследованиях (Галоян А. А., Бархударян Н. А., Лотшпайх Ф., 1990 г., неопубликованные данные) по выяснению первичной структуры гипоталамических коронаросуживающих пептидных факторов было обнаружено, что 3 из них являются фрагментами 33—37 (Val-Val-Tyr-Pro-Trp), 33—38 (Val-Val-Tyr-Pro-Trp-Thr) и 32—38 (Leu-Val-Val-Tyr-Pro-Trp-Thr) β -цепи бычьего гемоглобина.

REGULATION OF SMOOTH MUSCLE CONSTRICTION BY HYPOTHALAMIC PEPTIDE FACTORS

ZAKHARYAN T. R., BARKHOUDARYAN M. A., SHUVALOVA L. A., OSTROVSKAYA M. V., SHAROVA N. P., GALOYAN A. A.

Institute of Biochemistry, Armenian Academy of Sciences, Yerevan

The effect of hypothalamic coronarconstrictory peptide factors on the activity of myosin light chain kinase (MLCK) isolated from chicken stomach smooth muscle and on that of calmoduline-sensitive cAMP PDE isolated from bovine hypothalamus has been investigated. The Ca^{2+} -independent activation of these enzymes by hypothalamic peptide factors in presence of calmodulin has been obtained. It was suggested that hypothalamic peptide factors are also able to participate *in vivo* in Ca^{2+} -independent regulation of MLCK and cAMP PDE providing in this case the smooth muscle constriction by means of Ca^{2+} -independent binding with calmodulin. In principle it points out that these compounds are endogenous substituators of Ca^{2+} .

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Галоян А. А., Гурвиц Б. Я. *Нейрохимия*, т. 5, № 4, с. 420—422, 1986.
2. Галоян А. А. *Нейрохимия*, т. 6, № 1, с. 3—9, 1987.
3. Галоян А. А., Бобрускин И. Д., Гурвиц Б. Я., Абрамян Г. Э. *Нейрохимия*, т. 8, № 1, с. 78—86, 1989.
4. Галоян А. А., Бархударян Н. А., Валко К., Закарян Т. Р. *Нейрохимия*, т. 7, № 4, с. 519—524, 1988.
5. Бархударян Н. А., Закарян Т. Р., Шувалова Л. А., Чиллян С. Г., Алексанян А. Р., Галоян А. А. *Нейрохимия*, т. 8, № 4, с. 485—491, 1989.
6. Бархударян Н. А., Хорват Л., Галоян А. А., Овади Ю. *Нейрохимия*, т. 9, № 2, с. 188—195, 1990.

7. Horvath L., Barkhudaryan N., Galoyan A., Ovadi J. 20th Meeting IFFS, Budapest, Hungary, p. 27, 1990.
8. Horvath L., Barkhudaryan N., Galoyan A., Ovadi J. FEBS Lett., v. 276, № 1, 2, p. 197-200, 1990.
9. Barkhudaryan N., Zakaryan T., Aleksanyan A., Sharova N., Shuzalova L., Chailyan S., Galoyan A. 8th ESN Meeting, Leipzig, DDR, p. 21. № 4, 1990.
10. Marston S. B. Prog. Biophys. Molec. Biol. v. 41, p. 1-41, 1982.
11. Hidaka H., Asano M., Tanaka T. Mol. Pharmacol., v. 20, p. 571-578, 1981.
12. Dabrowska R., Aromatorio D., Sherry J. H. F., Hartshorne D. J. Biochem. Biophys. Res. Commun., v. 78, p. 1263-1272, 1977.
13. Dabrowska R., Sherry J. H. F., Aromatorio D., Hartshorne D. J. Biochemistry, v. 17, p. 253-258, 1978.
14. Ferric W. T., Perry S. V. Biochem. J., v. 119, № 1, p. 31-38, 1970.
15. Lowry O. H., Rosebrough H. J., Farr L. A., Randall R. J. J. Biol. Chem. v. 193, p. 265-275, 1971.
16. Бобрускин И. Д., Шайхин С. М., Муратова М. В., Баранова Л. А., Северин Е. С. Биохимия, т. 52, вып. 8, с. 1344-1352, 1987.
17. Wolff D. J., Brostrom C. O. Arch. Biochem. and Biophys., v. 173, p. 720-731, 1976.
18. Дудкин С. М., Алахов В. Ю., Северин С. Е., Швец В. И. Докл. АН СССР, т. 276, № 6, с. 1510-1513, 1984.
19. Branford White C. L., Parker G., Dawson J. M., Fraser A. Biochem. Soc. Transl., v. 9, p. 417-418, 1981.

Поступила 2. IX. 1990