

УДК 577.17

БИОХИМИЯ

Член-корреспондент АН Армянской ССР А. А. Галоян,
 А. С. Киракосян, Г. А. Сарибекян, Г. Х. Марукян

О влиянии кардиотропных нейrogормонов на цАМФ-зависимую протеникиназу

(Представлено 13/V 1977)

Цикло-АМФ принадлежит ключевая роль в регуляции ряда метаболических процессов, обуславливающих определенные физиологические функции (1-3). Действие цАМФ в основном реализуется через цАМФ-зависимую протеникиназу—фермент, осуществляющий перенос фосфатного остатка с АТФ на ферментные белки или на ряд других белков (4-6).

Садерленд развивает концепцию о том, что многие гормоны действуют путем системы двух мессенджеров (7). Эти гормоны можно рассматривать как первичные мессенджеры, которые стимулируют в клетках образование вторичного мессенджера—цАМФ.

Тот факт, что клетки реагируют лишь на определенные гормоны можно объяснить тем, что имеются гормонспецифические рецепторы (8), расположенные на внешней поверхности плазменной мембраны клеток-мишеней. Относительно природы рецепторов существуют различные гипотезы, одной из них является их идентичность с аденилциклазой (9).

Предварительные опыты нашей лаборатории показали, что аденилциклаза мозга и сердца не подвергается прямому воздействию нейrogормона «С», в то время как указанный нейrogормон весьма сильно (70—80%) ингибирует фосфодиэстеразу мозга и на 90—100% фосфодиэстеразу, изолированную из сердца быка, тем самым увеличивая уровень цАМФ в цитоплазме клетки (9).

Исходя из вышесказанного, мы задались целью изучить влияние неизвестных ранее кардиотропных нейrogормонов низкомолекулярной природы, выделенных из гипоталамо-нейтрогипофизарной системы крупного рогатого скота и условно названных «С», «К» и «Г» (10), на цАМФ-зависимую протеникиназную активность *in vitro*.

цАМФ-зависимая протеникиназа была получена из мозга быка по методу Грингарда и соавт (4,5,11).

Инкубационная смесь с общим объемом 0,2 мл содержала следующие компоненты в мкмольях: Трис-НСI буфер (рН 7,4)—10, хлористый магний—2, дитиотриэтол—0,2, теofilлин—0,4, этилен гликол bis (3-аминоэтил эфир)—N, N'-тетрауксусная кислота (ЭГТА)—0,06, цАМФ—0,5 200 мкг гистона тимуса теленка, соответствующее количество энзима и 5 мкмольей (γ P³²-АТФ) (от 1 до 5×10^5 и.м.п./мин).

Смесь инкубировали на водяной бане при 30°C в течение 5 минут. Реакцию останавливали добавлением 2 мл 5%-ной ТХУ содержащей 0,25% вольфрамат натрия и 0,06н. H₂SO₄. Перед центрифугированием добавляли 0,2 мл 0,63%-ного бычьего сывороточного альбумина и оставляли при 0°C на 5 минут. Смесь центрифугировали, и осадок растворяли в 0,1 мл 1N NaOH добавляли 2 мл 5%-ной ТХУ, содержащей 0,25% вольфрамат натрия и 0,06н. H₂SO₄. Белок осаждали из раствора, подкисляя его 0,1 мл 1,2н. H₂SO₄, центрифугировали, и супернатант удаляли. Растворение белка в щелочи и его осаждение повторяли 3 раза. Для подсчета радиоактивности белок окончательно растворяли в 0,1 мл 1н. NaOH и подсчет производили в жидкостном сцинтилляционном счетчике марки Intertechnic.

За одну единицу ферментативной активности принималось такое количество фермента, которое переносит 1 пикомоль P³² от (γ -P³²-АТФ) на протенин за 5 минут при 30°C в стандартной испытываемой системе.

Белок определяли по методу Лоури и соавт. (12).

Нейрогормоны «С», «К», и «G» вносили в образцы перед инкубацией в биологических дозах, равных 0,25—0,5. Одна биологическая доза увеличивает количество крови, оттекающей из венозных сосудов сердца за единицу времени на 100% в условиях *in situ*.

На рис. 1 представлены данные по влиянию трех коронарорасширяющих нейрогормонов «С», «К» и «G» на протеникиназную активность *in vitro*. Под влиянием нейрогормона «С» активность цАМФ-зависимой протеникиназы падает с 493 ± 39 пикомольей включенного P³² в контроле до 374 ± 16 пикомольей ($P < 0,01$; $n = 14$).

Под влиянием другого нейрогормона «К» протеникиназная активность изменяется в тех же величинах, а именно до 371 ± 17 пикомольей включенного P³² ($P > 0,02$; $n = 10$). Что же касается нейрогормона «G», то его тормозящий эффект на протеникиназную активность выражен значительно сильнее. Активность фермента падает с 493 ± 39 до 281 ± 19 пикомольей включенного P³² ($P > 0,001$; $n = 14$). Во всех опытах без добавления цАМФ активность протеникиназы составляла половину от таковой с добавлением цАМФ при концентрации 5 μ M (рис. 1).

Таким образом, приведенные данные показывают, что все три нейрогормона в той или иной степени подавляют цАМФ-зависимую протеникиназную активность *in vitro*.

В литературе имеются указания, что моноамины—норадреналин, допамин и 5-окситриптамин ингибируют фосфорилирование гистона из тимуса теленка; гормоны нейрогипофиза окситоцин и вазопрессин, а также синтетические тиреотропин- и лютеинизирующий рилизинг гормоны не влияли на активность протеникиназы (13), соматостатин подав-

лял накопление цАМФ в гипофизе (14). Указывается также, что АКТИГ вызывает повышение активности цАМФ-зависимой протеинкиназы (15, 16).

Таким образом эффект гормонов на протеинкиназную активность различен.

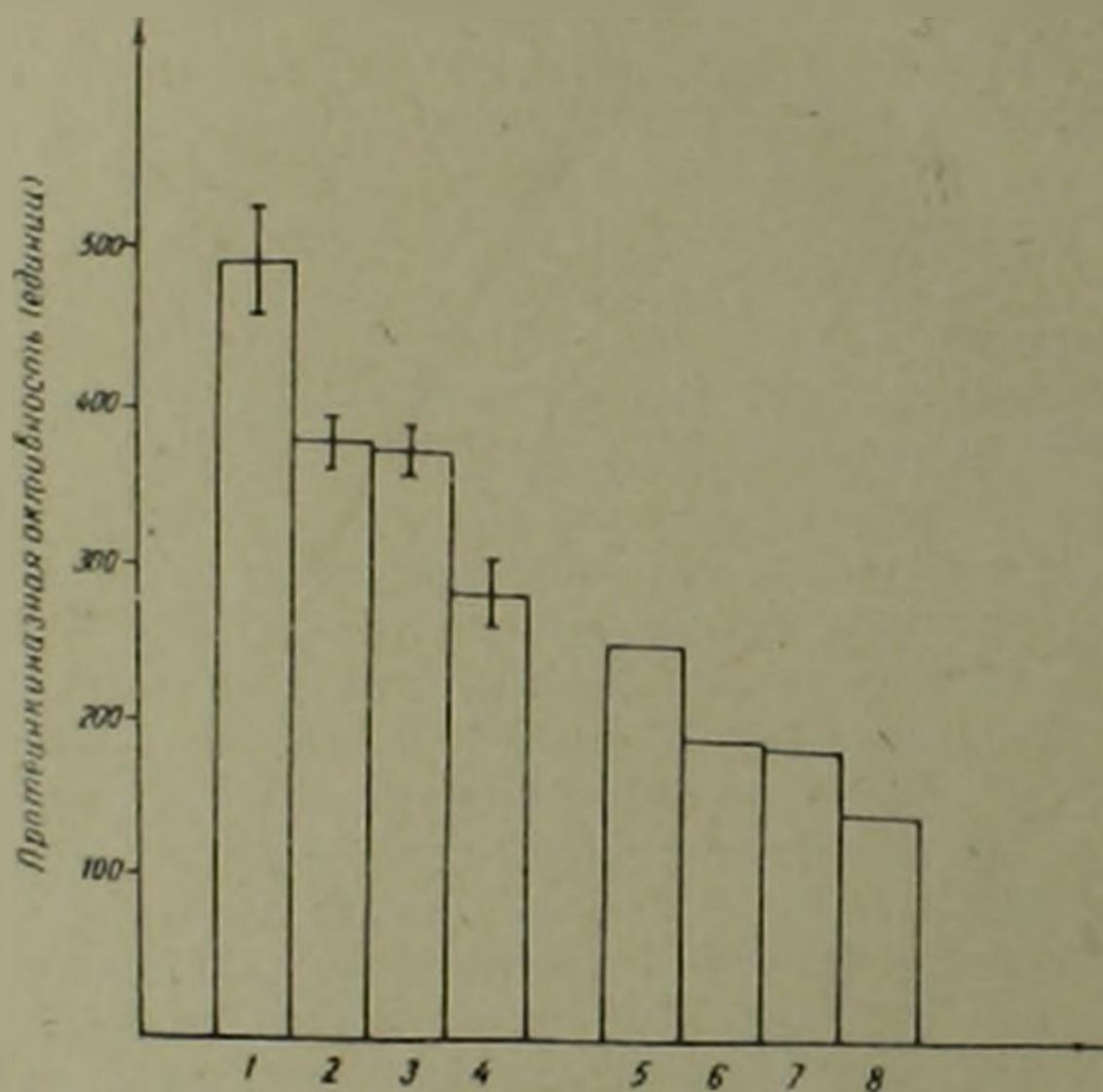


Рис. 1. Изменение протеинкиназной активности под влиянием нейрогормонов «С», «К» и «G».

1—контроль; 2—нейрогормон «С»; 3—нейрогормон «К»; 4—нейрогормон «G»; 5—8—то же, без цАМФ

Возможно, характер изменения протеинкиназной активности под действием нейрогормонов при природном субстрате фосфорилирования был бы иным, хотя указывается, что, по-видимому, фосфорилирование как эндогенных, так и экзогенных субстратов осуществляется одним и тем же ферментом (17).

Возможным объяснением механизма действия нейрогормонов на активность протеинкиназы является конкурентное взаимодействие между нейрогормоном и цАМФ за регуляторную субъединицу протеинкиназы.

Нельзя исключить также возможность действия нейрогормона и на каталитическую субъединицу фермента.

Институт биохимии
Академии наук Армянской ССР

Ցիկլիկ ԱՄՖ-կախյալ պրոտեինկինազայի վրա կառդիտոբուլ և նյութափոխանակման ների ազդեցության մասին

Ուսումնասիրված է կորոնարոակտիվ նեյրոհորմոնների՝ «C», «K» և «G» ազդեցությունը ցիկլիկ ԱՄՖ-կախյալ պրոտեինկինազայի վրա: Նշված նեյրոհորմոնները ճնշում են ցիկլիկ ԱՄՖ-կախյալ պրոտեինկինազայի ակտիվությունը, ըստ որում ավելի ուժեղ արտահայտված է նեյրոհորմոն «G» ազդեցությունը: Ինքնազդվում է, որ նեյրոհորմոնները իջեցնում են ցիկլիկ ԱՄՖ-կախյալ պրոտեին կինազայի ակտիվությունը, որի մեխանիզմը բացահայտելու համար անհրաժեշտ են հետագա հետազոտություններ:

Л И Т Е Р А Т У Р А — Գ Ր Ա Կ Ա Ն Ո Ւ Թ Յ Ո Ւ Ն

- ¹ T. W. Rall, E. W. Sutherland, J. Berthel J. Biol. Chem., 224, 463 (1957).
² E. W. Sutherland, T. W. Rall, J. Biol. Chem., 232, 1077 (1958). ³ G. A. Robison, R. W. Butcher, E. W. Sutherland, Ann. Rev. Biochem., 37, 149 (1968). ⁴ E. Miyamoto, J. F. Kuo, P. Greengard, J. Biol. Chem., 244, 6395 (1969). ⁵ J. F. Kuo, P. Greengard, J. Biol. Chem., 245, 4067 (1970). ⁶ E. Miyamoto, J. F. Kuo, P. Greengard Science, 165, 63 (1969). ⁷ L. Birnbaumer, Biophys. Biochim. Acta, 340, 19 (1973).
⁸ P. Greengard, Nature, 260, 5547, 101 (1976). ⁹ А. А. Галоян, Б. Я. Гурвиц, Вopr. биох. мозга, Изд. АН Арм. ССР, XII (1976). ¹⁰ А. А. Галоян, Вopr. биох. мозга, Изд. АН Арм. ССР, VIII, 107 (1973). ¹¹ J. F. Kuo, B. K. Krueger, J. R. Sanes, P. Greengard, Biophys. Biochem. Acta, 212, 79 (1970). ¹² O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr, J. Randall, J. Biol. Chem., 193, 265 (1951). ¹³ J. F. Mcelvey, Biophys. Biochem. Res. Commun., 65, 5 (1975). ¹⁴ P. Borgeat, F. Labria, J. Drouin et al., Biophys. Biochem. Res. Commun., 56, 1052 (1974). ¹⁵ S. Sumio et al., Endocrinology, 94, 650 (1974). ¹⁶ M. C. Richardson, D. Schulster, Acta Endocrinol., 73, Suppl. 174, 371 (1973). ¹⁷ A. Salman, K. M. Jayaram, Biochem. J., 151, 23 (1975).