



УДК 616—008.939.633.2—02:616—008.931:577.152.314

КАЛЬЦИЙНЕЗАВИСИМЫЕ АКТИВАТОРЫ
ФОСФОДИЭСТЕРАЗЫ ЦИКЛИЧЕСКИХ НУКЛЕОТИДОВГАЛОЯН А. А., *БОБРУСКИН И. Д., ГУРВИЦ Б. Я., АБРАМЯН Г. Э.
Институт биохимии АН АрмССР, Ереван
*МГУ им. М. В. Ломоносова, Москва

В составе препарата кардиотропного нейрогормона «С», выделенного ранее из гипоталамуса быка, обнаружены три термостабильных активатора высокоочищенной кальмодулинзависимой ФДЭ мозга быка. Установлена их способность стимулировать ФДЭ в 6—10 раз в отсутствие ионов кальция. Кинетический анализ стимулирующего действия одного из активаторов выявил его высокое сродство к ферменту. Кажущаяся константа диссоциации комплекса [активатор—фермент] составляла 10 нг/мл; $pH = 1$.

Активаторы были очищены до гомогенного состояния с помощью обратно-фазовой ВЭЖХ и гель-фильтрации; величины их M_r составляют 3000—7800 Д.

Стимулирующий эффект на ФДЭ не проявлялся после обработки выделенных факторов трипсином (0,1 мг/мл, 10 мин при 30°), что указывает на их возможную пептидную природу.

В 60-ые годы из гипоталамуса различных животных А. А. Галояном и соавт. были выделены коронароактивные вещества полипептидной природы [1, 2]. В дальнейшем были разработаны методы очистки трех групп коронарорасширяющих соединений, названных веществами «К», «С», и «Г» [2], а также их множественных форм [3]. Установлено, что выделенные соединения являются нейрогормонами [4].

Принципиально важным было открытие специфических белков-носителей нейрогормонов «К», «С» и «Г» [5]. В процессе очистки и идентификации кардиотропных белок-гормональных комплексов гипоталамуса обнаружены также 14 коронаросуживающих фракций, некоторые из которых являются полипептидами [6].

Далее было установлено, что нейрогормоны «К», «С» и «Г», а также пептиды, обнаруженные в составе фракций нейрогормона «С», влияют на самые различные метаболические процессы, главным образом, на обмен циклических нуклеотидов, биосинтез катехоламинов и транспорт ионов кальция [7, 8]. В частности, выявлена способность нативного коронарорасширяющего гликопептидного нейрогормона «С» ингибировать активность кальмодулинзависимой ФДЭ циклических нуклеотидов мозга и

сердца. Было показано также, что некоторые другие нейрогормоны и коронаросуживающие соединения гипоталамуса являются ингибиторами либо активаторами ФДЭ [9—11].

В этой связи большой интерес представляет исследование механизмов действия трех термостабильных Ca^{2+} -независимых активаторов ФДЭ мозга быка, выделенных из состава нейрогормона «С» при его дальнейшей очистке методом ВЭЖХ. Эти активаторы были названы нами С-модулином, так как они, по всей вероятности, являются регуляторами кардиотропного действия нейрогормона «С».

В настоящей работе приведены методы выделения С-модулинов, а также результаты исследований некоторых из их свойств и кинетических характеристик их стимулирующего действия на активность высокоочищенной кальмодулинзависимой ФДЭ мозга быка.

Материалы и методы

В работе были использованы следующие реактивы: сАМР, ЭГТА, трипсин («Calbiochem», США); трис («Serva», ФРГ); ЭДТА, дитиотреитол (ДДТ), NaN_3 , («Reanal», Венгрия); β -меркаптоэтанол («Merk», ФРГ); набор для определения величины M_r пептидов («Pharmacia» Швеция); ацетонитрил («Fluka», Швейцария); анионообменные смолы Дауэкс 1×2 , 50—100 меш. и Амберлит CG—400, 100—200 меш. («Serva», ФРГ); хроматографические сорбенты: фекил-сефароза («Pharmacia», Швеция) и TSK DEAE Toyopearl 650 M («Toyo Soda», Япония); остальные реактивы марок х.ч. и ос.ч. («Союзхимреактив», СССР).

Препарат меченого $[8\text{-}^3\text{H}]\text{сАМР}$ («Союзхимреактив») очищали с помощью ТСХ на пластинках «Силуфол» («Kavalier», ЧССР) в системе: изопропанол—водный аммиак (25%)—вода (7:1:2). Полосу, соответствующую $[^3\text{H}]\text{сАМР}$, идентифицированную в ультрафиолете, вырезали и хранили в течение длительного времени при -10° . Перед использованием метку экстрагировали из слоя силикагеля 50%-ным этанолом, создавая требуемую удельную радиоактивность. Уровень радиоактивности проб определяли с помощью жидкостного сцинтилляционного спектрометра типа «Intertechnique» (Франция) с использованием сцинтиллятора ЖС 7А («Союзхимреактив»). ВЭЖХ проводили на хроматографе «Altex Beckman» (США) с применением колонок C_{18} ($4,6 \times 250$ мм) («Ultrasphere ODS, Beckman», США); ДЭАЭ ($21,5 \times 150$ мм) (TSK DEAE—3SW «LKB», Швеция) и колонки для гель-фильтрации ($7,5 \times 600$ мм) («Sphergel TSK 2000, SW, Altex», Япония).

Очистка кальмодулинзависимой ФДЭ. Фермент выделяли из мозга крупного рогатого скота по методу, описанному в литературе [12], разработанному на основе аффинной хроматографии на фекил-сефарозе [13]. Ткань мозга гомогенизировали в 25 мМ трис-НСI буфере, рН 7,0 (1:2:5), содержащем 1 мМ ацетата магния, 5 мМ ДТТ или β -меркаптоэтанола, 0,1 мМ NaN_3 , с помощью гомогенизатора типа «Политрон». Гомогенат

центрифугировали при 22000 g в течение 1 ч на центрифуге «Beckman J-21» (ротор G-14). Супернатант подвергали ионообменной хроматографии на колонке (4×11 см) с TSK ДЭАЭ; элюцию фермента осуществляли с помощью 200 мМ NaCl в 25 мМ трис-HCl буфере, рН 7,0, содержащем 1 мМ MgCl₂, 1 мМ ДДТ, 0,1 мМ NaN₃ (буфер А). Элюат наносили на колонку (4×5,6 см) с фенил-сефарозой, с которой фермент связывался в присутствии Ca²⁺ (1 мМ) и элюировался буфером А, содержащим вместо Ca²⁺ 0,2 мМ ЭГТА. Далее фермент подвергали повторной ионообменной хроматографии на колонке (3,5×6 см) с TSK ДЭАЭ, элюцию с которой осуществляли линейным градиентом концентраций NaCl (50—300 мМ).

Активность ФДЭ определяли по методу Thompson, Appleman [14] с использованием двухстадийной реакции гидролиза [³H]сАМР и [³H]5'-AMP с участием ФДЭ и 5'-нуклеотидазы змеиного яда соответственно. [³H]аденозин, образовавшийся в результате этой двухстадийной реакции, отделяли от негидролизованых субстратов внесением в инкубационную смесь (200 мкл) водной суспензии Амберлита или Дауэкса (1 мл). После центрифугирования определяли уровень радиоактивности супернатанта. Результаты представлены в относительных единицах активности (О.Е.А.), рассчитанных по проценту гидролизованного субстрата 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.

Очистка кальмодулина. Кальмодулин выделяли по методу Gopalakrishna, Anderson [13] с некоторыми модификациями [12]. Дальнейшую его очистку проводили с помощью ВЭЖХ на колонке TSK ДЭАЭ (21,5×150 мм), с которой кальмодулин элюировали линейным градиентом концентраций NaCl (150—350 мМ) в 25 мМ трис-HCl буфере, рН 6,8. Элюат подвергали диализу против дистиллированной воды, после чего лиофилизировали. Выделенный таким образом кальмодулин оказался гомогенным по данным электрофореза в 10%-ном ПААГ в присутствии 0,1%-ного ДДС-Na, проведенным по методу Laemmli [15].

Выделение С-модулинов. Препарат кардиотропного нейрогормона «С», выделенный из магноцеллюлярных ядер гипоталамуса быка [2], подвергали дальнейшей очистке с помощью обратнo-фазовой ВЭЖХ на колонке С18. Элюцию проводили со скоростью 1 мл/мин с использованием линейного градиента ацетонитрила в воде (0—20%). Элюированные фракции после лиофилизации растворяли в 50 мМ трис-HCl буфере. Пробы, проявляющие способность активировать ФДЭ, подвергали гель-фильтрации в системе ВЭЖХ на колонке TSK 2000 SW, уравновешенной 20 мМ трис-HCl буфером, рН 6,8, содержащим 0,1 мМ ЭГТА и 100 мМ NaCl. Элюцию проводили тем же буфером со скоростью 0,5 мл/мин. Величину M_r С-модулинов определяли в сравнении с результатами гель-фильтрации в системе ВЭЖХ в указанных условиях набора стандартных пептидных фрагментов миоглобина с M_r в диапазоне 1700—172000 Д, содержащих различное число аминокислотных остатков: 14, 22, 55, 76, 131 и 153. Выход белков регистрировали по УФ-поглощению пептидной связи при

220 нм с последующей проверкой способности фракций активировать ФДЭ.

Трипсинолиз С-модулинов. С-модулины (0,01 мг/мл) инкубировали при 30° в присутствии трипсина (0,1 мг/мл) в течение 10 мин, после чего пробы помещали в кипящую водяную баню на 1,5 мин. Далее исследовали возможность взаимодействия С-модулинов с ФДЭ по стандартной методике. Ограниченный трипсинолиз ФДЭ проводили в аналогичных условиях, однако фермент инкубировали с трипсином в течение 3 мин.

Результаты и обсуждение

При фракционировании препарата нейrogормона «С» с помощью обратно-фазовой ВЭЖХ на колонке C_{18} (4,6×250 мм) с использованием линейного градиента ацетонитрила в воде были выделены три фактора (C_1 , C_2 и C_3), обладающие способностью активировать ФДЭ, выделенную из мозга быка (см. «Материалы и методы») (рис. 1). Фермент обладал высоким сродством к кальмодулину ($K_d=3,3$ нмоль) и активировался кальмодулином в присутствии Ca^{2+} в 10—15 раз. Из рис. 1, сле-

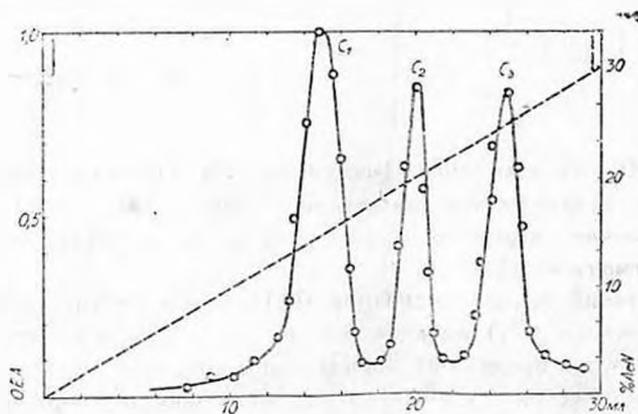


Рис. 1. Фракционирование С-модулинов путем обратно-фазовой ВЭЖХ на колонке C_{18} . По оси абсцисс—объем элюата в мл; по оси ординат (слева)— скорость реакции в присутствии элюируемых фракций (0,1 мг/мл). ○—○—профиль элюции нейропептидов, — — — градиент ацетонитрина в воде

дует, что скорость гидролиза сАМР при концентрации субстрата 5 мкМ возрастает в присутствии C_1 , C_2 и C_3 в 6—10 раз. Максимальную активацию вызывала фракция C_1 .

Наблюдаемые эффекты были Ca^{2+} -независимыми. Они проявлялись в присутствии в инкубационной смеси 0,5 мМ ЭГТА, и при замене ЭГТА на 0,5 мМ $CaCl_2$ степень активации ФДЭ под действием C_1 — C_3 не изменялась.

Активирующие свойства выделенных факторов полностью сохранялись после кипячения в водяной бане в течение 1,5 мин. После преинкубации в течение 10 мин каждого из C_1 , C_2 и C_3 в концентрации 0,01 мг/мл в присутствии трипсина (0,1 мг/мл) активация ФДЭ под действием C_1 , C_2

или C_3 не наблюдалась, что может свидетельствовать о пептидной природе этих термостабильных активаторов (рис. 2).

По данным гель-фильтрации в системе ВЭЖХ на колонке TSK 2000

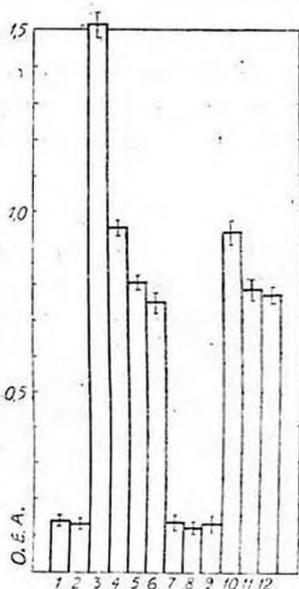


Рис. 2. Действие С-модулинов, подвергнутых ограниченному трипсинолизу на активность ФДЭ гипоталамуса (в о.е.). 1—базальная активность ФДЭ; 2—базальная активность ФДЭ в присутствии трипсина, подвергнутого кипячению в водяной бане в течение 1,5 мин; 3—активация ФДЭ трипсином; 4—6—активация ФДЭ под действием C_1 , C_2 и C_3 соответственно; 7—9—активность ФДЭ в присутствии C_1 , C_2 и C_3 при инкубированных с трипсином предварительно подвергнутым кипячению

SW (7,5×600 мм) величины эффективной M_r для выделенных пептидов C_1 , C_2 и C_3 составили соответственно 7800, 3500 и 3500 Д (рис. 3). Нельзя исключить вероятность того, что C_3 и C_2 являются протеолитическими фрагментами C_1 .

Кинетический анализ активации ФДЭ в присутствии одного из выделенных пептидов (C_1) показал, что по характеру действия на фермент C_1 и кальмодулин проявляют значительное сходство (рис. 4, а). На основании кинетических данных, представленных в координатах Хилла (рис. 4, б), можно сделать заключение о высоком сродстве C_1 к ферменту (кажущаяся величина K_d комплекса C_1 —ФДЭ составляет 10 нг/мл). $n_H = 1$. Характер активации ФДЭ под действием C_2 и C_3 аналогичен действию C_1 . Полученные результаты позволяют высказать предположение о структурно-функциональном сходстве выделенных активаторов.

В настоящее время известен ряд факторов, вызывающих Ca^{2+} -независимую активацию не только ФДЭ, но и других чувствительных к кальмодулину систем. К их числу относятся жирные кислоты и фосфолипиды [16]; белковый аналог кальмодулина, названный бактериомодулином, обнаруженный в числе продуктов секреции стафилококкового экзотоксина *St. aureus* [17]; термостабильный полипептид ($M_r = 17000$ Д) из синаптической фракции коры головного мозга овцы [18]; ограниченный протеолиз [19] и др. Исследование функции этих факторов могло бы значительно расширить представления о механизмах кальмодулинзависимой регуляции клеточной активности, которые в настоящее время остаются невыясненными.

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 Ca^{2+} -зависимым способом многие белки и пептиды (β -эндорфин, аденокортикотропный гормон, глюкагон, соматостатин, основной белок миелина, гистоны) [20], различные низкомолекулярные органические соединения, в их числе—лекарственные препараты [21, 22].

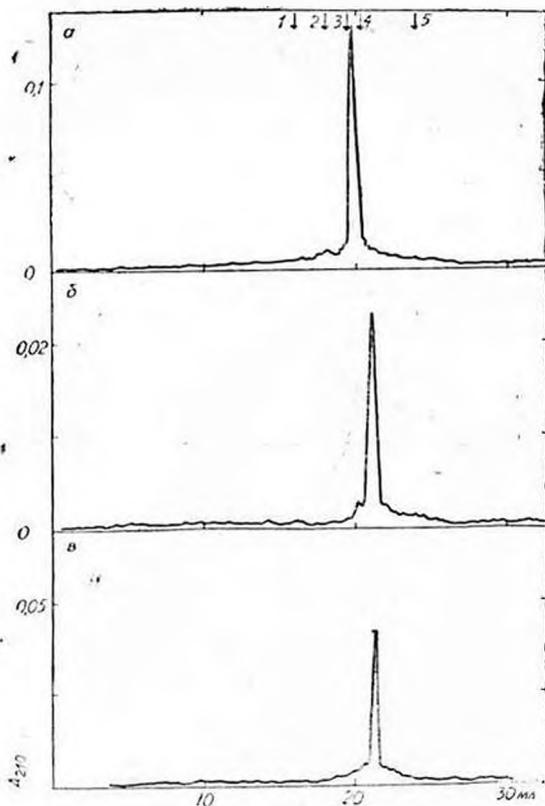


Рис. 3. Гель-фильтрация неuropeпидов C_1 (а), C_2 (б) и C_3 (в) в системе на колонке TSK 2000 SW. По оси абсцисс—объем элюата в мл, по оси ординат—оптическая плотность при 210 нм. Стрелками указаны объем элюата для стандартных пептидов с M_r (Д): 1—17200, 2—14632, 3—8235, 4—6383, 5—1695

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 Ca^{2+} [23], наряду со специфичными 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 Ca^{2+} -зависимым [24], а некоторые

кальмодулинзависимые ферменты обладают Ca^{2+} -связывающими свойствами [25, 26]. По-видимому, лишь немногие из чувствительных к кальмодулину *in vitro* систем являются мишенями действия этого рецептора

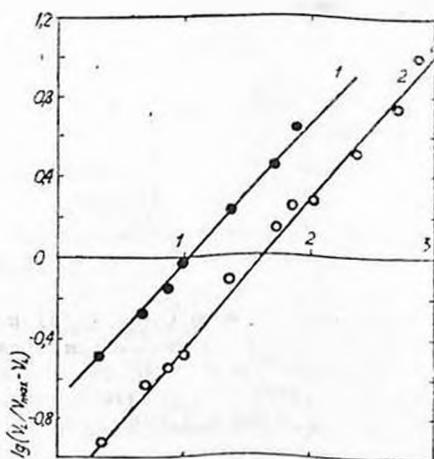
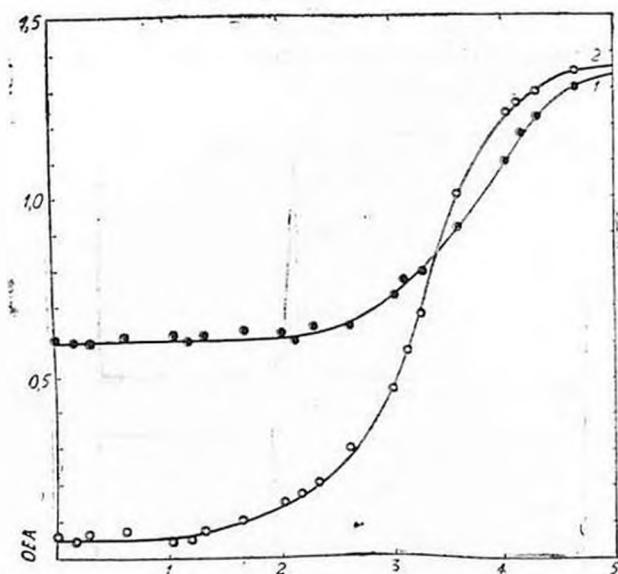


Рис. 4. а—активация ФДЭ под действием Ca^{2+} (в присутствии 0,2 мМ ЭГТА) (1); По оси абсцисс—логарифм концентраций Ca^{2+} или кальмодулина, выраженный в нг/мл, по оси ординат—скорость гидролиза сАМР при концентрации субстрата 5 мкМ; б—зависимость степени активации ФДЭ от концентрации Ca^{2+} и кальмодулина в координатах Хилла

Ca^{2+} в интактной клетке. При определенных условиях, в особенности при низком внутриклеточном уровне содержания Ca^{2+} , многие функции, приписываемые кальмодулину, выполняются Ca^{2+} -независимыми регуляторами, к числу которых принадлежат и С-модулины.

CALCIUM INDEPENDENT ACTIVATORS OF CYCLIC NUCLEOTIDE PHOSPHODIESTERASE

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

Institute of Biochemistry, Academy of Sciences of the Armenian SSR,
Yerevan and *Moscow State University, Moscow

Three heat-stable activators stimulating highly purified bovine brain calmodulin-dependent phosphodiesterase (PDE) were detected in the preparation of neurohormone C partially purified from bovine hypothalamus and possessing cardiotropic action. These activators stimulate PDE activity 6–10 fold in the absence of calcium ions. Kinetic analysis of the stimulating effect of one such activator demonstrated its high affinity towards the enzyme. The apparent dissociation constant of the activator-enzyme complex was 10 ng/ml and the Hill coefficient (n_H)=1. The activators were purified to homogeneity using reverse phase HPLC and gel filtration; their M_r values are equal to 3000–7800 D.

Treatment of the purified activators with trypsin (0.1 mg/ml, 10 min at 30 °C) abolished their stimulating effect on PDE, suggesting their peptide nature.

ЛИТЕРАТУРА

1. Галоян А. А. Докл. АН АрмССР, т. 4, № 3, с. 109–111, Изд-во АН АрмССР, Ереван, 1962.
2. Галоян А. А. Вopr. биохимии мозга, т. 13, с. 9–38, 1978.
3. Галоян А. А., Срапионян Р. М., Карапетян Р. О., Абелян Ж. Г., Саакян Ф. М., Саакян С. А., Абрамян С. С., Григорян А. Г., Одабашян А. Б., Бочко И. Ф. Нейрохимия, т. 5, № 4, с. 354–365, 1986.
4. Galoyan A. A. Neurochem. Res., v. 11, № 6, p. 751–787, 1985.
5. Галоян А. А. Докл. АН АрмССР, т. 38, № 5, с. 305–308, 1964.
6. Галоян А. А., Бархударян Н. А., Валко К., Закарян Т. Р., Шарова Н. П. Нейрохимия, т. 7, № 4, с. 519–524, 1988.
7. Галоян А. А., Чифликян М. Д., Мурадян М. Ш., Едигарян А. К., Абрамян С. С. Нейрохимия, т. 5, № 1, с. 45–48, 1986.
8. Galoyan A. A., Kevorkian G. A., Voskanian L. H., Alexanian S. S., Muradian M. Sh. Neurochem. Res., v. 13, № 5, p. 493–498, 1988.
9. Galoyan A. A., Gurvitz B. Ya., Saribekyan G. A., Kirakosova A. S.—In: Cyclic Nucleotides and Therapeutic Perspectives (eds. G. Cebovic, G. Robison), p. 165–181. Pergamon Press, N. Y., 1979.
10. Галоян А. А., Гурвиц Б. Я. Вестн. АМН СССР, т. 9, с. 64–69, 1982.
11. Galoyan A. A., Gurvitz B. Ya. Neurochem. Res., v. 10, № 11, p. 1457–1481, 1985.
12. Бобрускин И. Д., Шайхин С. М., Муратова М. В., Баранова Л. А., Северин Е. С. Биохимия, т. 52, вып. 8, с. 1344–1352, 1987.
13. Gorpalakrishna R., Anderson W. B. Biochem. and Biophys. Res. Commun., v. 101, p. 830–836, 1982.

14. *Thompson W. J., Appleman M. M.* Biochemistry, v. 10, p. 311—316, 1971.
15. *Laemmlí U. K.* Nature, v. 227, p. 680—683, 1970.
16. *Wolff D. I., Brostrom C. O.* Arch. Biochem. and Biophys., v. 173, p. 720—731, 1976.
17. *Дудкин С. М., Алексов В. Ю., Севский С. Е. мл., Шацк В. И.* Докл. АН СССР, т. 276, № 6, с. 1510—1513, 1984.
18. *Branford White C. J., Parker G., Dawson J. M., Fraser A.* Biochem. Soc. Trans., v. 9, p. 417—418, 1981.
19. *Krinks M. N., Haech J., Rhoads A., Klee C. B.*—In: Advances in Cyclic Nucleotide and Protein Phosphorylation Res. (eds. S. I. Strada, W. J. Thompson), v. 16, p. 31—47, Raven Press, N. Y., 1984.
20. *Malencik D. A., Anderson S. R.* Biochemistry, v. 21, p. 3480—3486, 1982.
21. *Weiss B., Prozialeck W. C., Wallace T. L.* Biochem. Pharmacol., v. 31, p. 2217—2226, 1982.
22. *Hidaka H., Yamaki T., Totsuka T., Asano H.* Mol. Pharmacol., v. 15, p. 49—59, 1979.
23. *La Porte D. C., Wierman B. M., Storm D. R.* Biochemistry, v. 19, p. 3814—3819, 1980.
24. *Atwin B. B., Keller C. H., Storm D. R.*—In: 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.
25. *Rodbell M. J.* Biol. Chem., v. 250, p. 5826—5834, 1975.
26. *Manahan A. S., Klee C. B.* Proc. Nat. Acad. Sci., USA, v. 80, p. 4291—4295, 1983.

Поступила 4. IX 1987

Современные задачи биологии развития, т. 21, Развитие нервной системы, 441 с., 1987.

Current Topics in Developmental Biology (ed. A. A. Moscona, A. Monrox), v. 21. Neural Development (vol. ed. R. K. Hunt), Academic Press, London, England, 331 p., 1987.

Этот том представляет уже четвертый выпуск серии, посвященной развитию нервной системы, из которых три первых были представлены в т. 15, 16 (1980 г.) и 17 (1982 г.). В аннотируемом томе внимание читателя фокусируется на проблемах молекулярной и клеточной дифференциации в развивающейся нервной системе и дается эклектическое описание нейрогенеза, начиная с химизма роста окончаний и экспрессии генов в мозгу в постэмбриональном периоде и кончая механизмами клонального роста и морфогенезом нейрохимически детерминированных цепей в коре головного мозга.