

УДК 577.17

БИОХИМИЯ

Член-корреспондент АН Армянской ССР А. А. Галоян
 Б. Я. Гурвиц

Конкуренция между нейрогормоном «С» и 3',5'-циклической АМФ
 за цикло-АМФ-связывающие белки

(Представлено 18/VI 1977)

Многочисленные исследования показали способность цАМФ специфически связываться с цАМФ-зависимыми протеинкиназами (ПК) (¹⁻⁴), а также с так называемыми связывающими белками (СБ) цитоплазматических и микросомальных фракций коры надпочечника крупного рогатого скота (⁵), скелетной мышцы (⁶) и других тканей.

Было высказано предположение (^{5,7-9}) об идентичности связывающего цАМФ начала с ПК, вернее с их регуляторными субъединицами. Г. Н. Гилл и Л. Д. Гаррен (⁵) в результате выделения ПК из коры надпочечника крупного рогатого скота и ее 50-кратной очистки, а также 200-кратной очистки СБ из той же ткани, показали аналогичную специфичность их связывания с нуклеотидами. Кроме того, А. Г. Гилманом (⁶) было проведено сравнительное исследование активности ПК и связывающей активности фракций, выделенных из скелетной мышцы быка на различных стадиях очистки. Полученные им данные свидетельствуют о соответствии величины связывания и активности ПК.

Однако факт полной идентичности ПК и СБ окончательно не установлен. Более того, получены доказательства гетерогенности связывающих центров на одном или нескольких СБ. Сродство высокоочищенных ПК к цАМФ часто оказывается более низким по сравнению с СБ (¹⁰).

Какова биологическая функция этих белков? Ограничивается ли роль цАМФ в регуляции активности ПК действием в качестве аллостерического эффектора или связывание цАМФ с сопутствующими ПК белками имеет какое-либо особое значение? Участвуют ли данные белки в системе передачи гормонального импульса?

Исследования влияния коронароактивных нейрогормонов К, С, Г, выделенных из гипоталамуса крупного рогатого скота (¹¹) на активность цАМФ-зависимой ПК показали значительное ингибирование каталитической активности ПК в их присутствии.

Мы попытались выяснить, действует ли нейрогормон «С», один из вновь открытых нейрогормонов, на связывание цАМФ с различными СБ, предполагая способность нейрогормона «С» конкурировать с цАМФ за центры связывания.

Нами были использованы различные связывающие белки: высокоочищенные стандартные препараты, выделенные из скелетной мышцы (AMP assay kit фирмы Amersham, Англия) и коры надпочечника крупного рогатого скота (фирмы ВДН, Англия), а также аналогичный препарат, выделенный нами из той же ткани по методу Brawn-a (¹²) следующим образом. Надпочечники крупного рогатого скота быстро собирали на мясокомбинате в сосуд со льдом. Коровый слой отделяли от мозгового при 4°C, измельчали и гомогенизировали в микроизмельчителе тканей в 1,5 объемах раствора (+4°), содержащего 0,25 М сахарозу, 50 mM трис-HCl буфер (pH 7,4), 2,5 mM KCl и 50 mM MgCl₂. Гомогенат центрифугировали при 2000 xg в течение 5 минут и супернатант подвергали вторичному центрифугированию при 5000 xg в течение 15 минут. Супернатант хранили в малых порциях по 0,5—1 мл при -20°C, (незначительная потеря активности ПК наблюдалась лишь по истечении 3-х месяцев хранения). Полученные порции разводили непосредственно перед опытом в 50 mM трис-HCl буфере (pH 7,5), содержащем 3 М теofilлин и 6 mM 2-меркаптоэтанол.

Препарат из коры надпочечника фирмы ВДН представлял собой более очищенную фракцию по сравнению с полученной нами, что отразилось на его связывающей активности и лучшей воспроизводимости результатов.

Суть этого метода заключается в том, что определяется связывание меченого 8-³H цАМФ с СБ в процессе инкубации при 0°C. Отделение связанного 8-³H цАМФ от свободного нуклеотида осуществляли с помощью адсорбции последнего на активированном угле с последующим центрифугированием и счетом радиоактивности на жидкостных сцинтилляционных спектрометрах (фирмы «Interteknik») типа SL-40 (Франция).

Инкубационная смесь (0,2 мл) содержала 0,05 мл ³H цАМФ (1 пМ, 0,025 мккюри), 0,05 мл нейрогормона «С» в различных концентрациях или 0,05 мл бидистиллята и 0,1 мл связывающего белка. Нейрогормон «С» присутствовал в инкубационных пробах в указанном объеме в следующих концентрациях 0,28, 0,14 и 0,09 единиц*.

По истечении 1,5 часов инкубации, устанавливалось устойчивое равновесие, при котором около 20—25% содержащегося в пробе количества ³H-цАМФ оказывалось в связанном состоянии. Равновесие частично сдвигается лишь через 5 часов инкубации.

* Ранее нами было показано значительное ингибирование нейрогормоном «С» фосфодиэстеразы сердца и мозга крыс «in vitro» (¹³). Способность нейрогормона ингибировать фосфодиэстеразу была положена в основу определения активности нейрогормона «С». За единицу активности нейрогормона «С» принята активность препарата, ингибирующего 1 мед. фосфодиэстеразы мозга крыс в минуту при 30°C и pH 7,5.

Реакцию останавливали внесением в каждую пробу 0,1 мл суспензии 10 мг активированного угля (Norit, Extra, Glasgow, Англия) в 50 mM трис-HCl буфере, содержащем 2% бычьего альбумина. Суспензию постоянно перемешивали с помощью магнитной мешалки. Пробы встряхивали в течении 2-х минут, центрифугировали при 2000 xg (15 мин, 4°C) и 0,1 мл супернатанта быстро помещали в сцинтилляционные кюветы с 5 мл диоксанового сцинтиллятора для счета радиоактивности связанного ^3H -цАМФ. В качестве контроля связывания использовали пробы, не содержащие связывающего белка. Для определения первоначального уровня радиоактивности на счет отбирали 0,05 мл контрольных проб, содержащих 0,3 мл буфера и 0,05 мл ^3H -цАМФ.

Кроме указанных применяли следующие препараты: меченый и немеченый цАМФ из «сАМФ assay kit», фирмы Amersham (Англия), теofilлин и бычий альбумин, фракция V, фирмы Sigma (США) и др.

На рис. 1 показано, что в присутствии нейrogормона «С» наблюдается значительное снижение счета радиоактивности ^3H -цАМФ, связанного с различными связывающими белками. Эффект уменьшается при снижении концентраций нейrogормона «С» в инкубационной смеси

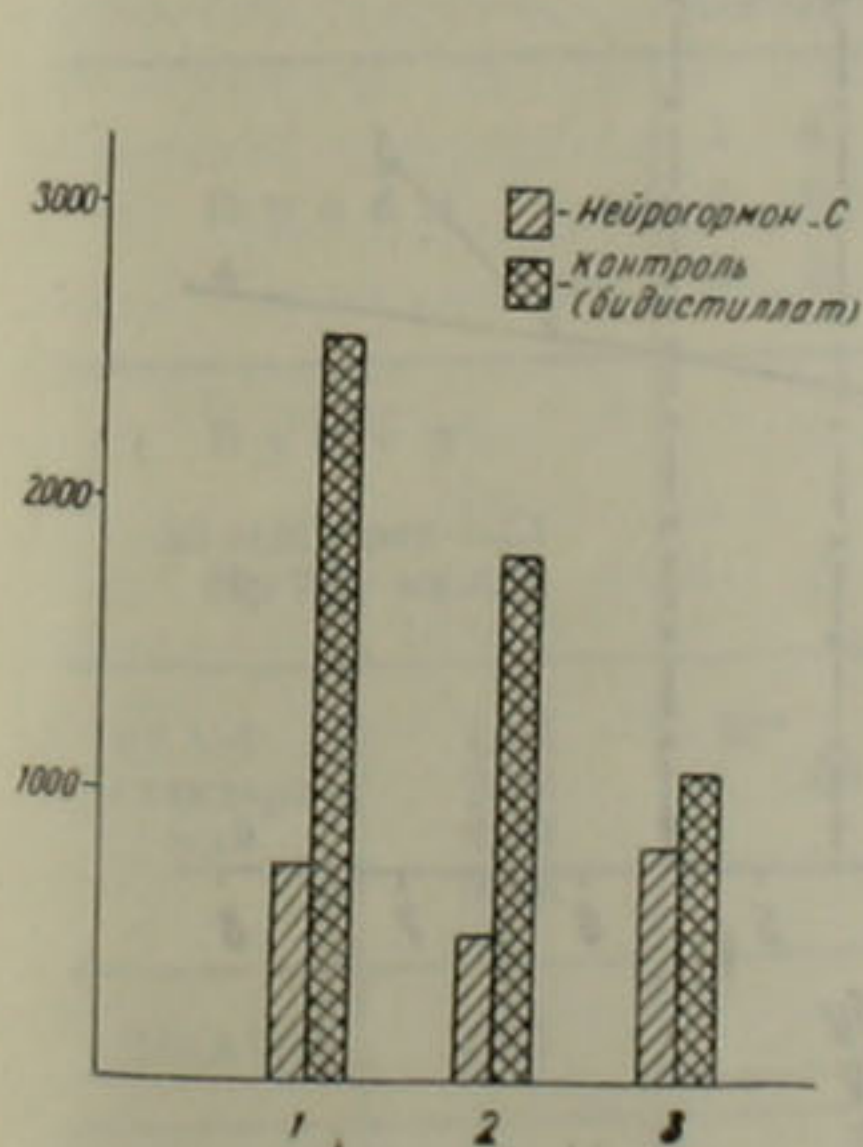


Рис. 1. Влияние нейrogормона «С» на связывание ^3H -цАМФ связывающими белками:

1—связывающий белок из коры надпочечника быка (фирмы ВДН); 2—связывающий белок скелетной мышцы быка (фирмы Amersham); 3—связывающий белок из коры надпочечника быка, выделенный в данном эксперименте. Содержание нейrogормона «С» в опытах с 1 и 2—0,28 ед. в опытах с 3—0,09 ед. На оси ординат— ^3H -цАМФ, связанный, имп./мин

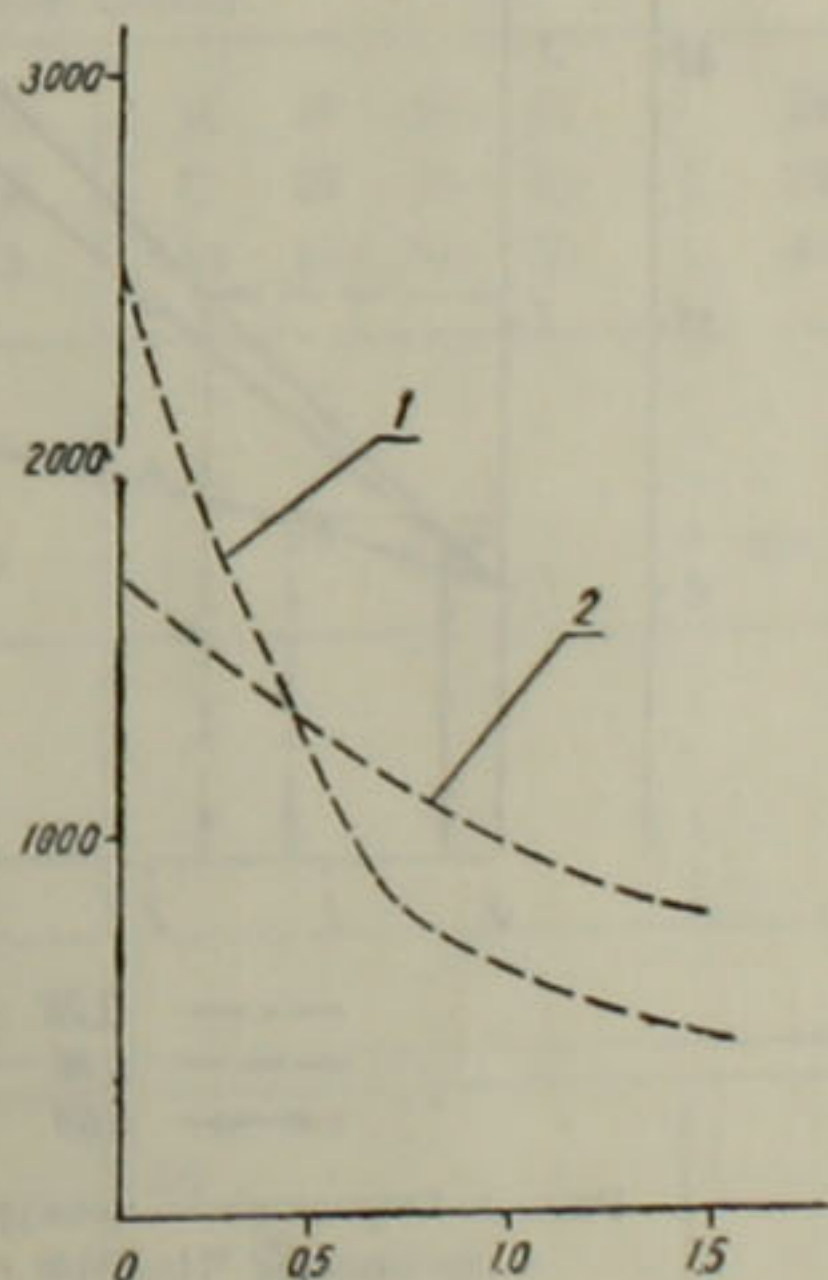


Рис. 2. Зависимость конкурентного действия нейrogормона «С» от его содержания в инкубационной смеси:

1—связывающий белок из коры надпочечника быка (фирмы ВДН); 2—связывающий белок из скелетной мышцы быка (фирмы Amersham); На оси абсцисс—содержание нейrogормона «С» в инкубационной смеси, ед. На оси ординат— ^3H -цАМФ, связанный, имп./мин

(рис. 2). Возможно также определить количественное содержание этих функциональных групп в исходном препарате нейrogормона «С» путем введения в инкубационную смесь немеченого цАМФ различных концентраций, который конкурируя с ^3H цАМФ, способствует снижению количества ^3H цАМФ, связанного со связывающим белком. Количество конкурентоспособных функциональных групп нейrogормонов «С» можно определить в соответствии с концентрацией немеченого цАМФ, вызывающего аналогичное ингибирование связывания ^3H цАМФ.

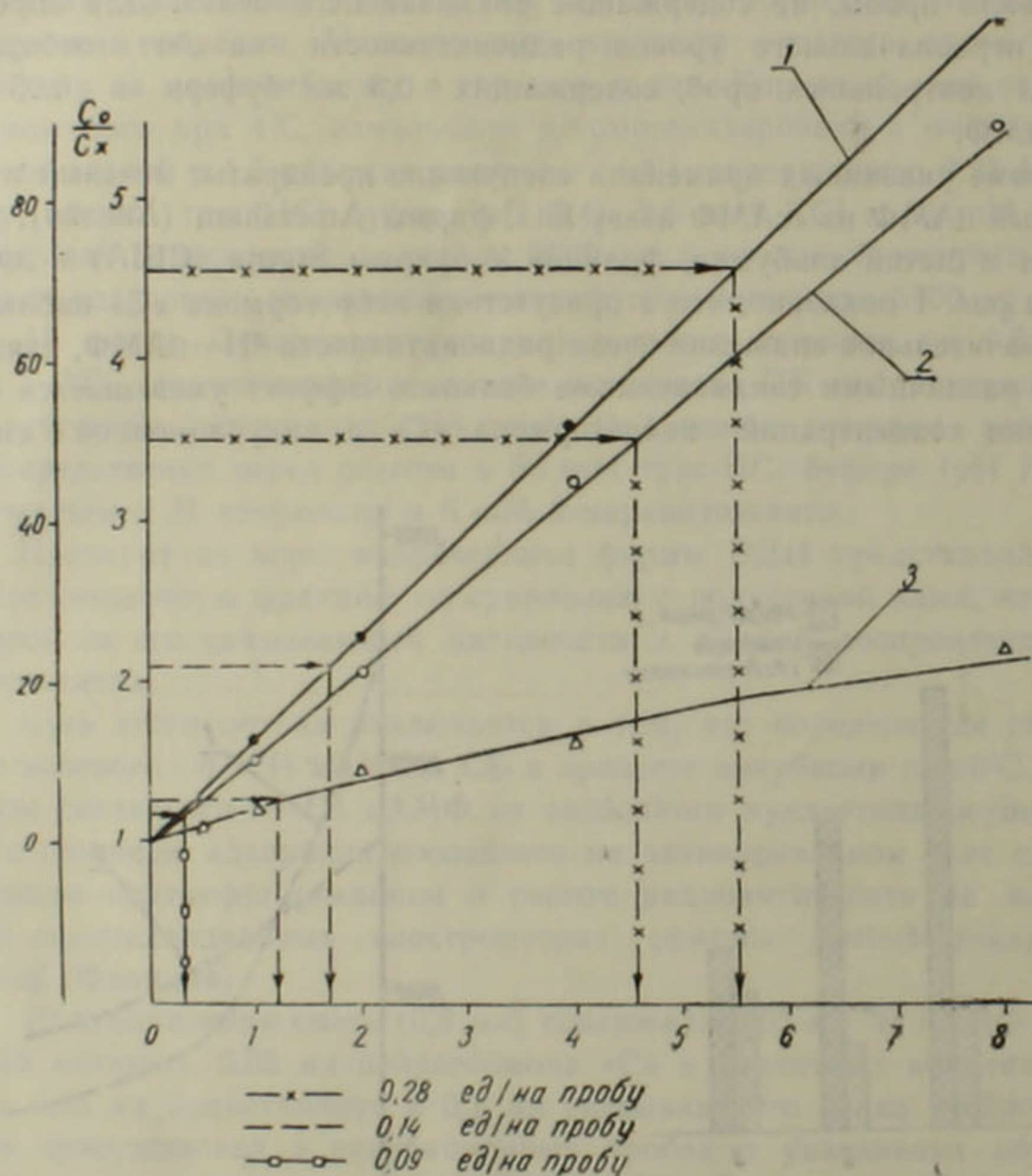


Рис. 3. Определение конкурентного действия нейrogормона «С» на связывание ^3H цАМФ с помощью калибровочных кривых:

1—связывающий белок из коры надпочечника быка (фирмы ВН);
 2—связывающий белок из скелетной мышцы быка (фирмы Amer-sham); 3—связывающий белок из коры надпочечника быка, выделенный в данном эксперименте.

C_0 —средний счет радиоактивности связанного ^3H цАМФ (имп./мин) в отсутствии немеченого цАМФ; C_x —средний счет радиоактивности связанного ^3H цАМФ (имп./мин) в присутствии конкурирующих агентов (цАМФ или нейrogормон «С»). На оси абсцисс—количество стандартного цАМФ в инкубационной смеси, пМ. На оси ординат—цАМФ, вытесненный из связывающих белков, %

Для проведения данного исследования в инкубационную смесь вводили немеченый цАМФ в различных концентрациях в соответствии со схемой, изображенной в табл. 1. По данным этой таблицы построено семейство калибровочных кривых зависимости количества связанного с различными связывающими белками ^3H -цАМФ от концентрации немеченого цАМФ (рис. 3). Результат представлен в виде C_0/C_x , где C_0 —средний счет радиоактивности связанного ^3H -цАМФ (имп./мин) в отсутствии немеченого цАМФ, а C_x —средний счет радиоактивности связанного ^3H -цАМФ (имп./мин) в присутствии конкурирующих агентов, а именно, цАМФ в различных концентрациях, а также нейrogормона «С». Эффект нейrogормона «С» показан на рис. 3 стрелками.

Пользуясь калибровочными кривыми, можно определить то количество немеченого цАМФ, которое вызывает конкурирующее действие, аналогичное соответствующему эффекту нейrogормона «С». Возможно, однако, что нейrogормон «С» осуществляет свое влияние через активные центры, отличные от центров связывания цАМФ. Этот вопрос подлежит дальнейшему исследованию.

Таблица 1

Схема эксперимента по определению калибровочной кривой связывания цАМФ и действия нейrogормона «С».
(состав инкубационной смеси)

П р о б ы		1	4	7	10	13	16	19	22	25	28
		2	5	8	11	14	17	20	23	26	29
		3	6	9	12	15	18	21	24	27	30
Б у ф е р											
50 mM трис-HCl pH 7,5; мкл.		50									
цАМФ стандарт- ный	1пМ 2пМ 4пМ 8пМ	50*	50	50	50						
^3H цАМФ	1пМ	50									
Нейrogор- мон «С»	1,5 ед. 0,75 ед. 0,5 ед.						50	50	50		
Бидистиллат									50		
Связывающий белок		100									

* Количества представлены в микролитрах.

На основании наших данных можно заключить, что нейрогормон «С» в количестве 0,28 ед. на пробу, оказывает такое же действие на процесс связывания, какое характерно для 4—6 пМ цАМФ, эффект 0,14 ед. на пробу нейрогормона «С» подобен эффекту 1+1,75 пМ цАМФ, а 0,09 ед. на пробу нейрогормона «С» можно сравнить с действием цАМФ в количестве, меньшем 1 пМ. Для различных связывающих белков результаты оказались аналогичными, что позволяет предположить одинаковый механизм действия на них нейрогормона «С».

В исследуемой нами системе конкурентное влияние на специфическое связывание цАМФ со связывающими белками наблюдается со стороны циклических нуклеотидов. Наибольший эффект проявляет циклический 3',5'-инозинмонофосфат в концентрации, соизмеримой с концентрацией цАМФ. Конкуренция других циклических 3',5'—нуклеотидов проявляется при значительно больших концентрациях. С другой стороны, циклические 2', 3'-АМФ, 5'-АМФ, АТФ и АДФ в количестве 1 мкМ не влияют на связывание цАМФ (^{14,15}). Можно предположить, что специфичность связывания заключена именно в 3',5'-кольце циклических нуклеотидов. Вопрос о том, содержит ли нейрогормон «С» циклические или другие конкурентоспособные группы, можно ответить лишь после расшифровки первичной структуры нейрогормона.

Наши опыты показывают (неопубликованные данные), что нейрогормон «С» конкурирует с цАМФ за цАМФ-зависящую протеинкиназу ПК (за регуляторную единицу). Этот гормон ингибирует активность ПК. Имеются различные факторы, подавляющие активность ПК (^{16,17}). Обнаруженный Wolff-ом гомогенный кислый белок из мозга свиньи, связывающий ионы Ca^{++} , является мощным ингибитором связывания цАМФ с ПК (¹⁸). NaCl, KCl, $(NH_4)_2SO_4$ Mg АТФ ионы Fe^{+++} в определенных условиях снижают сродство ПК к цАМФ (¹⁰).

С другой стороны, эффект диссоциации ПК на субъединицы усиливается под действием низких концентраций гистона (^{19,20}) и протамина (²¹). Было показано, что термостабильный белок, ингибитор цАМФ-зависимой ПК, выделенной из скелетной мышцы быка (⁶), бычий альбумин (²²) и многие другие белки способствуют активации связывания цАМФ.

Следует отметить, что в основе физиологического влияния нейрогормона «С» лежит интенсификация гликолитических процессов, особенно, в сердечной мышце, увеличение фосфорилазной активности, расщепления гликогена, накопление лактата и т. д. (^{23,24}). Обнаруженное нами ингибирование фосфодиэстеразы под действием нейрогормона «С» (¹³) позволяет предположить, что данные процессы осуществляются при участии цАМФ.

Как видно из наших данных, нейрогормон «С» активирует гликогенолиз путем активирования фосфорилазы сердца. С другой стороны, это вещество ингибирует цАМФ-зависящую протеинкиназу мозга. Если учесть, что фосфорилаза также активируется киназами, то как-будто имеется парадоксальное явление. Однако можно полагать, что цАМФ-

зависящая киназа киназы фосфорилазы б и цАМФ-зависящие протеинкиназы мозга являются различными ферментами. С другой стороны, надо учесть, что в изучаемой реакции субстратом фосфорилирования нами использован гистон или протамин. В дальнейших наших исследованиях предстоит выяснить эффект прямого действия нейrogормона «С» на различные протеинкиназы и на киназы фосфорилазы. Можно предположить, что ингибирование нейrogормоном «С» связывания цАМФ со связывающими белками или с холоферментом ПК приводит к стабилизации ПК, выраженной в блокировании диссоциации фермента на субъединицы, а следовательно, и в блокировании его каталитической активности.

По-видимому, при чрезмерном возрастании уровня цАМФ под влиянием нейrogормона «С» срабатывает механизм обратной связи—путем ингибирования активности ПК.

Не исключена возможность неспецифического связывания нейrogормона «С» с СБ, подобно тому, как нейrogормон «С» связывается с белками-носителями гипоталамуса (25).

Институт биохимии

Академии наук Армянской ССР

Հայկական ՍՍՀ ԳԱ բրադից-ադամ
Ա. Ա. ԳԱԼՅԱՆ, Բ. ՅԱ. ԳՈՒՐՎԻՑ

Նեյրոհորմոն «С»-ի և ցիկլո-ԱՄՖ մրցակցությունը ցիկլո-ԱՄՖ կապող սպիտակուցների համար

Սույն հետազոտությամբ մեր առջև խնդիր է դրված եղել պարզելու՝ գոյություն ունի արդյոք նեյրոհորմոն «С»-ի և ցիկլո-ԱՄՖ-ի միջև մրցակցություն ցիկլո-ԱՄՖ կապող սպիտակուցների համար: Հետազոտությունները պարզեցին, որ նեյրոհորմոն «С»-ի ներկայությամբ ցիկլո-ԱՄՖ-ի քանակը պրոտեին կինազայի կանոնավորող միավորի, ինչպես նաև կապող սպիտակուցի վրա խիստ պակասում է: Նշված մրցակցությունը գնում է հավանորեն մոլեմոլ հարաբերությամբ: Միաժամանակ պարզվել է, որ «С» նյութը ճնշում է ցիկլո-ԱՄՖ կախյալ հիստոն կինազայի ակտիվությունը: Ենթադրվում է, որ «С» նյութը բջջի ներսում կանոնավորում է ցիկլո-ԱՄՖ-ի ազդեցության ուղղությունը:

ЛИТЕРАТУРА — ԳՐԱԿԱՆՈՒԹՅՈՒՆ

- ¹ D. A. Valsh, J. P. Perkins et al., J. Biol. Chem., 243, 3763 (1968).
- ² T. A. Langan, Science, 162, 579 (1968).
- ³ E. Miyamoto, J. F. Kuo et al., J. Biol. Chem., 244, 6395 (1969).
- ⁴ J. F. Kuo, P. Greengard, Proc. Nat. Acad. Sci., 64, 1349 (1969).
- ⁵ G. N. Gill, L. D. Garren, Biochem. Biophys. Res. Comm., 39, 335 (1970).
- ⁶ A. G. Gilman, Proc. Nat. Acad. Sci., 67, 305 (1970).
- ⁷ C. O. Brostrom, E. M. Reimann et al.,

Advances in Enzyme Regul., 8, 191 (1970). ⁸ E. M. Reimann, C. O. Brostrom et al., Biochem. Biophys. Res. Comm., 42, 187 (1971). ⁹ J. Ehrlichmann, A. H. Hirsch et al., Proc. Nat. Acad. Sci., 68, 731 (1971). ¹⁰ C. O. Brostrom, C. Kon, Annal. Biochem., 58, 459 (1964). ¹¹ А. А. Галоян, Некоторые проблемы биохимии гипоталамической регуляции. Изд. Айастан, Ереван, 1965. ¹² B. L. Brown, J. D. H. Albano et al., Biochem. J., 121, 561 (1971). ¹³ А. А. Галоян, Б. Я. Гурвиц и др., Вопросы биохимии мозга, 11, 86 (1967). ¹⁴ H. V. Fisch, V. Pliska et al., Eur. J. Biochem., 30, 1 (1972). ¹⁵ G. N. Gill, L. D. Garren, Proc. Nat. Acad. Sci., 63, 512 (1969). ¹⁶ C. D. Ashby, D. A. Walsh, J. Biol. Chem., 247, 6637 (1972). ¹⁷ G. G. Majumler, Biochem. Biophys. Res. Comm., 58, 756 (1974). ¹⁸ D. J. Wolff, F. L. Siegel, J. Biol. Chem., 247, 4180 (1972). ¹⁹ E. Miyamoto, G. L. Petzold et al., Biochem. Biophys. Res. Comm., 44, 2 (1971). ²⁰ E. M. Reimann, D. A. Walsh et al., J. Biol. Chem., 246, 1986 (1971). ²¹ E. Miyamoto, G. L. Petzold, Biochem. Biophys. Res. Comm., 44, 305 (1971). ²² A. G. Gilman, Advances in Cyclic Nucl. Res., 2, 9 - (1972). ²³ А. А. Галоян, С. С. Алексанян, и др. ДАН Арм. ССР, т. 60, 2, 117(1975). ²⁴ С. С. Алексанян, А. А. Галоян, ДАН Арм. ССР, т. 60, 5, 293(1975). ²⁵ А. А. Галоян, ДАН Арм. ССР, т. 38, 305(1964).