

Ca²⁺-НЕЗАВИСИМАЯ РЕГУЛЯЦИЯ АКТИВНОСТИ КАЛЬМОДУЛИНЗАВИСИМОЙ ФОСФОДИЭСТЕРАЗЫ ИЗ МОЗГА БЫКА С-МОДУЛИНАМИ

ГАЛОЯН А. А., *БОБРУСКИН И. Д., ГУРВИЦ Б. Я., АБРАМЯН Г. Э.

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

*МГУ им. М. В. Ломоносова

Показано, что С-модулины являются Ca²⁺-независимыми аллостерическими регуляторами активируемой кальмодулином ФДЭ мозга быка. Установлено, что взаимодействие С-модулинов с ферментом происходит по центрам, отличным от каталитического и кальмодулинсвязывающего. Взаимодействие С-модулинов с ФДЭ характеризуется кажущейся K_d комплекса порядка 10⁻⁹ М и приводит к увеличению максимальной скорости гидролиза сАМР в ~ 10 раз. При этом образование комплекса (ФДЭ·С-модулин) не влияет на сродство субстрата к ферменту. Показано, что действие С-модулинов и кальмодулина на активность ФДЭ носит аддитивный характер, причем в их присутствии не изменяется константа активации фермента, но заметно возрастает максимальная скорость гидролиза сАМР. Установлено также, что стимуляция активности ФДЭ при совместном действии С-модулинов и кальмодулина значительно подавляется в присутствии антагониста кальмодулина — трифторперазина. Полученные в настоящей работе результаты позволяют предположить о существовании на поверхности ФДЭ С-модулинсвязывающего участка, отличающегося от каталитического и кальмодулинсвязывающего центров фермента.

ФДЭ циклических нуклеотидов — ключевой фермент метаболизма клетки, регулирующий уровень вторичного мессенджера сАМР [1]. В мозгу этот фермент представлен несколькими формами, одна из которых, Ca²⁺-кальмодулинзависимая (КМ-зависимая), является наиболее изученной [2—5]. Характерной особенностью КМ-зависимой ФДЭ является наличие специфического аллостерического центра, взаимодействующего с КМ в присутствии Ca²⁺. Образование комплекса (Ca²⁺·КМ·ФДЭ) приводит к значительному увеличению скорости гидролиза циклических нуклеотидов [6, 7]. Предполагается, что регуляция активности ФДЭ под действием КМ *in vivo* находится в прямой зависимости от внутриклеточного уровня Ca²⁺ [8]. В этой связи особый интерес представляют КМ-подобные, но Ca²⁺-независимые регуляторные системы, способные при определенных условиях, в особенности при лимитированном уровне содержания Ca²⁺, компенсировать многие функции, осуществляемые КМ.

В настоящее время известен ряд факторов, вызывающий Ca²⁺-независимую активацию ФДЭ. К их числу относятся жирные кислоты и

фосфолипиды [9], бактериомодулин [10], ограниченный протеолиз [11], сульфгидрильные реагенты [12], некоторые простагландины [13] и многие другие соединения.

Принципиально важным было открытие Галояном и соавт. новых Ca^{2+} -независимых активаторов ФДЭ, обнаруженных в составе кардиотропного нейрогормона «С» [14]. Активаторы были названы С-модулинами ввиду их высокой биологической активности, коррелирующей с модуляцией активности ФДЭ. Было высказано предположение, что С-модулины в совокупности с другими органотропными факторами в составе препарата нейрогормона «С», образуют высокоэффективный комплекс, индуцирующий активность нейрогормона «С» [15].

Известно, что нейрогормон «С» является универсальным регулятором многих внутриклеточных процессов [15], уровня циклических нуклеотидов и Ca^{2+} [16—18], захвата и высвобождения нейромедиаторов из синаптических окончаний [19], регуляции гликолиза [20, 21]. Кроме того, установлено влияние нейрогормона «С» на сердечную деятельность и коронарное кровообращение [22].

Возможное участие С-модулинов в этих и других процессах делает их объектом всесторонних исследований. Известно, что эти активаторы являются низкомолекулярными соединениями, по-видимому, пептидной природы [14], способными Ca^{2+} -независимым путем стимулировать активность ФДЭ. Однако изучение механизмов регуляции активности фермента под действием С-модулинов остается на сегодняшний день актуальной задачей.

В настоящей работе предпринята попытка подхода к обсуждаемой проблеме. Проверена возможность существования комплекса ФДЭ с С-модулинами и исследованы изменения физико-химических параметров фермента при его образовании как в присутствии, так и в отсутствие КМ.

Материалы и методы

В работе были использованы следующие препараты: сАМР, ЭГТА („Calbiochem“, США), $[^3\text{H}]\text{сАМР}$ („Amersham“, Англия), трис, NaN_3 („Serva“, ФРГ), трифторуксусная кислота, ацетонитрил („Fluka“, Швейцария), β -меркаптоэтанол („Merk“, ФРГ), анионообменная смола Dowex 1×2 , 50—100 меш („Serva“, ФРГ), хромато графические сорбенты фенил-сефароза („Pharmacia“, Швеция), ДЭАЭ TSK Toyopearl 650 M („Toyo Soda“, Япония). Остальные реактивы производства „Союзхимреактив“, СССР, квалификации ос. ч. Уровень радиоактивности проб определяли с помощью жидкостного сцинтилляционного спектрометра типа „Intertechnique“ (Франция) с использованием сцинтиллятора ЖС—7А („Союзхимреактив“ СССР). ВЭЖХ проводили на хроматографе „Altex-Beckman“ (США) с применением колонок С—18, $4,6 \times 250$ мм („Ultrasphere ODS“, США), TSK ДЭАЭ 3SW $21,5 \times 150$ мм („LKB“, Швеция) и колонки для гель-фильтрации „Sphergel“ TSK 2000, SW, $7,5 \times 600$ мм („Altex-Beckman“, США).

Очистка Ca^{2+} -КМ-зависимой ФДЭ из мозга быка. Препарат ФДЭ получали по методу Бобрускина и Шайхина [23]. Мозг (400 г) гомогенизировали с помощью гомогенизатора типа «Политрон» в 25 мМ трис-НСl буфере, pH 7,0, содержащем 1 мМ ацетат магния, 3 мМ дитиотреитол или β -меркаптоэтанол, 0,1 мМ азид-Na. Гомогенат центрифугировали на центрифуге «Beckman G-21» (ротар JA-14) при 22000g в течение 60 мин. Супернатант подвергали ИОХ на колонке ДЭАЭ TSK; элюцию осуществляли с помощью буфера А, содержащего 25 мМ трис-НСl, pH 7,0, 200 мМ NaCl, 1 мМ MgCl_2 , 1 мМ дитиотреитол, 0,1 мМ азид-Na. Элюат наносили на колонку с фенол-сефарозой, с которой фермент связывался в присутствии Ca^{2+} (1 мМ) и элюировался буфером В, содержащим 0,2 мМ ЭГТА.

Далее фермент подвергали ионообменной ВЭЖХ на колонке ДЭАЭ TSK 3SW, элюцию с которой осуществляли линейным градиентом концентраций NaCl (100—350 мМ). На последней стадии очистки фермент подвергали гель-фильтрации методом ВЭЖХ. Элюцию осуществляли буфером, содержащим 25 мМ трис-НСl, pH 7,0, 2 мМ ЭГТА, 0,1 М NaCl. Белок определяли по поглощению в УФ-спектре при 280 нм.

Очистка КМ. КМ выделяли по методу Goralkrishna, Anderson [24], с некоторыми модификациями [23]. Дальнейшую очистку осуществляли методом ионообменной ВЭЖХ на колонке TSK ДЭАЭ, с которой КМ элюировали, используя линейный градиент концентраций NaCl (150—350 мМ) в 25 мМ трис-НСl буфере, pH 7,0. Элюат подвергали диализу против дистиллированной воды, после чего лиофилизировали. Выделенный таким образом КМ оказался гомогенным в 15%-ном ПААГ в присутствии 0,1%-ного ДДС-Na по данным электрофореза, проведенного по методу Laemmli [25].

Очистка С-модулинов. Препарат карнитропного нейрогормона «С», выделенный из магноцеллюлярных ядер гипоталамуса быка [26], подвергали дальнейшей очистке с помощью обратнотазовой ВЭЖХ по методу, предложенному нами ранее [14]. Исходный препарат нейрогормона «С» наносили на колонку С-18. Элюцию осуществляли в режиме линейного градиента ацетонитрила в воде (0—30%) со скоростью 1 мл/мин. Выход продукта контролировали по поглощению в УФ-области 210—220 нм. После лиофилизации пробы, проявляющие способность активировать ФДЭ, подвергали повторной хроматографии. Чистоту препаратов С-модулина проверяли при помощи гель-проникающей ВЭЖХ на колонке TSK SW-2000, уравновешенной 0,05 М натрий-фосфатным буфером, pH 7,0, содержащим 0,1 мМ ЭГТА. Элюцию проводили тем же буфером со скоростью 0,3 мл/мин.

Выход продукта регистрировали по поглощению при 210—220 нм.

Определение активности ФДЭ. Активность ФДЭ определяли по методу Thompson, Appleman [27], основанному на измерении концентрации [^3H] аденозина в реакционной среде, образующегося в результате двухстадийной реакции гидролиза [^3H]сАМР и [^3H]5'-АМР с

участием ФДЭ и 5'-нуклеотидазы змеиного яда соответственно. Образовавшийся продукт отделяли от негидролизированных субстратов внесением в инкубационную смесь водной суспензии анионообменной смолы «Dowex». После центрифугирования определяли уровень радиоактивности супернатанта.

Результаты представлены в относительных единицах активности (ОЕА), рассчитанных по проценту гидролизованного сАМР в мин с учетом остаточной радиоактивности проб в отсутствие фермента и уровня неспецифической сорбции аденозина на ионообменнике при полном гидролизе субстрата в присутствии избытка фермента.

Результаты и обсуждение

Ранее было показано наличие в составе нейрогогона «С» трех термостабильных С-модулинов [14]. Характерная для всех трех модуляторов Ca^{2+} -независимая стимуляция активности ФДЭ исследована нами на С1. Установлено, что активация фермента увеличивается с ростом концентрации С-модулина и переходит на постоянный уровень в области насыщающих концентраций (рис. 1, а). График, представ-

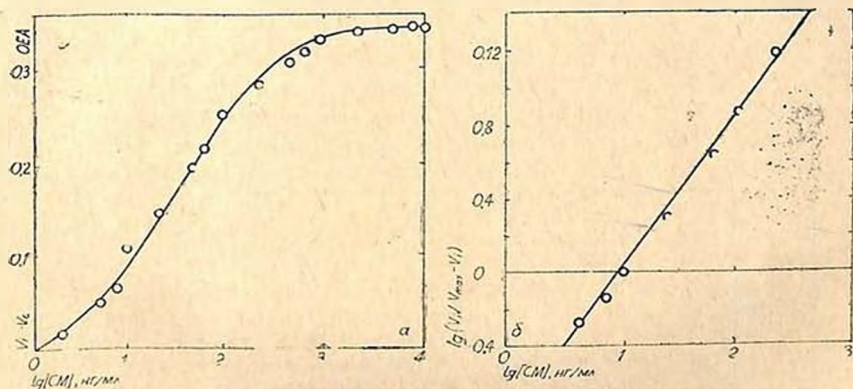
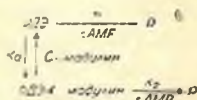


Рис. 1. Зависимость начальной скорости гидролиза сАМР от концентрации С-модулина (1) и кальмодулина (2). Опыты проводили в логарифмических координатах (а) и в координатах Хилла (б) в присутствии 0,2 мМ ЭГТА или Ca^{2+} соответственно. По оси абсцисс—логарифм концентрации активаторов (А), выраженный в нг/мл, по оси ординат—скорость гидролиза сАМР при концентрации субстрата 5 мкМ, выраженная в относительных единицах активности (ОЕА), где V_a и V_0 —скорость реакции в присутствии и в отсутствие активатора соответственно

ленный в координатах Хилла (рис. 1, б), свидетельствует о высоком сродстве С-модулина к ФДЭ, так как кажущаяся K_d комплекса (С-модулин·ФДЭ) составляет $2 \cdot 10^{-9}$ М. Значение величины n_H , равное 1, указывает на отсутствие кооперативности при взаимодействии фермента с С-модулином.

На рис. 2 представлен график зависимости активности ФДЭ от концентраций субстрата (сАМР) в координатах Лайнуивера-Бэрка под действием С-модулина. Эксперимент проведен в присутствии 0,2 мМ ЭГТА и С-модулина в двух фиксированных концентрациях (100 и 1000 нг/мл). Из графика следует, что величина эффективной константы сродства субстрата к молекуле ФДЭ, равная ~ 100 мкМ, не меняется при увеличении концентрации активатора на порядок. Вместе с тем, значение V_{max} претерпевает 6-кратное увеличение. Таким образом, связывание С-модулина во всем диапазоне представленных концентраций сАМР, по всей видимости, происходит неконкурентно по отношению к активному центру на молекуле ФДЭ. Схему активации можно представить следующим образом:



где k_1 —константа скорости в отсутствие С-модулина, k_2 —константа скорости при насыщающих его концентрациях, K_a —константа активации, Р—продукт реакции.

На рис. 3 представлен график зависимости активности ФДЭ под действием КМ от концентраций активатора в присутствии двух фиксированных концентраций С-модулина. Как видно из графика, в присутствии С-модулина наблюдается активация фермента, степень которой мало меняется при увеличении его концентрации. Повышение

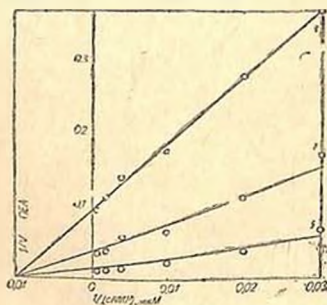


Рис. 2. Зависимость начальной скорости гидролиза сАМР от концентрации субстрата в координатах Лайнуивера-Бэрка при различных концентрациях С-модулина в нг/мл: 1—0, 2—100, 3—1000. Измерения выполнены в присутствии 0,2 мМ ЭГТА

концентрации С-модулина на порядок не изменяет точки перегиба кривой на оси абсцисс. Представленный на рис. 3, б график в координатах Хилла, отражающий ту же зависимость, показывает, что добавление С-модулина в реакционную смесь не приводит к изменению эффективной константы активации ФДЭ под действием КМ.

Можно предположить, что связывание С-модулина и КМ с молекулой ФДЭ носит неконкурентный характер. При этом степень активации ФДЭ под действием КМ в сочетании с С-модулином выше, чем тот же параметр для активации ФДЭ комплексом $(\text{Ca}^{2+} \cdot \text{КМ})$. Сле-

довательно, влияние С-модулина и КМ на активность ФДЭ носит аддитивный характер. О возможном существовании комплекса (КМ-ФДЭ-С-модулин) свидетельствует тот факт, что при насыщающих концентрациях КМ в присутствии С-модулина графики зависимости активности ФДЭ от концентраций КМ выходят на уровень, превышающий максимальную величину степени активации ФДЭ под действием КМ в отсутствие С-модулина (рис 3).

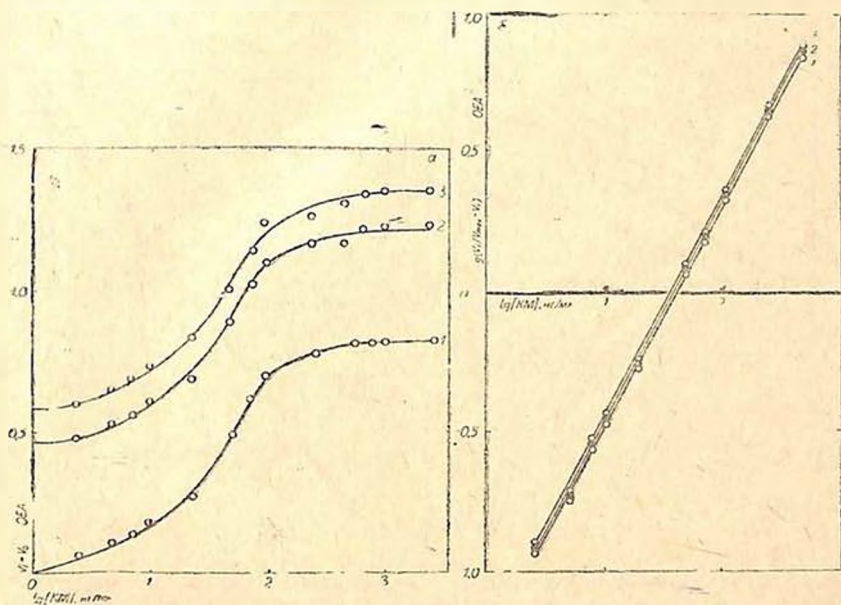


Рис. 3. Зависимость начальной скорости гидролиза сАМР от концентрации кальмодулина при различных концентрациях С-модулина в логарифмических координатах (а) и в координатах Хилла (б): 1—0, 2—100, 3—1000 нг/мл. По оси абсцисс—логарифм концентрации кальмодулина, выраженной в нг/мл, по оси ординат—скорость гидролиза сАМР при концентрации субстрата 5 мкМ, выраженной в ОЕА. Измерения выполнены в присутствии 2 мМ Ca^{2+} . Обозначения те же, что и на рис. 1

Аналогичную картину можно наблюдать на рис. 4, а, где представлена зависимость активности ФДЭ под действием С-модулина от концентраций последнего при двух фиксированных концентрациях КМ. Увеличение степени активации фермента и отсутствие изменения точек перегиба с изменением концентрации КМ на порядок очевидны, что показано и на рис. 3, а. Тот же график, представленный в координатах Хилла (рис. 4, б) свидетельствует о том, что КМ влияет на кинетические параметры реакции, катализируемой комплексом С-модулин—ФДЭ, посредством незначительного изменения сродства С-модулина к ферменту.

Последним в этой серии является эксперимент по изучению влия-

ния антагониста КМ—трифторперазина на активность комплекса (Ca^{2+} ·КМ·ФДЭ·С-модулин). Результаты представлены на рис. 5, из которого следует, что в присутствии 100 мкМ трифторперазина наблюдается ингибирование комплекса (Ca^{2+} ·КМ·ФДЭ·С-модулин) до уровня, превышающего величину максимальной активности комплекса (Ca^{2+} ·КМ·ФДЭ) в присутствии антагониста. Трифторперазин тормо-

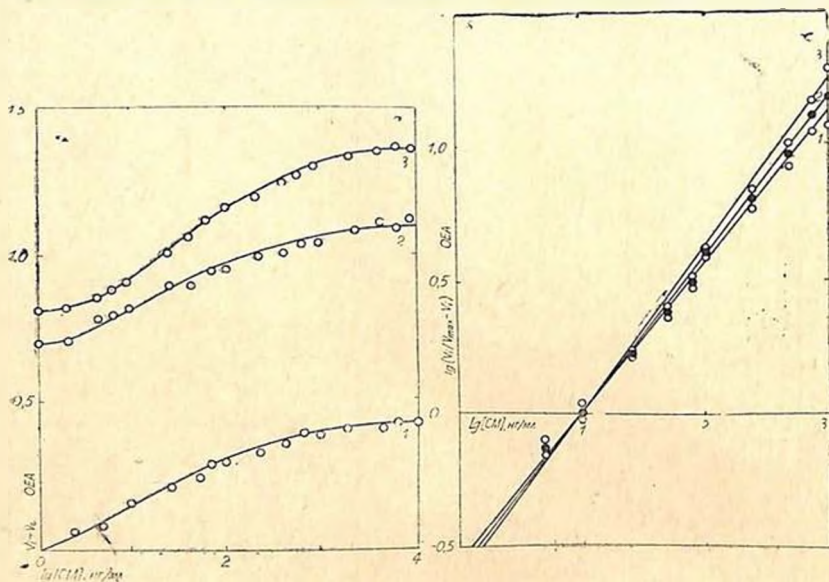


Рис. 4. Зависимость начальной скорости гидролиза сАМР от концентрации С-модулина при различных концентрациях кальция в логарифмических координатах (а) и в координатах Хилла (б): 2—100, 3—1000 нг/мл. По оси абсцисс—логарифм концентрации С-модулина, выраженной в нг/мл, по оси ординат—скорость гидролиза сАМР при концентрации субстрата 5 мкМ, выраженной в ОЕА. Измерения выполнены в присутствии 2 мМ Ca^{2+} . Обозначения те же, что и на рис. 1

зит также стимуляцию активности фермента С-модулином. Однако в отличие от 90%-ного ингибирования в случае комплекса (Ca^{2+} ·КМ·ФДЭ), трифторперазин лишь частично (на 40%) снижал активность комплекса (С-модулин·ФДЭ). Следовательно, можно предположить, что инактивация комплекса (Ca^{2+} ·КМ·ФДЭ·С-модулин) антагонистом КМ осуществляется за счет блокирования КМ и частичного торможения активирующего действия С-модулина.

Таким образом, из экспериментальных данных настоящей работы следует, что С-модулины могут выполнять роль Ca^{2+} -независимых аллостерических активаторов КМ-чувствительной ФДЭ из мозга быка.

Неконкурентное связывание с молекулой ФДЭ относительно субстрата сАМР является общим свойством С-модулинов. Иначе говоря,

сродство субстрата к активному центру на молекуле ФДЭ не претерпевает сколь-нибудь существенных изменений. Этот вывод согласуется с имеющимися на сегодняшний день литературными данными относительно Ca^{2+} -независимой активации КМ-чувствительной ФДЭ из мозга на примере жирных кислот [28, 29].

Некоторыми исследователями [30] предлагается гипотетическая модель взаимодействия Ca^{2+} -независимых модуляторов с ферментом посредством КМ-связывающего центра на молекуле ФДЭ. В условиях наших экспериментов, обсуждаемых выше, данная модель не подтвер-

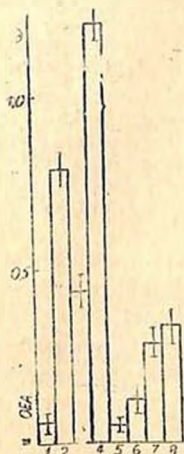


Рис. 5. Влияние трифторперазина (ТФП) на активность ФДЭ. Базальная активность ФДЭ (1), активация ФДЭ под действием Ca^{2+} -кальмодулина (2), С-модулина (3), С-модулина и (Ca^{2+} -КМ) (4). Те же параметры в присутствии 100 мкМ трифторперазина (5, 6, 7 и 8). Измерения проводили при концентрации субстрата (сАМР) 5 мкМ

дилась. Более того, из результатов экспериментов по определению активности ФДЭ в присутствии С-модулина и комплекса (Ca^{2+} -КМ) следует, что С-модулинсвязывающий центр не перекрывается с КМ-связывающим участком на молекуле фермента, то есть возможно существование комплекса (Ca^{2+} -КМ-ФДЭ-С-модулин). Иными словами, конкуренция С-модулина за центр связывания КМ на поверхности фермента маловероятна, поскольку сродство КМ к аллостерическому регуляторному участку ФДЭ не подвергается изменениям под влиянием С-модулина (рис. 3, а, б). В присутствии КМ некокурентный по отношению к С-модулину характер взаимодействия с ФДЭ проявляется во всем диапазоне представленных концентраций С-модулина.

Таким образом, можно предположить наличие на поверхности ФДЭ некоторого центра, способного взаимодействовать с С-модулинами. Такое взаимодействие направлено на увеличение максимальной скорости гидролиза сАМР как в присутствии, так и в отсутствие КМ. При этом подобное взаимодействие не изменяет сродства субстрата к активному центру ФДЭ.

Авторы выражают благодарность М. В. Муратовой, А. С. Белову (МГУ, кафедра биохимии) за техническое содействие.

CALCIUM-INDEPENDENT MODULATION OF BOVINE BRAIN CALMODULIN-SENSITIVE PHOSPHODIESTERASE-ACTIVITY BY C-MODULINS

GALOYAN A. A., *BOGRUSKIN I. D., GURVITS B. Ya., ABRAHAMYAN G. E.

Institute of Biochemistry, Armenian of Sciences, Yerevan

*Moscow State University

The bovine hypothalamus contained heat-stable factors possessing cardiotropic action and stimulating Ca^{2+} /CaM-sensitive phosphodiesterase activity 6—10 fold in the absence of calcium ions.

Kinetic analysis of the stimulating effect of one of such activators demonstrated, that C-modulin mimicked the regulation of phosphodiesterase activity by calmodulin. The apparent dissociation constant of the activator-enzyme complex—was $2 \cdot 10^{-9}$ M and hill coefficient (n_H) averaged 1.

The binding of C-modulin to the enzyme was accompanied by the significant increase of the maximal rate of cAMP hydrolisis and was in competitive respect in cAMP ($K_m = 100$ mM).

The activating of C-modulins on phosphodiesterase beard additive character in presence of Ca^{2+} /CaM and caused an insignificant improvement in K_m for calmodulin activation amounted to $3,3 \cdot 10^{-9}$ M.

The data presented testify that C-modulins are Ca^{2+} -independent allosteric activators of Ca^{2+} /CaM-sensitive phosphodiesterase from bovine brain.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Sutherland E. W., Rall T. W. J. Biol. Chem., v. 232, p. 1077—1091, 1958.
2. La Porte D. S., Tocano W. A., Storm D. R. Biochemistry, v. 18, p. 282C—282, 1979.
3. Kincaid R. L., Manganiello V. C., Vangen M. J. Biol. Chem., v. 256, p. 11345—11350, 1931.
4. Sharma R. K., Wang T. H., Wirch E., Wang J. H. J. Biol. Chem., v. 255, p. 5916—5923, 1980.
5. Ho H. C., Wirch E., Wang J. H. J. Biol. Chem., v. 252, p. 43—50, 1977.
6. Lin Y. M., Lin Y. P., Cheung W. Y. FEBS Lett., v. 49, p. 359—362, 1975.
7. Teshima Y. M., Kakiuchi S. Biochem. and Biophys. Res. Commun., v. 56, p. 489—495, 1974.
8. Huang C. Y., Chau V., Chock P. B. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, v. 78, p. 871—874, 1981.
9. Wolf D. I., Brostrom C. O. Arch. Biochem. and Biophys., v. 173, p. 720—731, 1976.
10. Дудкин С. М., Алахов В. Ю., Северин С. Е., Швец В. И. Докл. АН СССР, т. 276, № 6, с. 1510—1513, 1984.
11. Krinks M. N., Haseh J., Rhoads A., Klee G. B.—In: Adv. in Cyclic Nucleotide and Protein Phosphorylation Res. (eds. S. I. Strada, W. J. Thompson), v. 16, p. 31—47, Raven Press., N. Y., 1984.
12. Cheung W. Y., Lim Y. M.—In: Methods in Enzymology, Part. C. Academic Press, N. Y., London, v. 38, p. 223—239, 1971.

13. Hamet P., Franks D. J., Tremblay J., Coquil J. F. J. Biol Chem., v. 61, p. 1158—1163, 1963.
14. Галоян А. А., Бобрускин И. Д., Гурвиц Б. Я., Абрамян Г. Э. Нейрохимия, т. 8, № 1, с. 78—86, 1989.
15. Галоян А. А. Нейрохимия, т. 6, № 1, с. 3—9, 1987.
16. Галоян А. А., Гурвиц Б. Я. Вестник Академии Мед. наук СССР, т. 9, с. 64—69, 1982.
17. Галоян А. А., Гурвиц Б. Я., Погосян М. А.—В кн.: Вопросы биохимии мозга, Ереван, Изд. АН АрмССР, т. 11, с. 89—93, 1976.
18. Гурвиц Б. Я., Сарибекян Г. А., Солова Е. С., Галоян А. А. Докл. АН АрмССР, т. XVI, с. 220—225, 1978.
19. Галоян А. А., Чифликян М. Д., Мурадян М. Ш., Едигарян А. К., Абрамян С. С. Нейрохимия, т. 5, № 1, с. 45—48, 1986.
20. Парсиданян Г. К., Абелян Ж. Г., Галоян А. М. Докл. АН АрмССР, т. 66, с. 164—167, 1978.
21. Срапионян Р. М., Саакян С. А., Абелян Ж. Г., Галоян А. А. Вopr. биохимии мозга, г. Ереван, Изд. АН АрмССР, т. 3, с. 36—42, 1976.
22. Галоян А. А., Алексанян С. С. Докл. АН АрмССР, т. 58, с. 183—186, 1974.
23. Бобрускин И. Д., Шайхин С. М., Муратова М. В., Баранова Л. А., Северин Е. С. Биохимия, т. 52, вып. 8, с. 1344—1352, 1987.
24. Gopalakrishna R., Anderson W. B. Biochem. and Biophys. Res. Commun., v. 104 p. 830—836, 1982.
25. Laemmli U. K. Nature, v. 227, p. 680—683, 1970.
26. Галоян А. А. Вopr. биохимии мозга, т. 13, с. 9—38, 1978.
27. Thompson W. J., Appleman M. M. Biochemistry, v. 10, p. 311—316, 1971.
28. Cheung W. C., Lynch T. J., Wallance P. W. Adv. Cycl. Nuct. Res., v. 9, p. 231—251, 1978.
29. Games S. L. FEBS Lett., v. 99, p. 39—42, 1979.
30. Gietzen K., Sador F. I., Bader H. Biochem. J., v. 3, p. 541—548, 1982.

Поступила 28. X. 1990