

УДК 577.17

БИОХИМИЯ

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

О действии тиреолиберина и люлиберина на цАМФ-зависимую
 протеникиназу мозга

(Представлено 25/VII 1980)

Работами ряда авторов показано наличие цАМФ-зависимой протеникиназы в большинстве тканей млекопитающих: мышце, печени, мозге, жировой ткани и др. (1-3). Грингардом и соавторами была выдвинута гипотеза о том, что все эффекты цАМФ в клетках эукариот связаны с активирующим действием этого нуклеотида на цАМФ-зависимую протеникиназу (4).

Обнаружение этого фермента в мозге млекопитающих выдвинуло важные вопросы, касающиеся его роли в нейрональной, нейроэндокринной и других функциях мозга.

В настоящее время известно, что действие многих гормонов осуществляется через систему циклических нуклеотидов. В частности, работами ряда исследователей (5-8) показано, что гипоталамический трипептид тиреолиберин (ТРГ) повышает концентрацию цАМФ в аденогипофизе. Синтетический люлиберин (ЛРГ) также увеличивает концентрацию цАМФ и стимулирует таким образом освобождение соответствующих гормонов в аденогипофизе (9). Более того, этими же авторами показано, что только те из испытанных аналогов ЛРГ приводят к высвобождению гормонов аденогипофиза, которые увеличивают содержание цАМФ в этой ткани.

В настоящей работе предпринята попытка изучения действия ТРГ и ЛРГ на частично очищенную цАМФ-зависимую протеникиназу мозга быка *in vitro*, а также воздействия ТРГ на этот фермент из мозга крыс *in vivo*.

Частично очищенная цАМФ-зависимая протеникиназа была получена нами по методу Грингарда из мозга быка (4,11). Протеникиназу из мозга крыс получали следующим образом: крысу обезглавливали, извлекали мозг и гомогенизировали его в 5 объемах 10 мМ К-фосфатного буфера рН 7,2, содержащего 5 мМ ЭДГА. Гомогенат центрифуги-

ровали 20 мин при 10 000 г. Супернатант использовали в качестве источника протеникиназы. Все операции проводили при 4°C.

Принцип определения ферментативной активности основан на измерении количества радиоактивного ^{32}P , переносимого с $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-АТФ}$ на гистон смесь тимуса телянка. При этом инкубационная смесь в общем объеме 0,2 мл содержала следующие компоненты в микромолях: трис-НСI буфер (pH 7,4)—10, хлористый магний—2, дитиотрейтол—0,2, теofilлин—0,4, ЭГТА—0,06, цАМФ—0,5, гистон тимуса телянка—200 мкг, определенное количество фермента и 5 мкмоль $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-АТФ}$ ($1\text{-}5 \times 10^5$ цмп/мин). Смесь инкубировали на водяной бане при 30°C в течение 5 мин. Дальнейшие процедуры описаны нами ранее (11).

За единицу энзимной активности принимали такое количество энзима, которое переносит 1 ликомоль ^{32}P от $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-АТФ}$ на гистон за 5 мин при 30°C в стандартной испытуемой системе.

Счет радиоактивности производили в жидкостном сцинтилляционном спектрометре марки Inter technique SL-30.

Белок определяли по методу Лоури, используя в качестве стандарта бычий сывороточный альбумин.

ЛРГ вносили в инкубационную смесь в количестве от 1 до 10 мкг, ТРГ—от 0,2 до 1,2 мкг. Крысам ТРГ вводили внутрибрюшинно в дозе 30 мкг/мл на животное. Контрольным животным вводили физиологический раствор. Крыс обезглавливали через 30 мин после введения и определяли протеникиназную активность.

Нами измерялась протеникиназная активность в присутствии цАМФ и в отсутствии циклического нуклеотида. Величина отношения этих двух измеренных активностей фермента ($-\text{цАМФ}/+\text{цАМФ}$) характеризует степень его активирования под действием цАМФ (12).

Полученные результаты по действию ЛРГ на активность протеникиназы *in vitro* приведены в табл. 1. Как видно из таблицы, ЛРГ повышает отношение $-\text{цАМФ}/+\text{цАМФ}$ в концентрации 3 и 5 мкг на пробу (10^{-5} и 10^{-4} М), что свидетельствует об активации фермента. Другие использованные нами концентрации гормона не приводят к заметным изменениям по сравнению с контролем.

Таблица 1

Влияние ЛРГ на активность цАМФ-зависимой протеникиназы *in vitro*

ЛРГ, мкг	Активность протеникиназы в пмолях включенного ^{32}P		$\frac{-\text{цАМФ}}{+\text{цАМФ}}$
	$+\text{цАМФ}$	$-\text{цАМФ}$	
Контроль	200,1 ± 14,2	82,9 ± 6,7	0,41 ± 0,07
1	204,3 ± 15,4	84,3 ± 8,5	0,41 ± 0,05
2	196,5 ± 11,3	86,4 ± 7,1	0,43 ± 0,02
3	213,7 ± 12,6	95,1 ± 5,4	0,44 ± 0,02
5	194,7 ± 18,2	98,8 ± 8,7	0,50 ± 0,07
10	205,5 ± 18,8	80,7 ± 6,3	0,42 ± 0,03

Данные по воздействию ТРГ на протеникиназную активность *in vitro* приведены в табл. 2. Активность фермента в присутствии цАМФ остается неизменной при всех концентрациях ТРГ. В отсутствие же цАМФ мы наблюдаем повышение, составляющее 30% по сравнению с контролем без добавления гормона. Величина отношения активностей —цАМФ/+цАМФ при этом возрастает от 0,4 в контроле до 0,52, когда содержание ТРГ в пробе равно 1,2 мкг ($2 \cdot 10^{-4}$ М).

Полученные нами данные по воздействию ЛРГ и ТРГ на активность протеникиназы из мозга крупного рогатого скота *in vitro* показывают, что эти релизинг гормоны в концентрации 10^{-5} — 10^{-6} М воздействуют на активность фермента, активируя его. В целом полученные результаты находятся в соответствии с результатами уже имеющихся немногочисленных исследований, проведенных на отдельных участках мозга. Так, показано, что в присутствии цАМФ эти гормоны в концентрации 10^{-6} — 10^{-5} М не влияют на активность фермента. вы-

Таблица 2

Влияние ТРГ на активность протеникиназы *in vitro*

ТРГ, мкг	Активность протеникиназы в пмолях включенного 32 P		$\frac{-\text{цАМФ}}{+\text{цАМФ}}$
	+цАМФ	-цАМФ	
Контроль	204.0±19.8	83.2±5.5	0.40±0.07
0.2	206.3±19.5	99.4±6.4	0.48±0.02
0.4	190.4±17.3	97.6±4.5	0.51±0.06
1.2	206.5±16.2	108.7±7.4	0.52±0.05

Таблица 3

Влияние ТРГ на активность цАМФ-зависимой протеникиназы *in vivo*

Количество фермента на пробу, мкг	Протеникиназная активность в пмолях включенно 32 P			
	Контроль		Опыт	
	+цАМФ	-цАМФ	+цАМФ	-цАМФ
66	135.2±20.4	121.3±12.5	137.7±21.2	117.7±10.3
88	100.5±10.2	79.1±6.4	135.7±20.5	122.3±11.2
110	104.7±9.8	107.3±8.5	146.2±19.1	115.9±8.3
132	82.0±5.6	83.1±5.4	133.7±17.4	117.3±8.7

деленного из гипоталамуса (13). При этом ферментативная активность в отсутствие цАМФ не определялась. Другими авторами показано, что при действии 3 мкМ ТРГ на протеникиназу из гомогената культуры клеток гипофиза, продуцирующих пролактин, происходит повышение величины отношения активностей от 0,5 до 1,0, что указывает на полную активацию фермента в гомогенате. Авторы отмечают, что изменений в активности протеникиназы в присутствии цАМФ нет (14).

Результаты экспериментов по действию ТРГ *in vivo* даны в табл. 3. В контрольных опытах с повышением концентрации фермента в гомогенате наблюдается падение протеникиназной активности мозга крыс на 40%. Это уменьшение, по-видимому, является следствием наличия значительных количеств термостабильного белкового ингибитора протеникиназы в мозговой ткани (^{15,16}). Аналогичное падение ферментативной активности на 40% наблюдалось при действии 20 мкг ингибитора, полученного из мозга крыс, на гомогенат из той же ткани. Как видно из табл. 3, при введении животным 30 мкг ТРГ торможение протеникиназной реакции снимается как в присутствии, так и в отсутствии цАМФ. Возможно, это и является следствием действия ТРГ на термостабильный ингибитор протеникиназы, который под действием гормона не производит более своего тормозящего действия. В настоящее время этот ингибитор рассматривается как один из внутриклеточных регуляторов активности протеникиназы, при изменении активности и синтеза которого, по-видимому, осуществляется действие ряда гормонов (¹⁷⁻¹⁹).

Институт экспериментальной биологии
Академии наук Армянской ССР

Գ. Ա. ՍԱՐԻՔԵԿՅԱՆ, Ա. Ս. ԿՐԱԿՈՍՈՎԱ.

Հայկական ՍՍՀ ԳԱ բրտակից-անգամ Ա. Ա. ԳԱՆՈՅԱՆ

Տիրեուլիբերինի և լյուլիբերինի ազդեցությունը 3,5-ցիկլիկ ԱՄՖ-կախյալ պրոտեինկինազայի վրա

Ուսումնասիրվել է տիրեուլիբերինի և լյուլիբերինի ազդեցությունը *in vitro* պայմաններում ցիկլիկ ԱՄՖ-կախյալ պրոտեինկինազայի վրա: Ցույց է տրված, որ օգտագործված կոնցենտրացիաներով լյուլիբերինը ազդում է այս ֆերմենտի ակտիվության վրա: Տիրեուլիբերինը նույնպես բարձրացնում է պրոտեինկինազային ակտիվությունը մինչև 30% ցիկլիկ ԱՄՖ-բացակայության պայմաններում:

Ցույց է տրված նաև, որ տիրեուլիբերինի ներարկումից հետո սպիտակ առնետների ուղեղի հոմոդենատում տեղի է ունենում պրոտեինկինազային ակտիվության բարձրացում՝ կախված ֆերմենտի քանակից:

Հնարավոր է, որ այդ ակտիվացումը պայմանավորված է տիրեուլիբերինի ազդեցությամբ ցիկլիկ ԱՄՖ-կախյալ պրոտեինկինազային ինհիբիտորի ակտիվությամբ:

ЛИТЕРАТУРА — ԿՐԱԿԱՆՈՒԹՅՈՒՆ

- ¹ D. A. Walsh, J. P. Perkins, E. G. Krebs, J. Biol. Chem., vol. 243, 3763 (1968).
² T. A. Langan, Science, vol. 162, 579 (1968). ³ E. Miyamoto, J. F. Kuo, P. Greengard, Science, vol. 165, 63 (1969). ⁴ E. Miyamoto, J. F. Kuo, P. Greengard, J. Biol. Chem., vol. 244, 6395 (1969). ⁵ J. D. Corbin, E. G. Krebs, Biochem. Biophys. Res. Commun., vol. 36, 328 (1969). ⁶ J. F. Kuo, P. Greengard, J. Biol. Chem., vol. 244,

3417 (1969). ⁷ C. Y. Bowers, Ann. N. Y. Acad. Sci., vol. 185, 233 (1971). ⁸ C. Y. Bowers, H. O. Frieden, P. Huang et al. Biochem Biophys Res. Commun. vol. 45, 1033 (1971). ⁹ F. Labrie, P. Borgeat, A. Lemaire, Advances in Cyclic Nucleotide Research, vol. 5, 787 (1975). ¹⁰ T. Kaneko, H. Oka, M. Minoura, Psychoneuroendocrinology, vol. 267 (1974). ¹¹ A. C. Курякова, Г. А. Сарибекли, Т. Х. Марукун, А. А. Галюки, ДАН Арм.ССР, т. 64, №5 (1977) ¹² J. D. Curbin, T. R. Soderling, C. R. Park, J. Biol. Chem. vol. 248, 1913 (1973). ¹³ J. F. McKelvey, Biochem. Biophys. Res. Commun., vol. 65, № 1 (1975) ¹⁴ K. M. Gaultik, E. Walaas, O. Walaas, Biochem J., vol. 162, № 2 (1973). ¹⁵ D. A. Walsh, C. D. Ashby, C. Gonzalez et al., J. Biol. Chem. vol. 246, № 7 (1971). ¹⁶ C. D. Ashby, D. A. Walsh, J. Biol. Chem., vol. 247, № 20 (1972). ¹⁷ J. S. Tash, J. R. Dedman, A. R. Means, J. Biol. Chem., vol. 254, № 1 (1979). ¹⁸ J. Kruh, L. Tichonickv, Eur. J. Biochem., vol. 62, 109 (1976) ¹⁹ O. Walaas, E. Walaas, G. Gronnerod, Eur. J. Biochem., vol. 40, 465 (1973).