



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

## Ca<sup>2+</sup>-КАЛЬМОДУЛИНЗАВИСИМАЯ 5'-НУКЛЕОТИДАЗА ГИПОТАЛАМУСА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА И ЕЕ РЕГУЛЯЦИЯ С-МОДУЛИНОМ

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

Институт биохимии АН АрмССР, Ереван

5'-нуклеотидаза (5'-НК) была выделена из растворимой фракции гипоталамуса быка с использованием ИОХ на ДЭАЭ TSK, аффинной хроматографии на фенил-сефарозе, с которой 5'-НК связывалась в присутствии Ca<sup>2+</sup> и элюировалась буфером, содержащим ЭГТА, а также аффинной хроматографии на конканавалин А-сефарозе. Установлено, что выделенный фермент активируется более чем в 6 раз под действием кальмодулина (КМ) в комплексе с Ca<sup>2+</sup> (10<sup>-4</sup> M). Полумаксимальный эффект наблюдался при концентрации КМ 5 · 10<sup>-7</sup> M.

Наряду с этим продемонстрирована активация 5'-НК под влиянием термостабильного Ca<sup>2+</sup>-независимого пептида (С-модулина), обнаруженного в составе фракции, содержащей кардиотропный нейрогормон «С», выделенной ранее из гипоталамуса быка. С-модулин проявлял более высокое средство к ферменту по сравнению с КМ и активировал 5'-НК в отсутствие Ca<sup>2+</sup>.

Высказано предположение о сходстве механизмов регуляции 5'-НК и других КМ-зависимых ферментов.

Согласно современным представлениям, подавляющее число процессов, регулируемых ионами кальция, происходит с участием Ca<sup>2+</sup>-связывающих белков [1]. Одним из наиболее известных внутриклеточных рецепторов Ca<sup>2+</sup> является КМ [2]. Связывание Ca<sup>2+</sup> индуцирует конформационные изменения молекулы КМ, вызывающие увеличение степени ее гидрофобности. Вследствие этого белок-модулятор приобретает способность взаимодействовать с различными ферментами, белками, пептидами, компонентами мембран и низкомолекулярными соединениями.

В настоящей работе приведены новые данные о взаимодействии 5'-НК (КФ 3.1.3.5) гипоталамуса с Ca<sup>2+</sup> и с КМ. Они свидетельствуют о том, что пути регуляции этого Ca<sup>2+</sup>, КМ-зависимого фермента аналогичны механизмам, характерным для других активируемых КМ систем. Наряду с этим продемонстрирована возможность активации 5'-НК под действием термостабильного пептидного фактора, обнаруженного в составе фракции, содержащей кардиотропный нейрогормон «С», выделенный ранее из гипоталамуса быка [3]. Этот фактор был назван С-модулин-

ном в связи с тем, что он, по всей вероятности, является модулятором кардиотропного действия нейrogормона «С», сопровождая его почти на всех этапах очистки, а также на основании его способности вызывать активацию фосфодиэстеразы (ФДЭ) циклических нуклеотидов, подобную КМ по характеру действия на фермент.

### Материалы и методы

В работе были использованы следующие реактивы: 5'-AMP, 5'-GMP, ADP, ATP, дитиотрентол (ДТТ) («Reanal», Венгрия); ЭГТА («Calbiochem», США); β-меркаптоэтанол («Merck», ФРГ); трис («Serva», ФРГ); хроматографические сорбенты: ДЭАЭ TSK Toyopearl 650 M, «Toyo Soda», Япония), фенил-сефароза и конканавалин А-сефароза, а также сефакрил S-200 (Соп А-сефароза) («Pharmacia», Швеция); анионообменная смола Амберлит CG-400, 100-200 меш («Serva», ФРГ); пластины «Силуфол» («Kawalier», ЧССР); α-метилманноза (α-MM) была предоставлена сотрудником нашей лаборатории Возным Я. В. [<sup>14</sup>C] 5'-AMP и [<sup>14</sup>C] 5'-GMP («Chemapol», ЧССР); остальные препараты марок х. ч. и ос. ч. («Союзхимреактив», СССР).

Фермент выделяли из гипоталамуса крупного рогатого скота в соответствии с методом, использованным ранее для очистки ФДЭ циклических нуклеотидов [4], модифицированным [5] на основе афинной хроматографии на фенил-сефарозе [6]. Ткань гомогенизировали в 2,5 мМ трис-HCl буфере, pH 7,0 (1:2,5), содержащем 1 мМ MgCl<sub>2</sub>, в отсутствие или в присутствии 0,1 мМ ЭГТА. Супернатант, полученный при центрифугировании гомогената (75 000 g, 60 мин) наносили на колонку (4×6 см) с ДЭАЭ TSK. Колонку промывали тем же буфером, содержащим 0,05 М NaCl. Элюцию проводили с использованием линейного и ступенчатого градиента NaCl (0,05—0,35 М). Элюат подвергали далее афинной хроматографии на колонке с фенил-сефарозой (4×6 см), предварительно уравновешенной буфером, содержащим 1 мМ CaCl<sub>2</sub>. После промывки колонки элюцию осуществляли буфером, содержащим 5·10<sup>-4</sup> М ЭГТА и 0,15 М NaCl, а затем тем же буфером с использованием непрерывного обратного градиента NaCl (0,15—0,00 М). Элюат наносили далее на колонку (1,2×1,5 см) с Соп А-сефарозой, уравновешенную 25 мМ трис-HCl буфером, pH 7,0, содержащим 0,1 М NaCl, 1 мМ MgCl<sub>2</sub>, 1 мМ CaCl<sub>2</sub> и 1 мМ MnCl<sub>2</sub>. После промывки колонки элюцию проводили буфером, содержащим 0,1 М α-MM. В некоторых случаях выделенный фермент подвергали гель-фильтрации на колонке (1,5×100 см) с сефакрилом S-200 со скоростью 10 мл/ч с применением 25 мМ трис-HCl буфера, pH 7,0, содержащего 0,1 М NaCl и 10<sup>-4</sup> М ЭГТА. Все операции проводили при 4°. Выход белка контролировали по изменению оптической плотности при длине волны 280 нм.

КМ был выделен из мозга быка по методу Gopalakrishna, Anderson [6] с некоторыми модификациями [5].

Активность 5'-НК определяли двумя способами. В первом случае для этого использовали 10 мкл инкубационной среды, содержащей 50 mM трис-HCl буфер, pH 7,0, 1 mM  $MgCl_2$ , 5'-AMP и [ $^{14}C$ ]-5'-AMP (0,1 мкКи) или 5'-GMP и [ $^{14}C$ ] 5'-GMP (0,1 мкКи) в качестве субстрата, и определенное количество фермента элюированных с колонки фракций. Инкубацию проводили при 30° в течение различных промежутков времени. Реакцию останавливали в кипящей водяной бане. Продукты реакции разделяли с помощью ТСХ на силикагеле и идентифицировали с применением свидетелей в ультрафиолете. Счет радиоактивности проб определяли с помощью жидкостного сцинтилляционного спектрометра типа «Intertechnique» (Франция).

Во втором случае продукты гидролиза, осуществляемого в инкубационной смеси объемом 100 мкл, разделяли с использованием анионообменной смолы «Амберлит». По окончании ферментативной реакции к пробам добавляли 0,5 мл смолы, суспендированной в воде (1:2). После центрифугирования производили счет радиоактивности супернатанта (8000 об/мин, 5 мин), содержащего [ $^{14}C$ ] аденозин, не сорбирующийся на смоле, в отличие от 5'-AMP. В первом случае использовали сцинтиллятор ЖС-106, во втором—ЖС-7А. Результаты рассчитывали по количеству гидролизованного субстрата 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

ИОХ растворимой фракции гипоталамуса быка на колонке с ДЭАЭ TSK выявила наличие двух пиков активности 5'-НК (рис. 1). Эти пики элюируются при концентрации NaCl в буфере 0,15 и 0,25 M, соответственно. При аффинной хроматографии суммарного элюата пер-

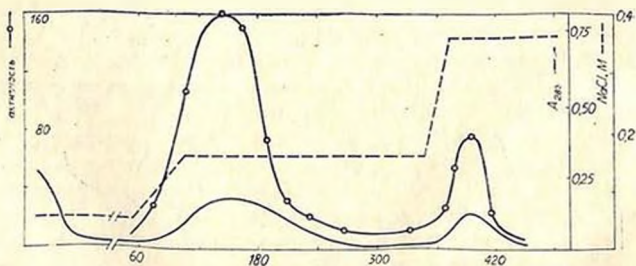


Рис. 1. Хроматография 5'-НК на колонке с ДЭАЭ TSK. По оси абсцисс — объем элюата в мл; по оси ординат (слева) — базальная активность фермента (имоль 5'-GMP/мин) при концентрации субстрата — 5 мМ

вого пика на феноил-сефарозе оказалось, что фермент обладает способностью связываться с гидрофобной матрицей при наличии  $Ca^{2+}$  (0,1 мМ), в отсутствие которого этого связывания не происходит. Возможность

элюирования связанного фермента с колонки с помощью ЭГТА ( $0.2 \text{ mM}$ ), специфично хелатирующего  $\text{Ca}^{2+}$ , свидетельствует о  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимом взаимодействии 5'-НК с фенил-сефарозой. Можно полагать, что под влиянием  $\text{Ca}^{2+}$  происходят конформационные изменения молекулы фермента, приводящие к увеличению степени её гидрофобности. С фенил-сефарозы фермент также элюировался двумя пиками (рис. 2, а). 5'-НК, выделенная в каждом из этих пиков, активировалась при добавлении  $\text{Ca}^{2+}$ .

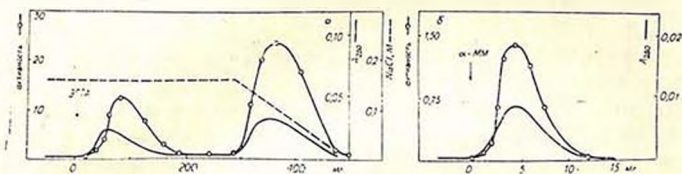


Рис. 2. а—хроматография 5'-НК на колонке с фенил-сефарозой. По оси абсцисс—объем элюата в мл; по оси ординат (слева)—активность фермента в присутствии  $5 \cdot 10^{-4} \text{ M}$  ЭГТА (имоль 5' AMP/мин) при концентрации субстрата— $5 \text{ mM}$ . б—хроматография 5'-НК на колонке с Со. А-сефарозой. По оси ординат (слева)—активность фермента (мкмоль 5'-AMP/мин) при концентрации субстрата— $5 \text{ mM}$

Далее фермент подвергали аффинной хроматографии на Со. А-сефарозе. Оказалось, что 5'-НК, выделенная как в первом, так и во втором пиках с колонки с фенил-сефарозой, связывается к Со. А в присутствии  $\text{Mn}^{2+}$  и  $\text{Ca}^{2+}$  ( $1 \text{ mM}$ ) и элюируется буфером, содержащим  $0.1 \text{ M}$   $\alpha$ -ММ (рис. 2, б). Это, вероятно, свидетельствует о том, что выделенная из растворимой фракции гомогената 5'-НК, подобно ферменту фракции мембран [7], является гликопротеином, имеющим в своем составе  $\alpha$ -D-маннопиранозидальные остатки. Чувствительность 5'-НК, элюированной с Со. А-сефарозы, к активации в присутствии  $\text{Ca}^{2+}$  сохранялась. Зависимость активности 5'-НК от  $\text{Ca}^{2+}$  в диапазоне концентраций  $10^{-8}$ — $10^{-5} \text{ M}$  имела сигмовидный характер (рис. 3, а). Полумаксимальная активация наблюдалась при концентрации  $\text{Ca}^{2+}$   $5 \cdot 10^{-7} \text{ M}$ , что свидетельствует о высоком сродстве фермента к  $\text{Ca}^{2+}$ . Максимальный эффект достигался в присутствии  $10^{-5} \text{ M}$   $\text{Ca}^{2+}$ . При дальнейшем повышении концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  степень активации фермента снижалась.

Несомненный интерес представлял вопрос о возможности регуляции активности 5'-НК под действием КМ. Результаты исследования показали, что 5'-НК, специфично элюированная с Со. А-сефарозы, активируется КМ в присутствии  $10^{-4} \text{ M}$   $\text{Ca}^{2+}$  (рис. 3, б). Чувствительностью к активации КМ обладала как первая, так и вторая форма фермента, выделенная с помощью фенил-сефарозы и подвергнутая дальнейшей очистке. При внесении в инкубационную смесь  $1 \text{ mM}$  ЭГТА активирующий эффект не проявлялся. Это свидетельствует о том, что стимулирующее действие КМ на активность 5'-НК является  $\text{Ca}^{2+}$ -за-

висимым процессом. В большинстве случаев КМ в комплексе с  $\text{Ca}^{2+}$  активировал фермент приблизительно в 6 раз, кривая зависимости скорости реакции от концентрации КМ, так же как и в случае  $\text{Ca}^{2+}$ , носила сигмовидный характер.

Кинетический анализ показал, что действие КМ выражается в увеличении  $V$ ; сродство фермента к субстрату при этом не изменяется ( $K_m$  для 5'-AMP составляет 5 мкмоль). Отметим при этом, что адениловые нуклеотиды конкурировали с субстратом за активный центр: ADP (50 мкМ) и АТР (250 мкМ) полностью подавляли активность 5'-НК.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что 5'-НК гипоталамуса является  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимым ферментом. Наряду с этим было обнаружено, что термостабильный пептидный фактор—С-модулин, выделенный из состава фракций кардиотропного нейrogормона «С» [3], также способен активировать 5'-НК, но  $\text{Ca}^{2+}$ -независимым способом. С-модулин в концентрации 1 мкг/мл стимулировал фермент в 5—8 раз в отсутствие экзогенного  $\text{Ca}^{2+}$  (рис. 4). При добавлении в инкубационную смесь  $10^{-4}$  М  $\text{CaCl}_2$  или  $10^{-4}$  М ЭГТА результат не изменялся. С-модулин проявлял значительно большее сродство к 5'-НК по сравнению с КМ. Можно полагать, что при лимитированных концентрациях  $\text{Ca}^{2+}$  или КМ в интактной клетке 5'-НК преимущественно регулируется С-модулинподобными пептидами, не требующими присутствия  $\text{Ca}^{2+}$  для проявления своей активности. При этом нельзя исключить вероятность того, что в коронарорасширяющем влиянии нейrogормона «С» определенную роль играют С-модулины, которые способствуют образованию 5'-AMP из cAMP, а затем и аденозина. При этом необходимо принять во внимание данные, свидетельствующие о нейротрансмиттерных функциях аденозина в ЦНС, опосредованных пуринергическими рецепторами [7], а также о роли аденозина в регуляции сердечно-сосудистой деятельности [8].

Нам представляется, что 5'-НК по своим свойствам проявляет значительное сходство с другими КМ-зависимыми ферментами, которые обладают способностью активироваться  $\text{Ca}^{2+}$  в отсутствие экзогенного КМ. Наиболее характерными примерами этих ферментов могут служить киназа фосфоорилазы [9] и фосфопротенифосфатаза (кальцинейрин) [10]. Они могут стимулироваться  $\text{Ca}^{2+}$  двумя путями. С одной стороны, эффект возникает в результате взаимодействия  $\text{Ca}^{2+}$  с  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающим белком, входящим в качестве субъединицы в состав фермента (в случае киназы фосфоорилазы этим белком является КМ, в случае кальцинейрина—отличный от КМ белок с  $M_r=19$  кД). С другой стороны, стимулирование активности обусловлено наличием у фермента дополнительного КМ-связывающего центра, к которому проявляет сродство комплекс  $\text{Ca}^{2+}$ -КМ.

Взаимодействие с КМ при минимально возможных в условиях клетки концентрациях  $\text{Ca}^{2+}$  ( $<10^{-7}$  М), недостаточных для насыщения КМ, показано и для  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -АТРазы [11]. Авторами высказано

предположение о том, что КМ может быть слабо связанной субъединицей АТРаза. Оказалось, что фермент располагает, по крайней мере, двумя КМ-связывающими центрами, а комплекс КМ-АТРаза — тремя  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающими центрами.

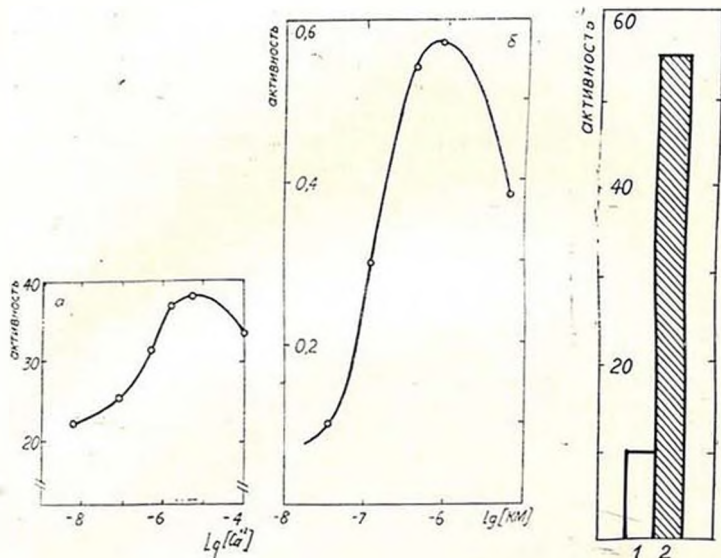


Рис. 3. Активация 5'-НК под действием  $\text{Ca}^{2+}$  (а) и КМ в присутствии  $10^{-4}$  М  $\text{Ca}^{2+}$  (б). По оси ординат — активность фермента (нмоль 5'-АМР/мин) при концентрации субстрата 5 мкМ

Рис. 4. Активность 5'-НК (в нмоль 5'-АМР/мин) в отсутствие и в присутствии С-модулина (1 мкг/мл)

По-видимому, и ФДЭ циклических нуклеотидов мозга крысы также обладает способностью к образованию прочного комплекса с КМ в отсутствие  $\text{Ca}^{2+}$ . Одна из множественных форм фермента активировалась  $\text{Ca}^{2+}$  без экзогенного КМ [12]. Ранее это свойство было продемонстрировано на ФДЭ легких [13]. Отмечалось, что ФДЭ мозга и сердца быка менее прочно связывает эндогенный КМ, который легко отделяется от фермента под действием ЭГТА [14, 15].

В пользу существования промежуточного комплекса КМ ФДЭ, обладающего низкой активностью, свидетельствует также тот факт, что диссоциация КМ из тройного активированного комплекса КМ- $\text{Ca}^{2+}$ -ФДЭ под действием ЭГТА происходит медленно, в то время как инактивация ФДЭ — очень быстрый процесс.

На основании вышесказанного можно сделать заключение, что наряду с известными  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающими белками, к числу которых

относятся парвальбумины, тропонины-С, кальмодулин, легкие цепи миозина, белок S-100 и др., роль рецепторов  $\text{Ca}^{2+}$  могут играть ферменты, содержащие эти белки в составе ферментного комплекса. В то же время существует система пептидов в мозгу, оказывающих регулирующее влияние на активность ФДЭ cAMP и 5'-НК без участия  $\text{Ca}^{2+}$  и кальмодулина.

5'-НК является гликопротеином и принадлежит к эктоэнзимам во многих тканях, в том числе и в мозгу [17]. Первоначально Naidoo в 1962 г. было высказано мнение, что 5'-НК является миелиновым ферментом [18] и связана главным образом с аксолемой олигодендроглии. Нам же удалось выделить 5'-НК из растворимой фракции гипоталамуса.

Недавно было обнаружено, что выделенная нами 5'-НК гипоталамуса обладает также фосфодиэстеразной активностью (неопубликованные данные). При использовании последовательных этапов очистки 5'-НК на ДЭАЭ TSK, фенил-сефарозе, голубой сефарозе, Соп А-сефарозе, cAMP-силикагеле и сефакриле S-200 нами были получены пики активности 5'-НК, которые строго соответствовали пикам активности ФДЭ циклических нуклеотидов. Кроме того, была выявлена взаимосвязь между этими ферментами. Так, при исследовании начальных скоростей 5'-НК показано, что константа скорости реакции первого порядка в 100 раз выше в случае гидролиза 5'-AMP, образующегося из cAMP, по сравнению с гидролизом 5'-AMP, внесенного в пробирку извне. Полученные результаты позволяют предположить существование в гипоталамусе сопряженной системы ФДЭ—5'-НК.

## $\text{Ca}^{2+}$ , CALMODULIN-DEPENDENT 5'-NUCLEOTIDASE FROM BOVINE HYPOTHALAMUS AND ITS REGULATION BY C-MODULIN

GALOYAN A. A., GURVITS B. Y., SHAROVA N. P., ALEXANYAN S. S.

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

5'-Nucleotidase has been purified from the soluble fraction of bovine hypothalamus by chromatography on DEAE-TSK, phenyl- and concanavalin A-Sepharose. Complex of calmodulin and calcium (the latter  $10^{-4}$  M) activates the enzyme more than 6-fold; calmodulin ( $5 \times 10^{-5}$  M) induces half maximal activation.

In addition to that 5'-nucleotidase is activated by C-modulin—a thermostable  $\text{Ca}^{2+}$ -independent peptide, previously identified in the preparation of neurohormone "C". C-modulin exerts a higher affinity to enzyme than calmodulin and activates it in the absence of  $\text{Ca}^{2+}$ .

## ЛИТЕРАТУРА

1. Kretsinger R. H. Ann. Rev. Biochem., v. 45, p. 239—266, 1975.
2. Cheung W. Y. Science, v. 207, p. 19—27, 1980.
3. Galoyan A. A. Neurochem. Res., v. 11, p. 759—787, 1986.

4. Galoyan A. A., Gurvitz B. Ya. *Neurochem. Res.*, v. 10, p. 1467—1481, 1985.
5. Бобруский И. Л., Шайхин С. М., Муратова М. В., Баранова Л. Н., Северин Е. С. *Биохимия*, т. 52 с. 1344—1351, 1987.
6. Gopalakrishna R., Anderson W. B. *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, v. 104, p. 830—836, 1982.
7. Nakamura S., Mimori Y., Iijima S., Nagata H., Yamao S., Kamayama M.—In: *Physiology and Pharmacology of Adenosine Derivatives* (eds. I. W. Daly, Y. Kuroda, I. W. Phillis, H. Shimizu, M. Ui), p. 21—29, N. Y., Raven Press, 1983.
8. Arch J. R. S., Newsholme E. A. *Biochem. J.*, v. 174, p. 965—977, 1978.
9. Cohen P., Burchell A., Fculkes J. G., Cohen P. T. W., Vanaman T. C., Nairn A. C. *FEBS Lett.*, v. 92, p. 287—293, 1978.
10. Klee C. B., Krinks M. N., Manalan A. S., Cohen P., Stewart A. A. *Methods in Enzymol.*, v. 102, p. 227—244, 1983.
11. Alakhev V. Yu., Emelyanenko E. I., Shukhparonov M. I. *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, v. 132, p. 591—697, 1985.
12. Strada S. J., Murtin M. W., Thompson W. J.—In: *Advances in Cyclic Nucleotide and Protein Phosphorylation Res.* (eds. S. I. Strada, W. J. Thompson) v. 16, p. 13—29, N. Y., Raven Press, 1984.
13. Sharma R. K., Wirch E. *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, v. 91, p. 338—344, 1979.
14. Sharma R. K., Wang T. A., Wirch E., Wang I. H. *J. Biol. Chem.*, v. 255, p. 5916—5923, 1980.
15. La Porte D. C., Toscano W. A., Storm D. R. *Biochemistry*, v. 18, p. 2820—2825, 1979.
16. Галоян А. А. *Нейрохимия*, т. 6, № 1, с. 3—9, 1987.
17. Stefanovic V., Mandel P., Rosenberg A. *Biochemistry*, v. 18, p. 357—361, 1979.
18. Naidoo D. J. *Histochem. Cutochem.*, v. 10, p. 421—434, 1962.
19. Mallol J., Bozal J. J. *Neurochem.*, v. 40, p. 1205—1211, 1982.
20. Centelles J. J., Franco R., Canelu E. J., Bozal J. *Neurochem. Res.*, v. 11, № 4, p. 471—479, 1986.

Поступила 19. V 1987