



УДК 577.311.042.5+577.152.311.042.2

О ПРИРОДНЫХ ИНГИБИТОРАХ И АКТИВАТОРАХ ФОСФОДИЭСТЕРАЗ ЦИКЛИЧЕСКИХ НУКЛЕОТИДОВ ИЗ ГИПОТАЛАМУСА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

САРИБЕКЯН Г. А., КИРАКОСОВА А. С., ГАЛФАЯН В. Т., ГАЛОЯН А. А.

Институт биохимии АН АрмССР, Ереван

Из гипоталамуса крупного рогатого скота выделен фактор, оказывающий ингибирующее влияние на Ca^{2+} -кальмодулинчувствительную и Ca^{2+} -кальмодулиннечувствительную формы фосфодиэстераз (ФДЭ) циклических нуклеотидов.

Ингибитор является низкомолекулярным термостабильным пептидом.

Приведены также данные по выделению кальмодулина (КМ) из гипоталамуса крупного рогатого скота с описанием его электрофоретической подвижности, величины M_r и способности активировать ФДЭ циклических нуклеотидов.

Гормоны, циклические нуклеотиды и ионы кальция являются тремя наиболее важными мессенджерами в клеточной регуляции млекопитающих [1].

Роль системы циклических нуклеотидов в механизме регуляции клеточных функций общезвестна. Ферментом, осуществляющим распад внутриклеточного мессенджера—сАМР, является ФДЭ циклических нуклеотидов. Существуют множественные формы ФДЭ в различных тканях [2, 3]. Ранее нами описаны такие множественные формы ФДЭ в гипоталамусе [4, 5].

Внутриклеточные регуляторы белковой природы занимают особое место в этой регуляции. К ним относится в первую очередь КМ—мультифункциональный Ca^{2+} -зависимый модуляторный белок [6, 7]. КМ обнаружен в большинстве тканей млекопитающих, включая различные отделы мозга [8, 9].

Учитывая важную роль КМ в регуляции активности ФДЭ и целого ряда других ферментов, в данной работе приводится выделение этого белка из гипоталамуса крупного рогатого скота и более подробное описание некоторых его свойств.

Важная роль в регуляции активности ФДЭ принадлежит также внутриклеточным белковым ингибиторам этого фермента. В настоящее время выделены и изучены как высокомолекулярные ингибиторы из

мозга, сердца и сетчатки глаза [10, 11], так и небольшие пептиды из гипоталамуса и мозга [12, 13].

Идентификация и исследование свойств таких низкомолекулярных соединений из НС, способных регулировать активность ФДЭ, изучены недостаточно полно и представляют значительный интерес, в особенности в связи с той ролью, которая придается в настоящее время ФДЭ в поддержании внутриклеточного уровня циклических нуклеотидов.

Ранее нами было установлено наличие в гипоталамусе крупного рогатого скота фактора, ингибирующего активность ФДЭ мозга [14, 15]. В настоящей работе приводятся данные, характеризующие природу и некоторые свойства этого ингибитора.

Материалы и методы

Гипоталамус и цельный мозг крупного рогатого скота получали сразу после забоя животных и хранили при -20° .

ФДЭ, лишенная КМ, была получена по методу Watterson и соавт. [16]. Активность ФДЭ циклических нуклеотидов определяли по количеству гидролизованного $[8-^3\text{H}]\text{сАМР}$ в процессе его инкубации с ферментом [17].

Реакционная смесь в объеме 10 мкл содержала следующие компоненты в мМ: трис- HCl буфер (pH 7.5)—100, MgCl_2 —3, CaCl_2 —1.5, сАМР —0.5, $5'\text{-AMP}$ —2, а также $[^3\text{H}]\text{сАМР}$ —0.2 мкКи и соответствующее количество фермента и КМ. В ряде опытов CaCl_2 отсутствовал.

Реакцию начинали добавлением ФДЭ. Инкубацию вели при 30° в течение 20 мин. Реакцию останавливали кипячением проб в водяной бане в течение 3 мин, затем их охлаждали до комнатной температуры, центрифугировали при 3000g 15 мин. Для разделения продуктов реакции 3 мкл супернатанта подвергали тонкослойной хроматографии на пластинках «Silufol UV-254» в системе н-бутанол—ацетон—аммиак (8:2:1). Пятна на хроматограмме идентифицировали с помощью свидетелей в ультрафиолете, фиксировали специальным клеем, приготовленным на основе ацетилцеллюлозы. Соответствующие участки вырезали и помещали в сцинтилляционные кюветы с толуольным сцинтиллятором, содержащим 4г РРО и 200 мкг РОРОР на 1 л толуола. Радиактивность подсчитывали в жидкостном сцинтилляционном спектрометре марки «Intertechnique SL-30» (Франция).

Электрофорез в ПААГ (7%) проводили по методу Davis [18] в щелочном буфере, pH 8.9 в течение 3 ч при силе тока 3 мА на трубку. Гели окрашивали 1%-ным раствором амидо-черного 10 В в 7%-ной уксусной кислоте в течение 20 мин и отмывали до обесцвечивания фона. Определение оптической плотности проводили на фотометре «Uvicord» («ЛКВ», Швеция), при 280 нм. Белок определяли по методу Lowry, используя в качестве стандарта бычий сывороточный альбумин [19].

КМ из гипоталамуса и цельного мозга крупного рогатого скота получали методом Burges и соавт. [20]. Все стадии очистки проводили

при 4 и включали фракционирование $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, ИОХ и гель-фильтрацию. КМ-содержащие фракции идентифицировали электрофорезом в ПААГ по способности активировать КМ-чувствительную форму ФДЭ.

В работе были использованы следующие реактивы: ДЭАЭ-сефадекс А-50 и сефадекс G-25 («Pharmacia», Швеция), этилендиаминтетрауксусная кислота и 3',5'-сАМР («Sigma», США), трис («Kochlight» Англия), реактивы для электрофореза ПААГ («Reanal», Венгрия), [8- ^3H]-сАМР («New England Nuclear», США), слюфоловые пластины UV-254 («Kavalier», СССР), остальные реактивы отечественного производства.

Результаты и обсуждение

КМ, выделенный из гипоталамуса крупного рогатого скота, был подвергнут гель-фильтрации после предварительного фракционирования $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, кислотного осаждения и ИОХ (рис. 1). Фракции (91—98), содержащие КМ и активировавшие ФДЭ, объединяли, подвергали диализу против бидистиллированной воды и лиофилизировали. Аналогичным образом получали КМ из цельного мозга.

Оба КМ—из гипоталамуса и цельного мозга—примерно одинаково активируют ФДЭ, лишенную КМ (рис. 2).

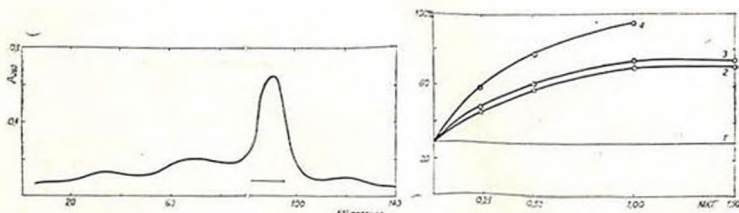


Рис. 1. Хроматография кальмодулина гипоталамуса на колонке с сефадексом G-100 (2×90 см), уравновешенной 10 мМ трис-НСl буфером, 7,5, содержащим 1 мМ ЭДТА, 1 мМ 2-меркаптоэтанол, 0,1 М NaCl. Фракции в объеме 5 мл элюировали тем же буфером. Скорость элюции 10 мл/ч. По оси ординат—фракции, содержащие кальмодулин и активирующие ФДЭ, лишенную кальмодулина

Рис. 2. Активность ФДЭ в присутствии различных препаратов кальмодулина: 1—контроль, 2—кальмодулин из гипоталамуса, 3—кальмодулин из цельного мозга, 4—коммерческий препарат кальмодулина

Следует отметить, что для определения активирующего эффекта КМ необходимо использовать свежевыведенные препараты ФДЭ. По мере хранения препаратов фермента их чувствительность к активации КМ-ом терялась, хотя ферментативная активность самого препарата даже увеличивалась. По-видимому, это объясняется протеолизом фермента; так, известно, что обработка трипсином повышает активность ФДЭ.

При сопоставлении свойств КМ из гипоталамуса с КМ цельного мозга видно, что оба обладают сходной электрофоретической подвижностью в ПААГ (рис. 3).

Величину M_r гипоталамического КМ определяли двумя методами: по миграции в ПААГ при сопоставлении с белковыми стандартами известной величины M_r в коммерческом препарате КМ мозга и гель-фильтрацией на колонке с сефадексом G-100 (2×60 см), используя маркерные белки (альбумин быка—67 кД, ингибитор трипсина из сои—21,5 кД и цитохром С—12,4 кД). Величина M_r гипоталамического КМ оказалась равной 20 кД (рис. 4).



Рис. 3. Электрофорез кальмодулина гипоталамуса крупного рогатого скота в ПААГ: а—кальмодулин цельного мозга; б—кальмодулин гипоталамуса; в—исходный экстракт гипоталамуса

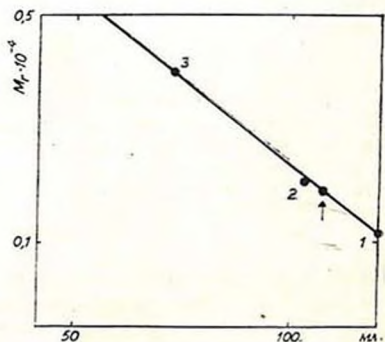


Рис. 4. Определение величины M_r кальмодулина гипоталамуса крупного рогатого скота гель-фильтрацией на сефадексе G-100. Стрелкой обозначен кальмодулин гипоталамуса; маркерные белки: 1—цитохром С (12,4 кД), 2—ингибитор трипсина из сои (21,5 кД), 3—бычий сывороточный альбумин (67 кД). По оси абсцисс—объем удержания, мл; по оси ординат— M_r

Таким образом, можно полагать, что белок, выделенный из гипоталамуса быка, является КМ: во-первых, по его электрофоретической подвижности на ПААГ, сопоставимой с таковой КМ мозга, выделенного нами, и коммерческим препаратом, во-вторых, по величине M_r и, в-третьих, по способности активировать ФДЭ, лишенную КМ.

Представленные данные согласуются с приведенными в литературе, полученными при выделении КМ из других источников, что указывает на консервативность его структуры [21]. В целом, наличие КМ в различных отделах мозга и, в частности, в гипоталамусе свидетельствует о

его важной роли в процессах нейроэндокринной регуляции функций организма.

Для выделения ингибитора ФДЭ ткань гипоталамуса была промыта в 0,9%-ном NaCl при 4°, разрезана на кусочки и гомогенизирована 5 мин в 1 М HCl (7 мл/г сырого веса ткани). Гомогенат экстрагировали в 5 объемах хлороформ-метанола (2:1) в течение ночи при -10°. Экстракт центрифугировали при 600 g 30 мин при 4° и отделяли верхнюю фазу, которую упаривали до небольшого объема на ротационном испарителе при комнатной температуре.

Осветленный центрифугированием экстракт фильтровали через Diaflo мембрану PM 10 и подвергали хроматографии на колонке (2×90 см) с сефадексом G-25, уравновешенной 0,9%-ным NaCl. Элюировали фракции тем же раствором и испытывали на ФДЭ активность.

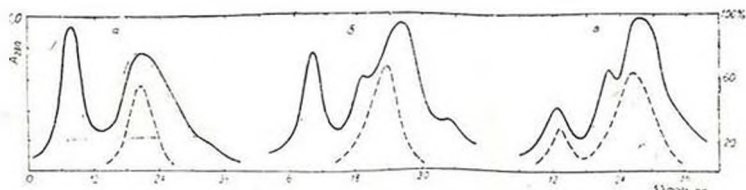


Рис. 5. Хроматография ингибитора из гипоталамуса (а), цельного мозга крыс (б) и крупного рогатого скота (в) на колонке с сефадексом G-25 (2×90 см), уравновешенной 0,9%-ным NaCl. Фракции были элюированы тем же раствором при скорости течения 33 мл/ч. Объем каждой фракции 11 мл. Испытывалось действие элюатов (3 мкл) каждой фракции на активность ФДЭ, лишенной кальмодулина: — поглощение при 280 нм; --- ингибирование ФДЭ в %.

На рис. 5, а представлен профиль элюции белка гипоталамуса с сефадекса G-25. При хроматографии гипоталамического экстракта выявляется два белковых пика, имеющих поглощение при 280 нм. Один из них обладал выраженной ингибирующей активностью на ФДЭ. Одновременно проводили выделение ингибирующего фактора из цельного мозга крыс и крупного рогатого скота (рис. 5, б, в). В этих случаях ингибирующая активность совпадала со вторым пиком для мозга крыс и с обоими белковыми пиками для мозга крупного рогатого скота.

Фракции, обладающие ингибирующей активностью, были объединены, обессолены и сконцентрированы методом ультрафильтрации на приборе формы «Amicon» (США) с мембраной UM-05.

Сравнение действия ингибиторов из трех различных источников показало, что они примерно с одинаковой эффективностью снижают активность ФДЭ из мозга крупного рогатого скота.

Необходимо отметить, что выделенный фактор оказывал ингибирующее влияние не только на Ca^{2+} -кальмодулинчувствительную форму фермента, но и Ca^{2+} -кальмодулиннечувствительную (рис. 6).

Поскольку ингибитор не задерживался мембраной РМ 10, его величина M_r не превышает 10 кД. Для более точного определения величины M_r гипоталамического фактора последний подвергался гель-фильтрации на колонке с сефадексом G-25, откалиброванной стандартами известного молекулярного веса. Из рис. 7 видно, что величина M_r этого фактора ~ 1.3 кД.

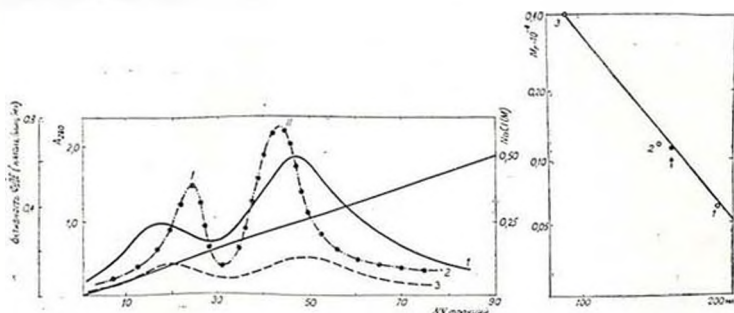


Рис. 6. ИОХ двух форм ФДЭ на колонке с ДЭАЭ-сефадексом А-50 (2×30 см): 1—поглощение при 280 нм; 2—базальная активность ФДЭ; 3—активность ФДЭ в присутствии 5 мкг гипоталамического ингибитора. 1— Ca^{2+} -кальмодулинчувствительная ФДЭ; 2— Ca^{2+} -кальмодулиннечувствительная ФДЭ

Рис. 7. Определение величины M_r гипоталамического ингибитора гель-фильтрацией на колонке (2×90 см) с сефадексом G-25, уравновешенной 0,05 М трис-НСl буфером (0,1 М NaCl), pH 7,5. Стрелкой обозначен ингибиторный фактор; маркерные пептиды: 1—лейцил-энкефалин (0,63 кД), 2—ангитензин (1,18 кД), 3—АКТГ (4 кД). Остальные обозначения те же, что и на рис. 4

Для выяснения природы гипоталамического фактора проводили его гидролиз трипсином. После инкубации с 200 мкг/мл трипсина в течение 17 ч при 30° реакцию останавливали добавлением ингибитора трипсина из бобов сои. В результате такой обработки ингибиторная активность фактора полностью снималась, что свидетельствует о его белковой природе.

Гипоталамический пептид был стабилен к кипячению в течение 10 мин. Повторное замораживание и оттаивание не изменяло его активности.

Таким образом, в гипоталамусе крупного рогатого скота выявлено наличие термостабильного ингибиторного фактора и произведена его частичная очистка. Фактор является протеином, так как теряет активность под действием трипсина: его $M_r \sim 1.3$ кД. Ингибитор эффективно снижает активность Ca^{2+} -кальмодулинчувствительной и Ca^{2+} -кальмодулиннечувствительной ферментов.

Ранее рядом авторов было показано, что для активации ФДЭ мозга требуются значительно более высокие концентрации КМ, чем, например,

в сердце. Оказалось, что это обусловлено наличием термолабильного ингибиторного белка с M_r 11 кД [10]. В дальнейшем подобный ингибиторный белок был получен в гомогенном состоянии из мозга, и его величина M_r оказалась равной 80 кД [22].

В мозгу обнаружен также и термостабильный белок, ингибирующий активность ФДЭ лишь в присутствии КМ [23]. Значительный интерес представляет термостабильный ингибиторный белок с M_r 38 кД из сетчатки глаза млекопитающих [11]. Liu, Wang [24] также показали наличие термостабильного белка в сетчатке быка, который ингибирует базальную активность ФДЭ (без КМ).

Наряду с высокомолекулярными белковыми ингибиторами ФДЭ из гипоталамуса крупного рогатого скота выделен нейрогормон гликопептидной природы, регулирующий коронарный кровоток и оказывающий влияние на Ca^{2+} -кальмодулинчувствительную форму ФДЭ [12].

В 1982 г. был выделен низкомолекулярный ингибитор ФДЭ пептидной природы из мозга крыс и крупного рогатого скота [13], отличный от перечисленных выше белковых ингибиторов и таких пептидов, как АКТГ, холецистокинин, эндорфины, энкефалины, соматостатин и ряд других. Описанный авторами пептид ингибировал ФДЭ сАМР в гомогенате мозга.

Из приведенных нами экспериментальных данных можно заключить, что подобный пептид обнаруживается и в гипоталамусе и обладает способностью ингибировать активность как Ca^{2+} -кальмодулинчувствительной, так и Ca^{2+} -кальмодулиннечувствительной ФДЭ. Необходимы дальнейшие исследования свойств и механизма регуляции активности ФДЭ этим ингибитором.

ENDOGENOUS INHIBITORS AND ACTIVATORS OF CYCLIC NUCLEOTIDE PDE FROM CATTLE HYPOTHALAMUS

SARIBEKYAN G. A., KIRAKOSOVA A. Z., GALFAYAN V. T.,
GALOYAN A. A.

Institute of Biochemistry, ArmSSR Acad. Sci., Yerevan

A low M_r thermostable peptide has been purified from cattle hypothalamus that turned to inhibit both Ca^{2+} , calmodulin-dependent and independent forms of cyclic nucleotide PDE.

Data on the isolation and characteristics of calmodulin from cattle hypothalamus are also presented.

ЛИТЕРАТУРА

1. Cheung W. Y. Science, v. 207, № 4426, p. 19—27, 1980.
2. Thompson W. J., Appleman M. M. Biochemistry, v. 10, p. 311—318, 1971.
3. Takemoto D. J., Hansen J., Takemoto L. J., Honslay M. D. J. Biol. Chem., v. 257, p. 14597—14599, 1982.
4. Galoyan A. A., Gurvitz B. Ya. Neurochem. Rev., v. 10, p. 11, 1985.

5. Gurrutz B. G., Galoyan A. A. 10th Meeting of IUBMB, Prague, 1969, Moscow, p. 448, 1984.
6. Cheung W. Y. Biochem. and Biophys. Res. Commun., v. 38, p. 533—538, 1970.
7. Kakiuchi S., Yamazaki R. Biochem. and Biophys. Res. Commun., v. 41, p. 1104—1110, 1970.
8. Kakiuchi S., Yasuda S., Yamazaki R., Teshima Y., Kanda K., Kakiuchi R., Sobue K. J. Biochem., v. 92, p. 1041—1048, 1982.
9. Эттингер Р. Н. Нейрохимия, т. 3, № 4, с. 405—418, 1984.
10. Wang J. H., Desai R. Biochem. and Biophys. Res. Commun., v. 72, p. 926—932, 1976.
11. Dumler I. L., Ettingof R. N. Biochim. et biophys. acta, v. 429, p. 474—484, 1976.
12. Galoyan A. A., Srapiorian R. M. Neurochem. Res., v. 8, p. 1511—1533, 1983.
13. Collier H. O. J., Butt N. M., Saeed S. A. J. Neurochem., v. 38, p. 275—277, 1932.
14. Сарибекян Г. А., Киракосова А. С., Галфаян В. Т. Тезисы докл. Всесоюзн. симпозиума «Циклические нуклеотиды и система регуляции ферментативных реакций», Рязань, 1985.
15. Saribekyan G. A., Kirakosova A. S., Galphayan V. T., Galoyan A. A. IBRO International Symposium on Neuroendocrinology, Leningrad, 1985.
16. Watterson D. M., Hurrelson W. G., Keller P. M., Sharief F., Vaneman T. G. J. Biol. Chem., v. 251, p. 4501—4513, 1976.
17. Galoyan A. A., Gurrutz B. Ya., Saribekyan G. A., Kirakosova A. S.—In Cyclic Nucleotides and Therapeutic Perspectives, N. Y., Pergamon Press, p. 165—181, 1979.
18. Davis B. J. Ann. N. Y. Acad. Sci., v. 121, p. 404—427, 1964.
19. Lowry O. H., Rosenbrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. J. Biol. Chem., v. 193, p. 265—275, 1951.
20. Burgess W. H., Jemolo D. K., Kretzinger R. H. Biochim. et biophys. acta, v. 623, p. 257—270, 1980.
21. Kakiuchi S., Sobue K., Yamazaki R., Kumbayashi J., Sakou M., Kosaki G. FEBS Lett., v. 126, p. 203—207, 1981.
22. Klee C. B., Krinks M. H. Biochemistry, v. 17, p. 120—126, 1978.
23. Sharma R. K., Wirtz E., Wang J. H. J. Biol. Chem., v. 253, p. 3575—3580, 1978.
24. Liu J. P., Wang J. G. Biochim. et biophys. acta, v. 553, p. 273—278, 1978.

Поступил 12. IV 1986