



УДК 616—008.939.633.2—02:616—008.931:577.152.311

ОБ АКТИВАЦИИ ФОСФОДИЭСТЕРАЗЫ ЦИКЛИЧЕСКОГО
ГУАНОЗИН-3', 5'-МОНОФОСФАТА ГИПОТАЛАМУСА
МЕТИЛКСАНТИНАМИ И ПАПАВЕРИНОМ

ГАЛОЯН А. А., ГУРВИЦ Б. Я., ШАРОВА Н. П.

Институт биохимии АН АрмССР, Ереван

Исследование растворимой фосфодиэстеразы (ФДЭ) циклических нуклеотидов гипоталамуса быка, выделенной с помощью ИОХ, показало наличие нескольких пиков ферментативной активности, отличающейся субстратной специфичностью, кинетическими характеристиками и регуляторными свойствами.

Особый интерес представляет тот факт, что ФДЭ cGMP, являющаяся кальмодулинзависимой, активируется под действием cAMP (1—200 мкМ) в отсутствие тиоловых соединений, что сопровождается потерей чувствительности фермента к активации кальмодулином (КМ). Обнаружено, что в этих условиях известный конкурентный ингибитор ФДЭ циклических нуклеотидов теофиллин также активирует гидролиз cGMP. Аналогичным свойством обладали кофеин и папаверин. Обработка препаратов ФДЭ тиоловыми соединениями (дитиотрептолом или 2-меркаптоэтанолом) восстанавливала как чувствительность ФДЭ к КМ, так и ингибирование фермента под действием cAMP и теофиллина. Наблюдаемые обратимые эффекты, специфичные лишь для ФДЭ cGMP, коррелировали с изменениями ферментативной активности и были сопряжены с участием каталитического центра.

Парадоксальный активирующий эффект известных ингибиторов ФДЭ и сложный характер взаимовлияния субстратов при их гидролизе дают возможность реннтерпретации ряда принятых классификационных признаков множественных форм ФДЭ циклических нуклеотидов.

Фермент катаболизма циклических аденозин- и гуанозин-3', 5'-монофосфатов—ФДЭ (КФ 3.4.1.17), наряду с ферментами их биосинтеза аденилат- и гуанилатциклазами, обеспечивает поддержание уровней циклических нуклеотидов в клетке, необходимых для осуществления важнейших клеточных процессов [1].

Проблема изучения механизмов действия ФДЭ тесно связана с проблемой регуляции множественных форм этого фермента, которые в настоящее время являлись предметом многочисленных исследований. Выделенные из различных тканей формы растворимой ФДЭ, отличающиеся по сродству к субстратам, величине M_r , физико-химическим характеристикам и регуляторным свойствам, обычно сводят к двум основным: ФДЭ I— Ca^{2+} -зависимой форме и ФДЭ II—цикло-

нуклеотидактивируемой. Существенным отличием ФДЭ I от других форм является ее способность активироваться в присутствии КМ. ФДЭ II характеризуется стимуляцией гидролиза сАМР под действием микромолярных концентраций сGMP, выступающего в роли аллостерического регулятора.

Однако на основании экспериментальных данных становится очевидной условность принятых классификационных признаков множественных форм ФДЭ не только потому, что были обнаружены ФДЭ, проявляющие одновременно как чувствительность к КМ, так и способность регулироваться циклическими нуклеотидами [2—4], но также в силу известной лабильности свойств фермента, зависящих от условий выделения, ионной силы, присутствия или отсутствия SH-реагентов, концентрации белка, возможности протекания протеолиза и т. д. [5, 6].

Подтверждением этому служат также приведенные в настоящей работе новые результаты исследований ФДЭ гипоталамуса быка, свидетельствующие об обратимых изменениях регуляторных свойств фермента в зависимости от наличия или отсутствия тиоловых реагентов. Показаны существенные функциональные различия центров ФДЭ, катализирующих гидролиз сАМР и сGMP.

Материалы и методы

Ткань гипоталамуса гомогенизировали в 20 мМ трис-НСl буфере, pH 8,0 (1:2), содержащем 5 мМ $MgCl_2$ и 0,1 мМ ЭГТА, в отсутствие или в присутствии 10 мМ дитиотрептола (ДТТ) (или 2-меркаптоэтанол). Супернатант гомогената (75 000 г, 60 мин), содержащий 50 мг белка, пропускали через колонку (1,2×27 см) с ДЭАЭ-целлюлозой. Элюцию проводили тем же буфером (по 4 мл на фракцию) с использованием градиента NaCl (0,05—0,4 М). Активность ФДЭ определяли в 10 мкл инкубационной среды, содержащей 20 мМ трис-НСl буфер, pH 8,0, 2 мМ $MgCl_2$, 0,5 мкМ 3H -сGMP и сGMP в различных концентрациях в опытах с ФДЭ сGMP (или 0,5 мкМ 3H -сАМР и сАМР в различных концентрациях в опытах с ФДЭ сАМР) и определенное количество ферментного белка из элюированных с колонки фракций. Инкубацию проводили при 30° в течение различных промежутков времени. После окончания инкубации пробы помещали в кипящую водяную баню, продукты реакции разделяли с помощью ТСХ на силикагеле, количество гидролизованного субстрата определяли с помощью жидкостного сквинтиляционного спектрометра. Содержание белка в пробах определяли по методу Lowry и соавт. [7].

В отдельных экспериментах использовали высокоочищенные и гомогенные препараты ФДЭ, полученные путем фракционирования гомогената сульфатом аммония, ионообменной хроматографии на ДЕАЭ-целлюлозе, двухступенчатой хроматографии на голубой сефарозе CL-6B, гель-фильтрации на сефарексе G-150 и на Тойоперле HW-55i и электрофорезом в ПААГ.

В работе были использованы следующие реактивы: сАМР, сGMP, теофиллин, папаверин, ЭГТА («Sigma», США); ДЭАЭ-целлюлоза («Pharmacia», Швеция) и («Reanal», Венгрия); ДТТ («Reanal», Венгрия). 2-меркаптоэтанол («Merck», ФРГ); пластины Силуфол UV-254 («Kavaliar», Чехословакия); остальные препараты фирмы «Реахим» (СССР).

Результаты и обсуждение

С помощью хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе растворимой фракции гипоталамуса быка с использованием градиента концентраций NaCl (0.05—0.4 M) выявлены несколько пиков активности ФДЭ циклических нуклеотидов (рис. 1, а). Показано, что профиль элюции ФДЭ cGMP существенно зависит от присутствия в элюируемых пробах сульфидрильных соединений—ДТТ или 2-меркаптоэтанола. В их отсутствие проявляются три пика активности фермента, спады между которыми соответствуют двум пикам ФДЭ, гидролизующей cAMP. При добавлении тиоловых соединений активность ФДЭ cGMP значительно возрастает, проявляясь лишь в двух пиках, сопутствующих пикам ФДЭ cAMP. Большой интерес представляет тот факт, что профиль элюции, а также уровень активности ФДЭ cAMP при указанной концентрации субстрата не изменяется в присутствии ДТТ.

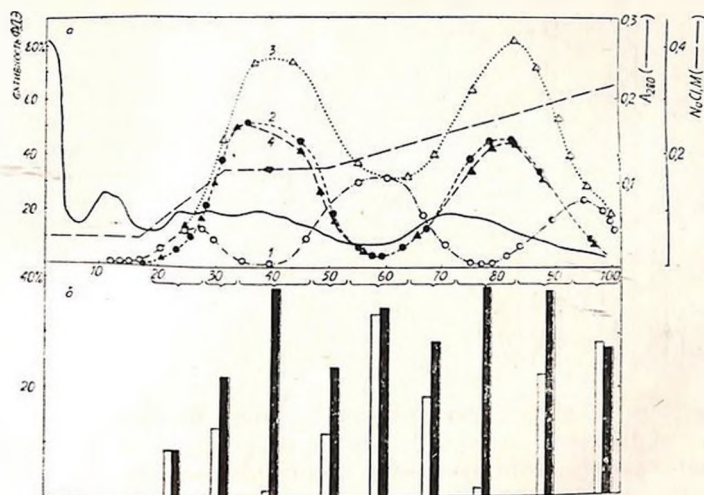


Рис. 1. а—хроматография ФДЭ cGMP (1, 3) и ФДЭ cAMP (2, 4) на колонке с ДЭАЭ-целлюлозой в отсутствие (1, 2) и в присутствии (3, 4) ДТТ (10 мМ). Концентрация субстратов—3 мкМ; б—активность ФДЭ cGMP (в %) в отсутствие (□) и в присутствии (■) cAMP (50 мкМ) во фракциях, соответствующих различным участкам профиля элюции фермента, выделенного без ДТТ.

Обнаружено, что в отсутствие ДТТ ФДЭ cGMP обладала чувствительностью к активации под действием cAMP в концентрациях 1—200 мкМ во фракциях, содержащих активность ФДЭ cAMP; максимальный эффект проявлялся в пиках ФДЭ cAMP (рис. 1, б). Способность ФДЭ cGMP активироваться под действием cAMP усиливалась в процессе хранения фермента при 4° и наблюдалась в течение длительного времени. Однако ДТТ (или 2-меркаптоэтанол) обратимо-

восстанавливали свойство фермента конкурентно ингибироваться сАМР в том же диапазоне концентраций (рис. 2, а, б).

Необходимо отметить, что, в отличие от ФДЭ сGMP, ФДЭ сАМР не активировалась под действием сGMP (1—50 мкМ) в отсутствие тиолов ни в одной из фракций профиля элюции во всем исследованном диапазоне концентраций субстрата (0,1—100 мкМ). При этом наблюдался ингибирующий эффект сGMP по отношению к гидролизу сАМР, который сохранялся при добавлении ДТТ к препаратам фермента (рис. 2, в, г.).

Свойство аллостерически активироваться микромолярными концентрациями сGMP в присутствии ДТТ, присущее лишь ФДЭ сАМР,

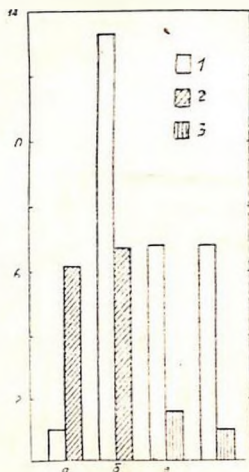


Рис. 2. Гидролиз сGMP (а, б) и сАМР (в, г) в отсутствие (а, в) или в присутствии (б, г) 10 мМ ДТТ во фракции № 45 профиля элюции ФДЭ (рис. 1, а) в контроле (1) и при добавлении сАМР (2) или сGMP (3). Концентрации субстратов и эффекторов—0,2 и 50 мкМ соответственно. По оси ординат—активность ФДЭ (нмоль/мин).

элюируемой во втором пике активности этого фермента, было нами продемонстрировано ранее [8]. Тем не менее это свойство, характерное для циклонуклеотидзависимых форм ФДЭ, отличается от активирующего действия сАМР, описанного в настоящей работе, тем, что последнее осуществляется в результате взаимодействия сАМР с каталитическими центрами ФДЭ.

Кинетический анализ ФДЭ сGMP, выделенной в отсутствие ДТТ, показал, что гидролиз сGMP происходит в соответствии с принципом положительной кооперативности по субстрату, которая, главным образом, проявляется во фракциях, сопряженных с пиками активности ФДЭ сАМР I и II (рис. 3 и 4) и характеризуется значениями коэффициента Хилла (n_H 1,6 и 1,3) соответственно. Добавление сАМР к реакционной смеси линеаризует кинетическую кривую в координатах Лайнуивера-Берка дозозависимым способом. В присутствии 100 мкМ сАМР гидролиз сGMP подчинялся кинетике Михаэлиса-Ментен; значение K_m для сGMP составляет при этом 25 мкМ. Следует отметить, что эта кривая в исследованном диапазоне концентраций суб-

страта полностью совпадает с кинетической кривой, описывающей гидролиз сGMP под действием ФДЭ, элюируемой во фракциях 52—62, соответствующих второму пику активности ФДЭ сGMP, почти не содержащих ФДЭ сАМР (рис. 3).

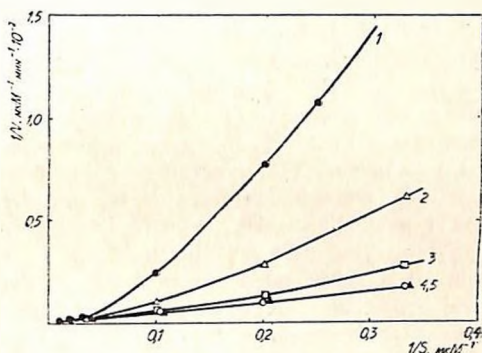


Рис. 3. Кинетические характеристики ФДЭ сGMP, выделенной в отсутствие ДТТ во фракции № 85 в контроле (1) и при добавлении сАМР в концентрациях 25 мкМ (2), 50 мкМ (3) и 100 мкМ (4). Кинетика гидролиза сGMP во фракции № 60 (5). Результаты представлены в координатах обратных величин Лайнуивера-Берка

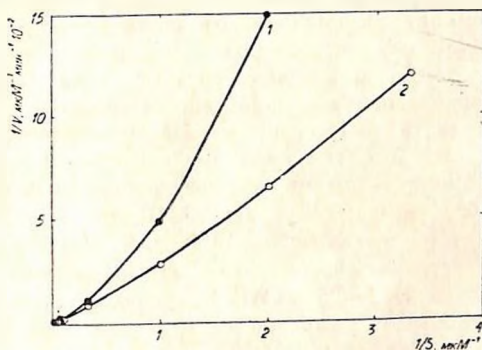


Рис. 4. Кинетические характеристики ФДЭ сGMP, выделенной в отсутствие ДТТ, во фракции № 35 в контроле (1) и в присутствии 50 мкМ сАМР (2). Результаты представлены в координатах обратных величин Лайнуивера-Берка

Положительная кооперативность по субстрату не проявляется при гидролизе сGMP в присутствии ДТТ. Кинетика ФДЭ сGMP I, однако, описывается нелинейным графиком, характеризующимся двумя значениями K_m для сGMP: $K_{m1}=2 \text{ мкМ}$ и $K_{m2}=25 \text{ мкМ}$.

Кинетический анализ ФДЭ сАМР I также показал наличие центров высокого и низкого сродства к субстрату, которым соответствуют

значения $K_m = 2$ мкМ и $K_m = 25$ мкМ соответственно. При этом в отличие от ФДЭ сGMP, гидролиз сAMP в отсутствие и в присутствии ДТТ описывался сходными кинетическими характеристиками.

Ранее нами было установлено, что ФДЭ сGMP во всех выделенных пиках является КМ-зависимой [9]. Однако чувствительность к активации в присутствии КМ снижалась в отсутствие тиолов в реакционной смеси, что сопровождалось появлением активирующего действия сAMP на гидролиз сGMP. Увеличение активности ФДЭ сGMP во времени с момента добавления ДТТ сопровождалось превращением активирующего действия сAMP в ингибирующее, а также возникновением утраченной в отсутствие ДТТ чувствительности фермента к КМ.

Полученные данные свидетельствуют о том, что регуляторные и каталитические свойства ФДЭ сGMP, но не ФДЭ сAMP, существенно зависят от присутствия тиолов в реакционной среде. Наблюдаемые обратимые регуляторные эффекты коррелировали с изменением активности фермента, что может свидетельствовать об участии каталитического центра в их осуществлении. Эти данные служат также аргументом в пользу представления о том, что сульфгидрильные группы, не подвергающиеся окислению в присутствии ДТТ, находятся в активном центре или поблизости от него.

Предварительные эксперименты с высокоочищенными и гомогенизированными препаратами ФДЭ, проведенные нами в плане изучения олигомерной структуры фермента, позволяют предположить, что в отсутствие ДТТ происходит ассоциация субъединиц или конформационные изменения молекулы ферментного белка, что сопровождается экранированием центра высокого сродства к сGMP. Иными словами, фермент в этом состоянии обладает пониженным сродством к сGMP. При этом может возникать кооперативное взаимодействие двух других каталитических центров, один из которых специфичен к сGMP ($K_m = 25$ мкМ), а другой не обладает специфичностью в отношении субстратов и способен гидролизовать как сAMP, так и сGMP. При полном насыщении этого центра либо сAMP, либо сGMP положительная кооперативность устраняется; при этом можно наблюдать «работу» лишь одного центра ($K_m = 25$ мкМ). В сущности, влияние сAMP на усиление гидролиза сGMP выражается в снятии положительной кооперативности и приобретении ферментом полной каталитической активности.

Резкое увеличение каталитической активности ФДЭ сGMP достигается также в присутствии добавленных тиолов, которые, вероятно, индуцируют изменения олигомерной структуры фермента, вызывающие нарушение связи между каталитическими центрами и реактивацию ранее экранированного центра высокого сродства к сGMP.

Итак, наличие спадов активности ФДЭ сGMP при концентрации субстрата 3 мкМ, выявленных с помощью НОХ во фракциях 35—43 и 75—82 (рис. 1, а), может быть объяснено экранированием центра высокого сродства к сGMP ($K_m = 2$ мкМ) вследствие ассоциации моле-

кул ФДЭ в отсутствие ДТТ, которая наиболее выражена при повышенной концентрации ферментного белка (в пиках ферментативной активности). Эти спады в совокупности с выходящим во фракциях 55—65 пиком ФДЭ, проявляющим большую специфичность к сGMP, создают характерный профиль элюции ФДЭ сGMP с тремя пиками активности фермента. Подтверждением этому служат также результаты наших экспериментов, в которых подавление активности ФДЭ сGMP II (фракция 60) наблюдалось в присутствии фракций пика активности ФДЭ сAMP I или ФДЭ сAMP II, сконцентрированных в ~ 10 раз (рис. 5).

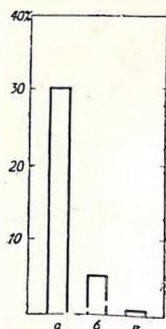


Рис. 5. Активность ФДЭ сGMP (в %), выделенной в отсутствие ДТТ, во фракции № 60 в контроле (а) и в присутствии фракций пика ФДЭ сAMP I (б) или ФДЭ сAMP II (в), сконцентрированных в 10 раз. Концентрация субстрата 3 мкМ

Способность сAMP активировать гидролиз сGMP в указанных условиях создала весьма благоприятную возможность для изучения действия конкурентных ингибиторов ФДЭ. Было обнаружено, что теofilлин—широко известный ингибитор ФДЭ циклических нуклеотидов [10, 11]—в концентрациях $5 \cdot 10^{-4}$ — 10_{-2} М значительно активирует ФДЭ сGMP в отсутствие ДТТ. Внесение ДТТ в инкубационную смесь приводило к превращению активирующего эффекта теofilлина в ингибирующий (рис. 6, а, б). При добавлении тиоловых соединений увеличивается чувствительность ФДЭ сGMP к активации как сAMP, так и теofilлином (рис. 6, б). Длительность этого переходного процесса при добавлении 10 мМ ДТТ измеряется часами. Аналогичным действием обладали и другие известные ингибиторы ФДЭ—кофеин и папаверин. По способности активировать ФДЭ исследованные соединения можно расположить в ряд: сAMP > папаверин > теofilлин > кофеин.

Как и следовало ожидать, указанные ингибиторы подавляли активность ФДЭ сAMP как в отсутствие, так и в присутствии ДТТ (рис. 6, в, г). Эти данные также подтверждают неравнозначность активных центров по отношению к гидролизу сAMP и сGMP.

Недавно было обнаружено активирующее действие 1-метил-3-изобутилксантина на циклоуклеотидзависимую ФДЭ сAMP из печени крыс [12]. Однако авторы указывают, что данный эффект специфичен лишь для этой формы ФДЭ и не проявляется в отношении КМ-зави-

симой ФДЭ из мозга быка. Кроме того, активация метилксантинами не была выявлена при использовании cGMP в качестве субстрата. Сообщалось также об активирующем действии метилксантинов на ассоциацию cGMP со специфичными к этому нуклеотиду некаталитическими связывающими участками ФДЭ ряда тканей; гидролиз cGMP при этом ингибировался [13—15].

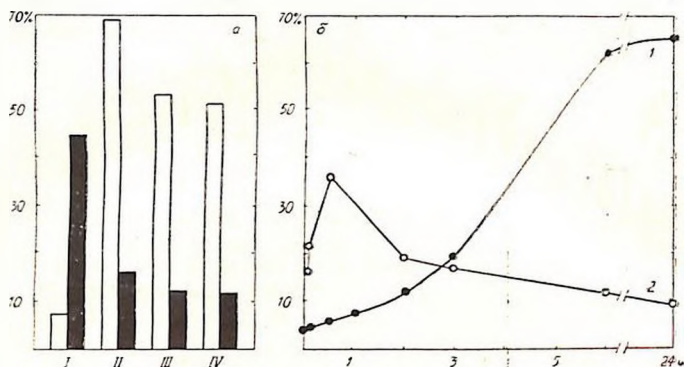


Рис. 6. а—активность ФДЭ cGMP (I, II) и cAMP (III, IV) во фракции № 44 (в %) в отсутствие (I, III) или в присутствии (II, IV) 10 мМ ДТТ в контроле (□) и при добавлении теofilлина (10 мМ) (■). Концентрация субстратов 3 мкМ; б—изменение активности ФДЭ cGMP (в %), выделенной в отсутствие ДТТ, в контроле (1) и в присутствии 10 мМ теofilлина (2) после добавления ДТТ (10 мМ). По оси абсцисс—время, прошедшее с момента добавления в пробу ДТТ

В данной работе впервые продемонстрированы условия, в которых наблюдается активация КМ-зависимой ФДЭ cGMP из гипоталамуса быка *in vitro* под действием метилксантинов, папаверина и cAMP. На основании приведенных данных можно сделать заключение о приобретении ферментом в отсутствие ДТТ нового качества, вероятно, обеспечивающего его способность подвергаться регуляторному влиянию тех или иных факторов. Можно предположить, что обнаруженные особенности субстратной специфичности ФДЭ являются естественным свойством фермента, которое теряется в процессе его выделения в присутствии ДТТ.

Предложенная выше кинетическая модель взаимодействия активных центров не является единственно возможной. Нельзя исключить участие в рассматриваемых процессах каких-либо отличных от ФДЭ белков или других факторов, сопутствующих ФДЭ в процессе ее выделения, однако, исходя из полученных нами результатов, приведенная выше интерпретация представляется наиболее вероятной. Выявленные свойства ФДЭ позволяют пролить свет на часто наблюдаемые реципрокные изменения уровней циклических нуклеотидов при различных патологических состояниях. Можно предположить, что в

условиях *in vivo* такие эндогенные факторы, как ипстенин, глутатион и др., а также некоторые ферменты, в частности оксидоредуктазы, могут оказывать влияние на структурно-функциональное состояние ФДЭ в различных системах.

Применение таких фармакологических агентов, как теофиллин, кофенин, теобромин, трентал, папаверин, но-шпа и т. д. обычно тормозит гидролиз обоих циклических нуклеотидов. Выявленная нами противоположная направленность действия ингибиторов ФДЭ на гидролиз сАМР и сGMP в определенных условиях позволяет надеяться на возможность их использования для специфичной регуляции некоторых функций организма.

METHYLBXANTHINIS AND PAPAVERINE ACTIVATE PHOSPHODIESTERASE OF cGMP

GALOYAN A. A., GURVITS B. Ya., SHAROVA N. P.

Institute of Biochemistry, Arm. SSR Academy of Sciences, Yerevan

Several peaks of soluble PDE of cyclic nucleotides from bovine hypothalamus that have been isolated by ion-exchange chromatography differ in substrate specificity, kinetic characteristics and regulatory properties.

It's of special interest that calmodulin activated cGMP PDE is activated by cAMP (1—200 μ M) in the absence of thiol-reducing agents with concomitant drop in the sensitivity to calmodulin. Under these conditions theophylline (10^{-4} — 10^{-3} M)—a competitive inhibitor of cyclic nucleotides PDE—also activates cGMP hydrolysis. Caffeine and papaverin exert analogous effect. Treatment of PDE by thiol reagents (DTT or 2-mercaptoethanol) restores its sensitivity to calmodulin as well as to cAMP and theophylline.

Data obtained make it possible to reconsider conventional classification of multiple forms of PDE of cyclic nucleotides.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Cheung W. Y. Science, v. 207, p. 19—27, 1980.
2. Cheung W. Y., Lynch T. J., Wallace R. W., Tallant E. A. J. Biol. Chem., v. 256, p. 4439—4443, 1981.
3. Дудкин С. М., Агагарова М. Б. Циклические нуклеотиды. Тезисы докл. IV Всесоюз. симпозиума, с. 54—55, Минск, 1982.
4. Gurvitz B. Ya., Galoyan A. A. 16th Meeting of FEBS, Abstr., XXII—050, Moscow, p. 448, 1984.
5. Tucker M. M., Robinson J. B., Stellwagen E. J. Biol. Chem., v. 256, p. 905—958, 1981.
6. Этингер Р. Н., Думлер Н. И. Укр. биохим. журн., т. 53, с. 28—43, 1981.
7. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. I., Randall R. L. J. Biol. Chem., v. 193, p. 265—275, 1951.
8. Галоян А. А., Гурацц Б. Я. Вест. Акад. мед. наук СССР, т. 9, с. 64—69, 1982.

9. Галюян А. А., Гурвиц Б. Я., Шарова Н. П. Нейрохимия, т. 4, с. 56—60, 1985.
10. Sutherland E. W., Rall T. W. J. Biol. Chem., v. 232, p. 1077—1091, 1958.
11. Beavo J. A., Rogers N. L., Crofford O. B., Hardman J. G., Sutherland E. W., Newman E. V. Mol. Pharmacol., v. 6, p. 597--503, 1970
12. Erneux C., Couchie D., Dumont J. E., Jastorff B.—In: Advances in Cyclic Nucleotide and Protein Phosphorylation Research (eds. S. J. Strada, W. J. Thompson), v. 16, p. 107—118, Raven Press, N. Y. 1984.
13. Coquil J.—F., Franks D. J., Wells J. N., Dupuis M., Hamet P. Biochim. et biophys. acta, v. 631, p. 148—165, 1980.
14. Francis S. H., Lincoln T. M., Corbin J. D. J. Biol. Chem., v. 255, p. 620—626, 1980.
15. Yamazaki A., Sen J., Bitensky M. W., Casnellie J. E., Greengard P. J. Biol. Chem., v. 255, p. 11619—11624, 1980.

Поступила 17. XI 1985