

УДК 577.17

БИОХИМИЯ

А. С. Киракосова, Г. А. Сарибекян, Т. Х. Марукян
 член-корреспондент АН Армянской ССР А. А. Галоян

О 3',5'-цАМФ-зависимой протеинкиназе мозга быка и факторе,
 ингибирующем ее активность

(Представлено 13/V 1977)

Садерленд и соавторы установили, что циклический нуклеотид— 3',5'-АМФ играет важную роль в осуществлении эффекта гормонов и медиаторов у организмов, стоящих на самых различных ступенях развития (1-4). Действие циклического 3',5'-АМФ (цАМФ) в различных тканях осуществляется с участием цАМФ-зависимой протеинкиназы (5-7). цАМФ, связываясь с регуляторной субъединицей протеинкиназы, ведет к диссоциации фермента, вызывая высвобождение каталитической субъединицы, проявления ее активности и тем самым увеличения уровня фосфорилирования (8).

Протеинкиназа, которая катализирует фосфорилирование гистона, протамина, казеина в присутствии низких концентраций цАМФ, была найдена и изучена в скелетных мышцах (9), печени (10), мозге (11), и ряде других тканей млекопитающих, а также бактерий (7) и беспозвоночных (12,13).

Нами было показано, что нейрогормон «С» повышает уровень цАМФ, ингибируя фосфодиэстеразу (14). Для дальнейшего изучения механизма действия кардиотропных нейрогормонов на активность цАМФ-зависимой протеинкиназы необходимо было получить цАМФ-зависимую протеинкиназу и выяснить ее свойства.

цАМФ-зависимая протеинкиназа была получена нами из мозга быка по методу Грингарда и соавторов (14, 15).

Свежие мозги быка были получены с бойни и заморожены. Замороженную ткань разрезали на мелкие кусочки и гомогенизировали в измельчителе тканей РТ-1 в течение 3-х минут с тремя объемами холодного нейтрального ЭДТА, 4mM. Все использованные буферы содержали 2-хmM ЭДТА. Гомогенат центрифугировали в течение 20 минут при 27000 g на VAC 601. Преципитат удаляли, а супернатант доводили до pH 4,8 1M уксусной кислотой по каплям. Образованный осадок через 10 минут удаляли центрифугированием при 27000 g в те-

чение 30 минут. pH полученного супернатанта доводили до 6,5 с помощью 1М К-фосфатного буфера, pH 7,2. К этому раствору добавляли кристаллический сульфат аммония из расчета 32,5 г на 100 мл раствора и перемешивали в течение 30 минут. Центрифугировали 20 минут при 27000 g. Полученный осадок собирали и растворяли в небольшом объеме 5мМ К-фосфатного буфера, pH 7,0. Полученный раствор диализовали в течение 12 часов против 20 объемов того же буфера. Диализат центрифугировали при 27000 g в течение 30 минут, осадок выбрасывали, а супернатант (энзимный раствор) использовали для дальнейшей очистки на ДЕАЕ-целлюлозе.

Супернатант наносили на колонку (1,5×20 см) с ДЕАЕ-целлюлозой ДЕ-32, которая специальной обработкой была превращена нами в ДЕ-52. Этот ионообменник уравнивали 5мМ К-фосфатным буфером, pH 7,0. После нанесения энзимного раствора колонку промывали двумя объемами 0,1 М К-фосфатного буфера, pH 7,0.

Адсорбированный на целлюлозе энзим элюировали с колонки 0,3 М К-фосфатным буфером, pH 7,0. Активные фракции собирали по 3—4 мл.

Оптическую плотность полученных фракций измеряли на СФ-4А при 280 нм. Количество белка определяли по методу Лоури (16), используя бычий сывороточный альбумин в качестве стандарта. В собранных фракциях определяли активность цАМФ-зависимой протеникиназы (6,15). Инкубационная смесь в общем объеме 0,2 мл содержала следующие компоненты в мкмольях: Трис-НСI буфер (pH 7,4)—10, хлористый магний—2, дитиотриэтол—0,2, теофиллин—0,4, этилен гликол *bis* (β-аминоэтилэфир) - N, N' —тетрауксусной кислоты—0,06, цАМФ—0,5, 200 мкг гистона тимуса теленка, соответствующее количество энзима и 5 мкмольей [γ-³²P]-АТФ (от 1 до 5×10⁵ имп/мин). Смесь инкубировали на водяной бане при 30°C в течение 5 минут. Реакцию останавливали добавлением 2 мл 5%-ной трихлоруксусной кислоты (ТХУ), содержащей 0,25% натрий вольфрамат и 0,05N. H₂SO₄. Далее добавляли 0,2 мл 0,63% бычьего сывороточного альбумина в качестве носителя протейна. Оставляли при 0°C на 5 минут. Смесь центрифугировали, супернатант удаляли. Осадок растворяли в 0,1 мл 1N. NaOH и добавляли 2 мл 5%-ной ТХУ. Белок осаждали снова из раствора, подкисляя его 0,1 мл 1,2N. H₂SO₄, центрифугировали, и супернатант удаляли. Растворение белка и осаждение повторяли еще раз. Белок окончательно растворяли в 0,1 мл 1N. NaOH. Радиоактивность подсчитывали в жидкостном сцинтилляционном счетчике марки Intertechinc.

За единицу энзимной активности принимали такое количество энзима, которое переносит 1 пикомоль P³² от [γ-P³²]. АТФ на получаемый протейн за 5 минут при 30°C в стандартной испытуемой системе.

Ранее нами проводилось определение протеникиназной активности не с помощью трихлоруксусного осаждения, а путем адсорбции фосфорилированного гистона на бумаге Ватман 3ММ. Однако мы обнаружили неспецифическое связывание фосфорилированного гистона с этой

бумагой. В литературе также имеется указание на подобный факт (17). Исходя из вышесказанного, дальнейшие эксперименты мы приводили с помощью ТХУ-осаждения.

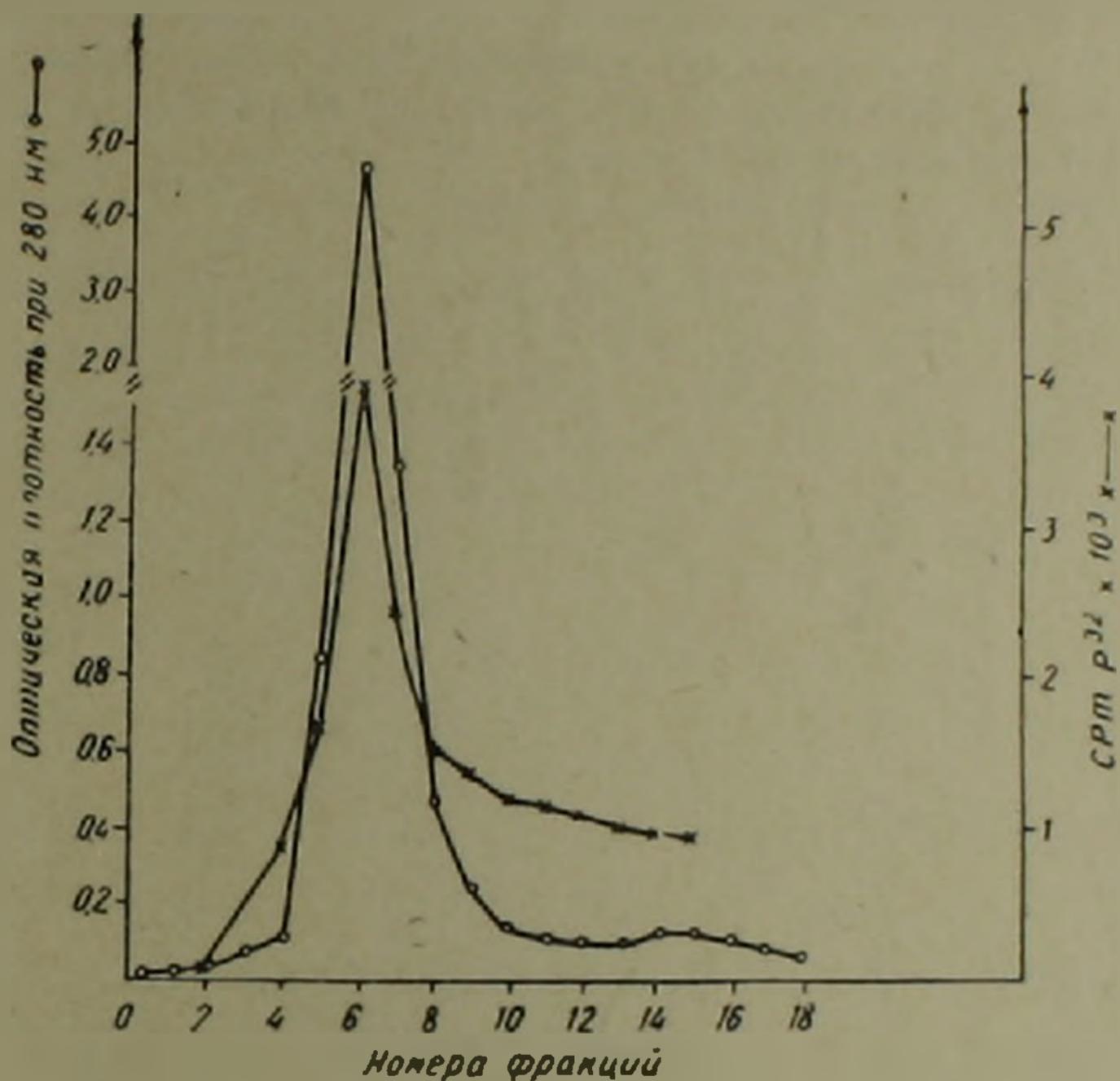


Рис. 1. Элюционный профиль активности цАМФ-зависимой протеникиназы мозга быка после ДЕАЕ-целлюлозной хроматографии

Элюционный профиль активности цАМФ-зависимой протеникиназы мозга быка после ДЕ-52 ионообменной хроматографии показан на рис. 1. Все неадсорбированные белки вымывали с колонки 0,1М К-фосфатным буфером рН 7,0. Как видно из рис. 1, фермент был элюирован в протениновом пике при использовании 0,3М К-фосфатного буфера, рН 7,0.

В другом случае нами проводилась ступенчатая элюция фракций ферментного раствора с колонки при следующих концентрациях К-фосфатного буфера: 5мМ, 50мМ, 300мМ с целью возможного выделения из одной ткани одновременно двух протеникиназ — цАМФ- и цГМФ-зависимых соответственно.

Из кривой на рис. 2, видно, что максимум ферментной активности цАМФ-зависимой протеникиназы обнаруживается в пике, элюированном 300мМ фосфатным буфером, в остальных фракциях не обнаруживается сколько-нибудь заметной активности данного фермента.

При испытании всех собранных фракций на энзимную активность, чувствительную к цГМФ, оказалось, что цГМФ-зависимая протеинкиназа обнаруживается в пике, элюированном 50 мМ фосфатным буфером. Кроме того, цАМФ-зависимая протеинкиназа обладает одновременно цГМФ-зависимой протеинкиназной активностью, но в более слабой степени, в то время как, цГМФ-зависимая протеинкиназа обладает также цАМФ-зависимой протеинкиназной активностью, но также в меньшей степени (рис. 2).

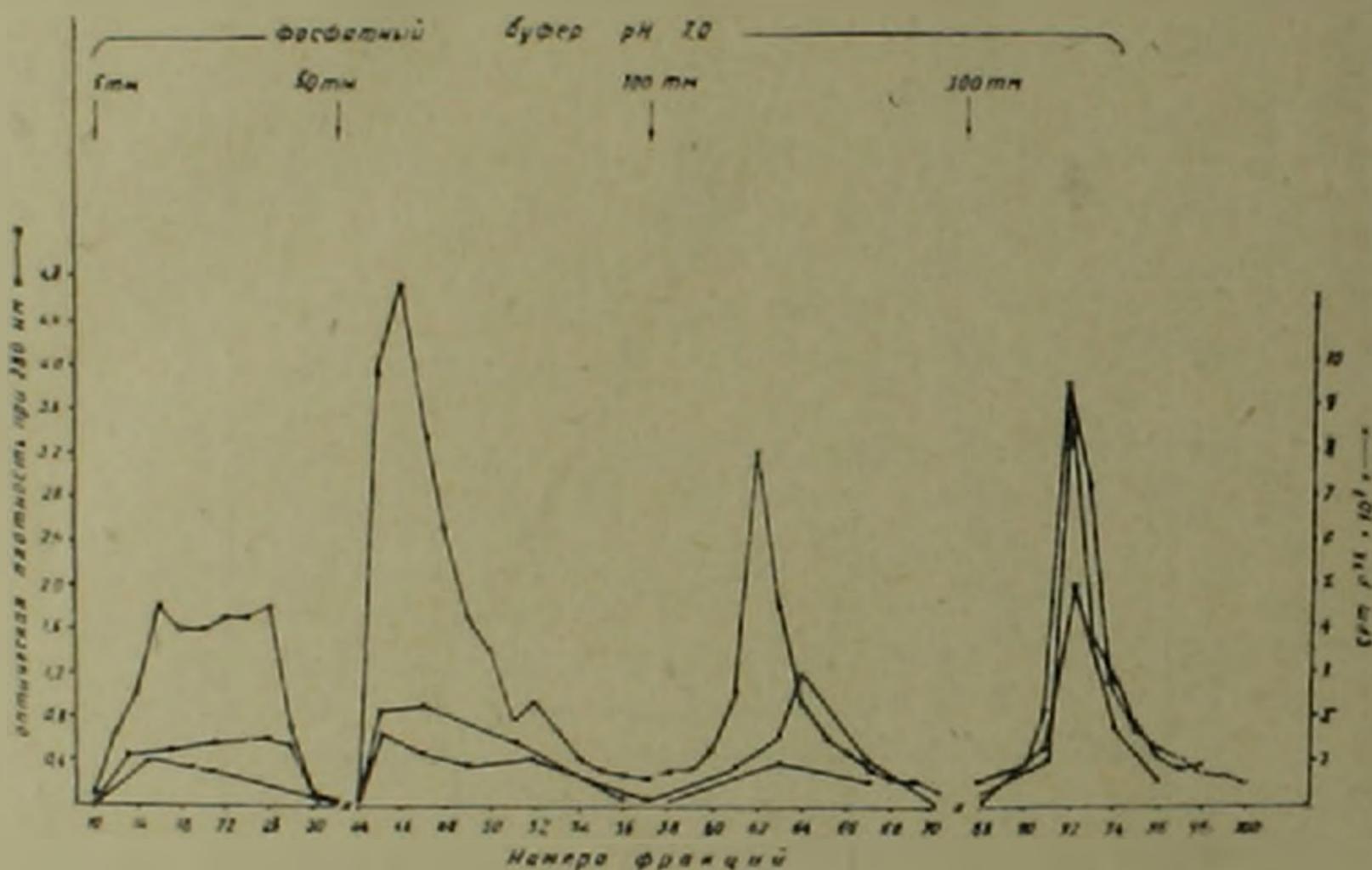


Рис. 2. Элюционный профиль активности цАМФ- и цГМФ-зависимых протеинкиназ мозга быка после ДЕАЕ-целлюлозной хроматографии ступенчатым градиентом. Оптическая плотность (o—o—o), протеинкиназная активность в присутствии цАМФ (x—x—x), цГМФ (o—o—o)

В литературе в последнее время указывается на наличие в мозжечке одновременно двух протеинкиназ: цАМФ- и цГМФ-зависимых (¹⁸); приводятся также данные о выделении обеих протеинкиназ из хвостовых мышц омара (¹⁹). цГМФ-зависимая протеинкиназа была выделена с пика, элюированного 5 мМ фосфатным буфером, а цАМФ-зависимая протеинкиназа была обнаружена в пике, элюированном 50 мМ фосфатным буфером. В пиках, элюированных 100, 200 и 300 мМ фосфатным буфером, не было найдено какой-либо протеинкиназной активности. Возможно, такое различие в молярностях для элюции протеинкиназ между нашими и литературными данными можно объяснить тем, что метод указан для выделения протеинкиназ из хвостовых мышц омара, а мы выделяли их из мозга быка.

Однако в других сообщениях те же авторы применяли этот же

метод для выделения только цАМФ-зависимой протеникиназы из мозга и обнаружили ее при элюции 300mM фосфатным буфером (3,12,13).

По литературным данным, результаты, полученные в опытах с частично очищенным энзимом из мозга, а именно до степени очистки на ДЕАЕ-целлюлозной колонке, как в нашем случае, хорошо согласуются с результатами, полученными ранее с более высокоочищенным ферментом из мозга быка (6,15). Исходя из этого мы использовали в наших опытах частично очищенный энзим—после обработки ее на ДЕАЕ целлюлозе.

Эффект концентрации субстрата на активность фермента изображен на рис. 3. Концентрация гистона, при которой наблюдается скорость реакции равная половине максимальной, была около 85 мкг. В качестве субстратов фосфорилирования использовали гистон тимуса теленка, гистон F₁, богатый лизином и протамин. Все эти субстраты могли служить акцепторами фосфата в цАМФ-зависимых протеникиназных реакциях.

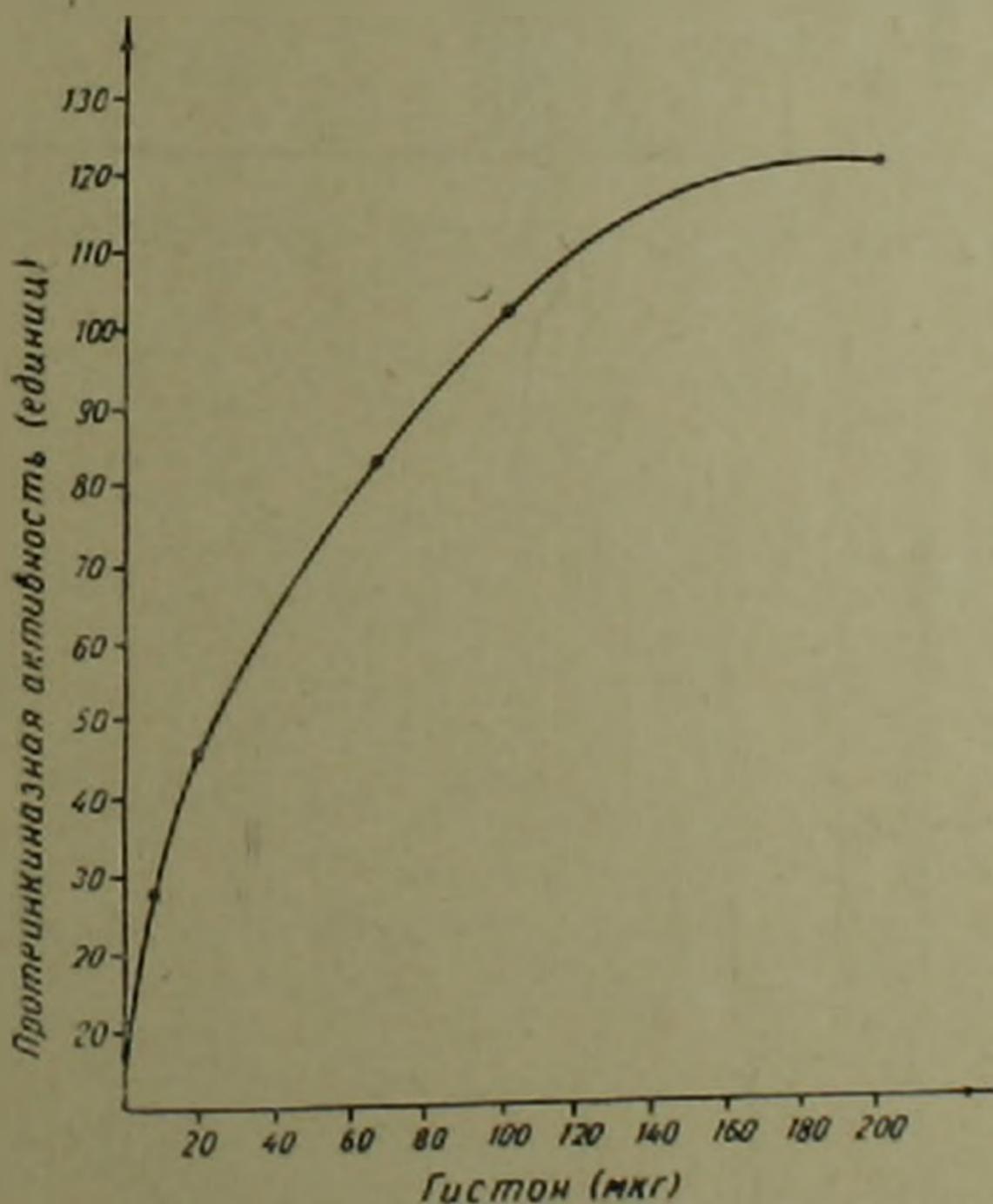


Рис. 3 Эффект концентрации субстрата на протеникиназную активность

Известно, что протеникиназы осуществляют фосфорилирование субстратов при низких концентрациях циклического нуклеотида. На рис. 4 показан уровень фосфорилирования гистона при участии цАМФ.

зависимой протеинкиназы в отсутствие и присутствии 5 и 10 μ М цАМФ. 10 μ М цАМФ не вызывает изменения уровня фосфорилирования по сравнению с контрольной величиной (без применения цАМФ). 5 μ М цАМФ вызывает двукратное увеличение активности протеинкиназы.

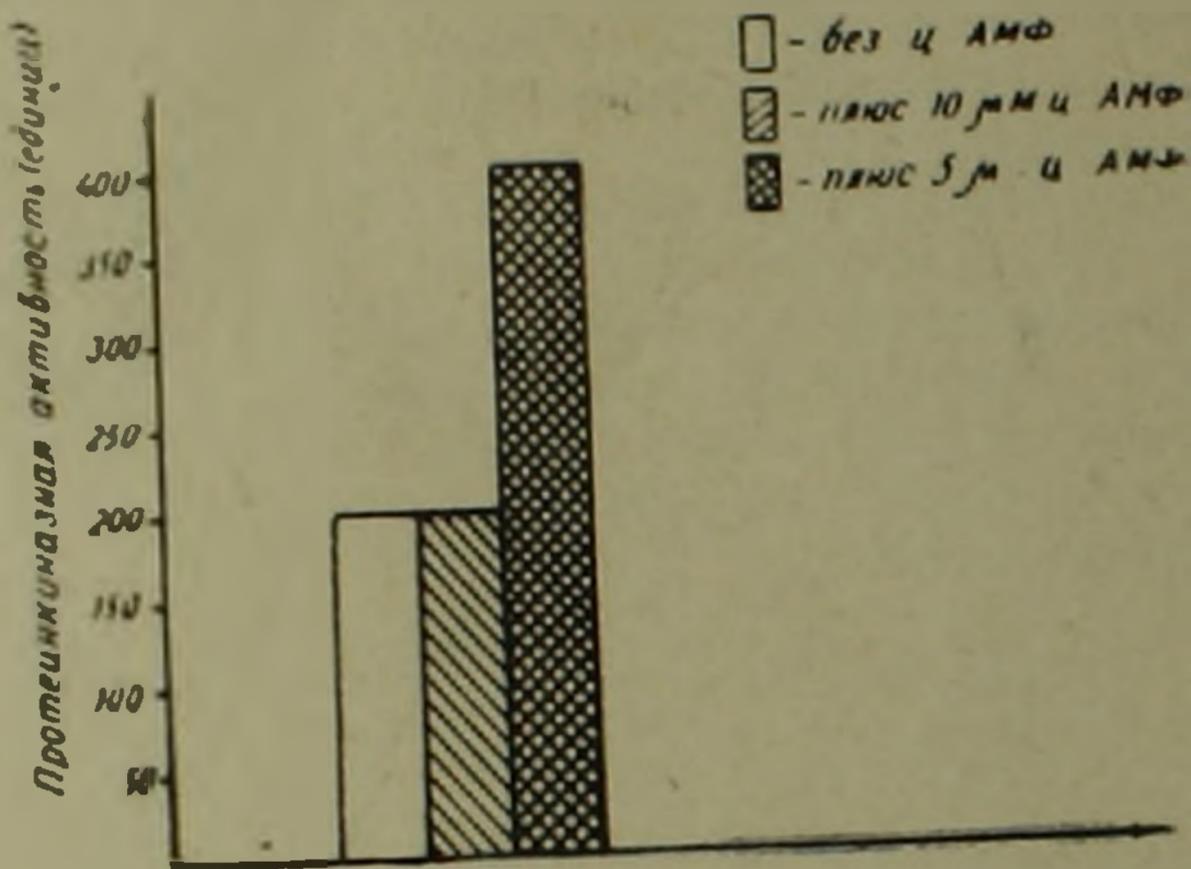


Рис. 4. Зависимость уровня фосфорилирования от концентрации цАМФ

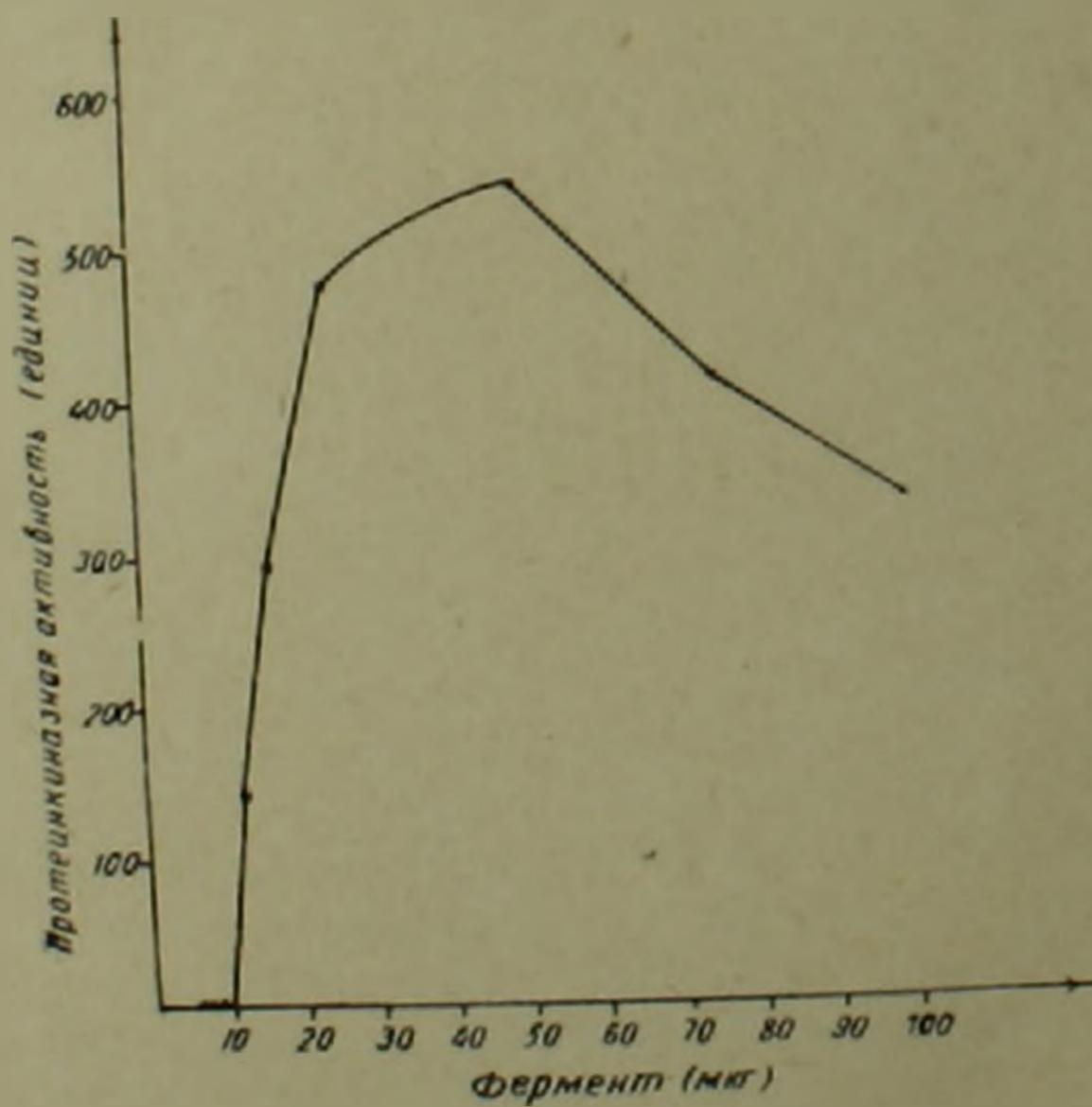


Рис. 5. Зависимость протеинкиназной реакции от концентрации фермента

Зависимость между концентрацией фермента и активностью протеинкиназной реакции изображена на рис. 5. Из кривой видно, что концентрация фермента, требуемая для обеспечения половины максимальной скорости, была около 12,5 мкг. Кривая пропорциональна концентрации фермента до 25 мкг. Выше этой концентрации кривая переходит не в плато, как в обычных реакциях по уравнению Михаэлиса-Ментен, а, наоборот, с увеличением концентрации фермента наблюдается падение скорости ферментативной реакции (рис. 5). Возможно, это можно объяснить наличием в полученном нами ферменте примеси фосфопротеин фосфатазы. В литературе имеются данные о том, что цАМФ-зависимая протеинкиназа и фосфатаза могут быть выделены в комплексе (20). Для обнаружения фосфопротеин фосфатазной активности в препаратах нашего фермента была поставлена реакция дефосфорилирования казена. Оказалось, что выделенный нами препарат протеинкиназы обладает фосфопротеин фосфатазной активностью при концентрациях фермента оптимальных для протеинкиназной реакции, а при более высоких концентрациях, когда наблюдалось торможение протеинкиназной активности, фосфатазная активность была ниже.

С другой стороны, в опытах по определению протеинкиназной активности без субстрата в зависимости от концентрации фермента, также наблюдалось падение протеинкиназной активности (табл. 1).

Таблица 1

Зависимость аутофосфорилирования от концентрации фермента

Объем фермента, м.л	Количество импульсов в минуту включенного Р ³²
0.03	2000
0.04	1670
0.05	1060
0.06	785
0.07	570

Данные таблицы указывают на то, что происходит торможение и аутофосфорилирования при увеличении концентрации протеинкиназы.

Исходя из вышесказанного можно предположить, что происходит торможение протеинкиназной реакции, фосфатазной и аутофосфорилирования протеинкиназы, по-видимому, за счет присутствия неидентифицированного фактора в частично очищенном нами ферменте протеинкиназы.

Приносим нашу благодарность Г. К. Парсадзяну за проверку наличия фосфопротеин фосфатазной активности фермента протеинкиназы.

Ուղեղից անջատված ցիկլիկ ԱՄՖ-կախյալ պրոտեինկինազայի և նրա
ակտիվությունն արգելակող գործոնի մասին

Խոշոր եղջերավոր կենդանիների ուղեղից անջատվել և մասամբ մաքրվել է ցիկլիկ ԱՄՖ-կախյալ պրոտեինկինազայի Ֆուլց հն տրված այդ ֆերմենտի մաքրման և ակտիվության մի քանի պայմաններ: Հետաքրքիր է, որ ցիկլիկ ԱՄՖ-կախյալ պրոտեինկինազան ցուցարհրում է ցիկլիկ ԳՄՖ-կախյալ պրոտեինկինազային ակտիվություն, բայց ավելի թույլ արտահայտված: Հայտնաբերված է պրոտեինկինազային ռեակցիայի արգելակում, որը, հավանաբար, տեղի է ունենում մասնակի մաքրված ֆերմենտի հետ հանդիսակող չի դենտիֆիկացված ֆակտորի ներկայության հաշվին:

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

- ¹ G. A. Robison, R. W. Butcher, E. W. Sutherland, *Ann. Rev. Biochem. Biol.* 26, 347 (1961). ² E. W. Sutherland, *Y. A. M. A.*, 214, 1281 (1970). ³ E. W. Sutherland, G. A. Robison, R. W. Butcher, *Circulation*, 37, 279 (1969). ⁴ G. A. Robison, R. W. Butcher, E. W. Sutherland, *Ann. Rev. Biochem.* 37, 149 (1968). ⁵ E. Miyamoto, J. F. Kuo, P. Greengard, *J. Biol. Chem.*, 244, 6395 (1969). ⁶ J. F. Kuo, P. Greengard, *J. Biol. Chem.*, 245, 16 4067 (1970). ⁷ J. F. Kuo, P. Greengard, *J. Biol. Chem.*, 244, 3417 (1969). ⁸ A. Kumon, H. Yamamura, Y. Nishizuka, *Biochem. Biophys. Res. Com.* 41, 1290 (1970). ⁹ D. A. Walsh, J. P. Perkins, E. G. Krebs, *J. Biol. Chem.*, 243, 3763 (1968). ¹⁰ T. A. Langan, *Science*, 162, 579 (1968). ¹¹ E. Miyamoto, J. F. Kuo, P. Greengard, *Science*, 165, 63 (1969). ¹² J. F. Kuo, P. Greengard, *J. Biol. Chem.*, 245, 2493 (1970). ¹³ J. F. Kuo, G. R. Wyatt, P. Greengard *J. Biol. Chem.*, 246, 7159 (1971). ¹⁴ A. A. Гагоян, Б. Я. Гургуц, *Вопр. биох. мозга*, Изд. АН Арм. ССР, 12, 1976. ¹⁵ J. F. Kuo, B. K. Krueger, J. R. Sanes, P. Greengard, *Biochem. Biophys. Acta*, 212, 79 (1970). ¹⁶ O. H. Lowry, *et al.* *J. Biol. Chem.*, 193, 265 (1951). ¹⁷ J. J. Witt, R. Roskoski *Anal. Biochem.*, 66, 253 (1975). ¹⁸ Y. Takai, *et al.* *J. Biol. Chem.*, 250, 4690 (1975). ¹⁹ J. F. Kuo, P. Greengard, *Methods in Enzymology*, 38, part c, Acad. Press, New York (1974). ²⁰ Tetsufumi Ueda, S. A. Rudolf, P. Greengard, *Archives of Biochem. and Biophys.*, 170, 492 — 503, 1975.