



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

РОЛЬ ТИОЛОВЫХ ГРУПП В АКТИВАЦИИ ФОСФОДИЭСТЕРАЗЫ  
ЦИКЛИЧЕСКИХ НУКЛЕОТИДОВ КАЛЬМОДУЛИНОМ

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

Институт биохимии АН АрмССР, Ереван

Многочисленные исследования продемонстрировали участие кальмодулина в осуществлении механизмов действия многих ферментов, в числе которых аденилатциклаза, гуанилатциклаза, киназа легких цепей миозина, киназа фосфорилазы,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -АТРаза, NAD-киназа, фосфолипаза  $\text{A}_2$ . Показана регуляторная роль кальмодулина в процессах высвобождения нейротрансмиттеров, ионного транспорта, деполлимеризации микротрубочек и др. [1].

Фосфодиэстераза (ФДЭ) циклических аденозин- и гуанозин-3', 5'-монофосфатов также является объектом регуляции кальмодулина. В настоящее время считается установленным существование множественных форм ФДЭ, которые чаще всего сводят к двум основным: кальмодулинзависимой и циклонуклеотидактивируемой. Существенным отличием кальмодулинзависимой ФДЭ от других форм является ее способность активироваться белковым модулятором в присутствии  $\text{Ca}^{2+}$ .

Была обнаружена, однако, чрезвычайная лабильность ФДЭ, проявляющаяся, в частности, в потере чувствительности фермента к активирующему действию кальмодулина уже через несколько часов с момента начала выделения фермента [2]. При этом наблюдалось изменение олигомерной структуры фермента и снижение молекулярной массы его субъединицы [3, 4].

В соответствии с современными представлениями подобное падение чувствительности к кальмодулину сопровождается повышением базальной активности фермента в результате отделения от него ингибирующего домена в процессе эндогенного протеолиза [3—5]. Подтверждением этому служит, в частности, действие на ФДЭ трипсина, повышающего активность фермента до уровня, характерного для действия кальмодулина [6]. Однако многочисленные попытки полностью подавить эндогенный протеолиз ингибиторами различных протеиназ при исследовании регуляторной роли кальмодулина до настоящего времени не увенчались успехом.

Нами были изучены некоторые особенности влияния кальмодулина на активность растворимых форм ФДЕ гипоталамуса.

Ткань гипоталамуса гомогенизировали в 20 мМ трис-НСl буфере, рН 8,0 (1:2), содержащем 2 мМ  $MgCl_2$  и 0,1 мМ ЭГТА, в отсутствие или в присутствии 10 мМ дитиотрейтола (ДТТ) (или 2-меркаптоэтанола). Супернатант гомогената (75000g, 60 мин) в количестве 8 мл наносили на колонку (1,2×27 см) с ДЭАЭ-целлюлозой. Элюцию фермента проводили тем же буфером (по 4 мл на фракцию) с использованием градиента концентраций NaCl (0,05—0,4 М). Активность ФДЭ определяли в 10 мкл инкубационной среды, содержащей 20 мМ трис-НСl

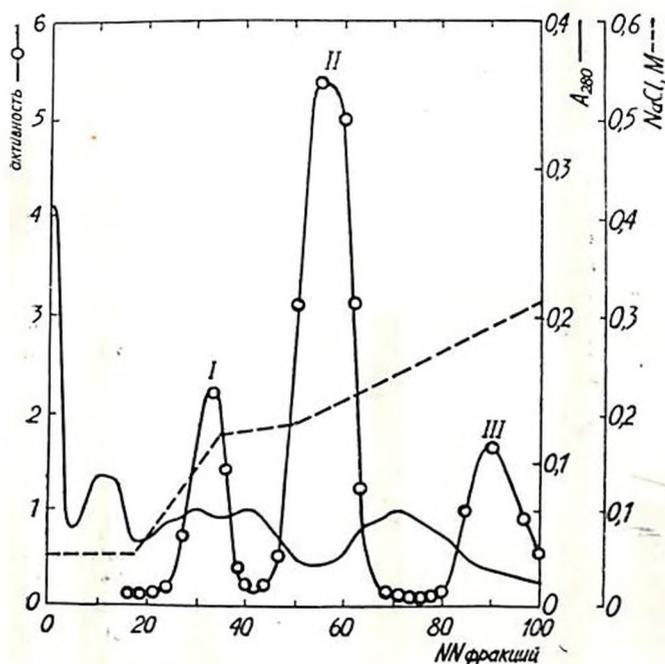


Рис. 1. Хроматография ФДЭ сGMP гипоталамуса быка на колонке с ДЭАЭ-целлюлозой. По оси ординат (слева) — базальная активность фермента (нмоль сGMP/мг белка/мин), выделенного в отсутствие ДТТ

буфер, рН 8,0, 2 мМ  $MgCl_2$ , 3 мкМ сGMP, 0,2 мкКи  $[^3H]$  сGMP и определенное количество фермента элюированных фракций. После окончания инкубации пробы помещали в кипящую водяную баню, продукты реакции разделяли с помощью ТСХ на силикагеле и количество гидролизованного субстрата определяли с использованием жидкостного сцинтилляционного спектрометра.

На рис. 1 представлены результаты ИОХ на ДЭАЭ-целлюлозе ФДЭ, гидролизующей сGMP, свидетельствующие о наличии трех пиков активности (I, II и III) этого фермента. ФДЭ сGMP во всех трех пиках проявляла чувствительность к активации кальмодулином.

Как видно из данных, представленных на рис. 2, непосредственно после выделения фермента в присутствии восстановителей тиоловых

групп гомогенный препарат кальмодулина (5 мкг/мл) в комплексе с  $\text{Ca}^{2+}$  стимулировал ФДЭ I—III в 5—6 раз. После выдерживания фермента при  $4^\circ$  в течение нескольких суток он активировался кальмодулином в 2—3 раза и сохранял эту способность в течение длительного времени, в отличие от ФДЭ других тканей, которые полностью

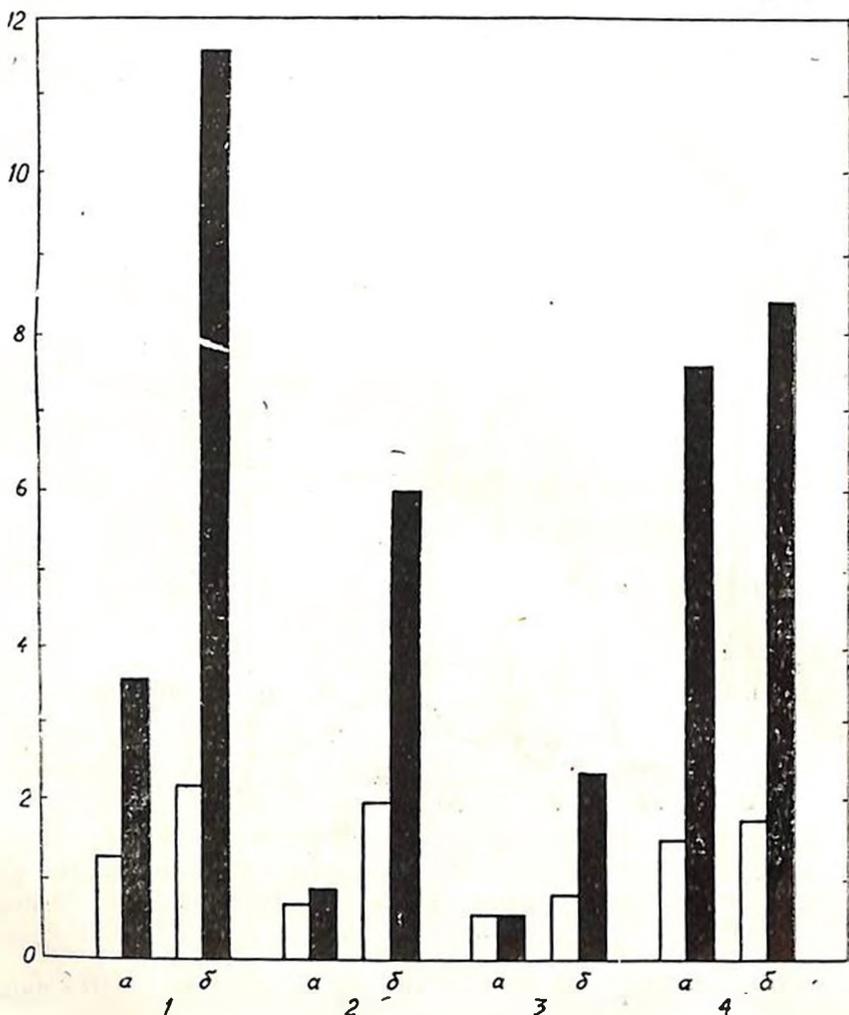


Рис. 2. Активность ФДЭ cGMP I в отсутствие (□) и в присутствии (■) кальмодулина через 2 ч (1), через неделю (2) и через 6 недель (3) после выделения фермента. 4—препарат фермента, в который через 6 недель после выделения (за 24 ч до определения чувствительности к кальмодулину) вносили 10 мМ ДТТ. Фермент выделяли в отсутствие (а) или в присутствии (б) ДТТ. По оси ординат—активность фермента (в нмоль cGMP/мг белка/мин). Характер активации кальмодулином ФДЭ cGMP II и III аналогичен ФДЭ I.

теряли чувствительность к кальмодулину уже через 24 ч с момента выделения фермента [3, 4]. Активацию кальмодулином ФДЭ, выделенной в отсутствие ДТТ, можно было наблюдать лишь в течение короткого периода времени. Однако было обнаружено, что даже при

Выделение фермента в отсутствие тиоловых соединений ФДЭ сохраняет латентную способность активироваться кальмодулином при ее хранении при 4° в течение 6—7 недель, которую можно выявить лишь после добавления к препарату фермента ДТТ (или 2-меркаптоэтанол) в концентрациях 1—10 мМ (рис. 2). Этим свойством обладали не только все три формы ФДЭ cGMP, но и ФДЭ cAMP.

Недавно было установлено, что ФДЭ cGMP приобретает способность активироваться под действием cAMP в условиях, в которых фермент утрачивает чувствительность к кальмодулину [7]. Восстановление способности ФДЭ активироваться кальмодулином в присутствии тиоловых соединений сопровождалось возникновением ингибирующего эффекта cAMP в концентрациях, оказывавших активизирующее действие на гидролиз cGMP.

Можно предположить, что десенситизация ФДЭ гипоталамуса к кальмодулину не связана с необратимыми изменениями олигомерной структуры ферментного белка. Полученные результаты свидетельствуют о том, что ФДЭ гипоталамуса может претерпевать обратимые изменения регуляторных свойств под действием факторов, влияющих на состояние сульфгидрильных групп фермента, весьма существенных, как известно, для проявления его каталитической активности [8, 9].

## ROLE OF SH-GROUPS IN THE ACTIVATION OF PHOSPHODIESTERASE OF CYCLIC NUCLEOTIDES BY CALMODULIN

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

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

Multiple forms of phosphodiesterase (PDE) of cyclic GMP purified from bovine hypothalamus by ion-exchange chromatography proved to be calmodulin-dependent. Their susceptibility to activation by calmodulin has been partially lost on storage, but was recovered on addition of reducing agents for thiol groups. Data obtained indicate that loss of susceptibility of hypothalamic PDE to activation by calmodulin is caused by oxidation of free SH-groups.

### Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Cheung W. Y. Science, v. 207, p. 19—27, 1980.
2. Ho H. C., Wirch E., Stevens F. C., Wang J. H. J. Biol. Chem., v. 252, p. 43—50, 1977.
3. Tucker M. M., Rabinson J. B., Stellwagen E. J. Biol. Chem., v. 256, p. 905—958, 1981.

4. Дудкин С. М., Агаларова М. Б. Циклические нуклеотиды. Тезисы докладов IV Всесоюзного симпозиума, с. 54—55, Минск, 1982.
5. Brostrom C. O., Brostrom M. A., Wolff D. I. J. Biol. Chem., v. 252, p. 5677—5685, 1977.
6. Russel T. R., Terasaki W. L., Appleman M. M. J. Biol. Chem., v. 248, p. 1334—1340, 1973.
7. Cheung W. Y.—In: Advances in Biochem. Psychopharmacol., v. 3, p. 51—67, Raven Press, N. Y., 1970.
8. Van Inwegen R. G., Swafford R. L., Strada S. I., Thompson W. J. Arch. Biochem. and Biophys., v. 178, p. 58—63, 1977.
9. Gurvitz B. Ya., Galoyan A. A. 16th Meeting of FEBS, Abstr., XXII—050, Moscow, p. 448, 1984.

Поступила 12. VI 1984

### ШЕСТОЙ СЪЕЗД ЕВРОПЕЙСКОГО НЕЙРОХИМИЧЕСКОГО ОБЩЕСТВА—ПРАГА 1986. ПРЕДВАРИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

В сентябре 1986 г. в Праге (ЧССР) намечается провести IV съезд Европейского нейрохимического общества, программа которого будет состоять из симпозиумов, рабочих заседаний, дискуссий за круглым столом, стендовых сообщений и пленарных докладов, посвященных всем разделам нейрохимии и молекулярной нейробиологии, включая нейрофармакологические и нейропатологические аспекты.

Дополнительная информация о съезде будет разослана секретариатом ВБО АН СССР и опубликована в нашем журнале.