

УДК 577.17

БИОХИМИЯ

Г. А. Сарибекян

**Изучение фосфорилирования специфических белков гипоталамуса и некоторых пептидов цАМФ-зависимой протеинкиназой из мозга крупного рогатого скота**

(Представлено чл.-корр. АН Армянской ССР А. А. Галояном 25/VII 1980)

В настоящее время установлено, что действие многих гормонов осуществляется через систему циклических нуклеотидов. Схематически этот процесс можно представить в следующем виде:

гормон → повышение концентрации цАМФ → активирование цАМФ-зависимой протеинкиназы → фосфорилирование субстратов → физиологический эффект.

Известно много эндогенных субстратов для цАМФ-зависимой протеинкиназы. Ими являются некоторые ферменты (<sup>1-3</sup>), белки (<sup>4-6</sup>), пептиды (<sup>7-10</sup>). Однако механизм осуществления многообразных метаболических эффектов гормонов не выяснен окончательно. Поэтому поиск специфических субстратов для цАМФ-зависимой протеинкиназы является актуальным.

Исследованиями А. А. Галояна и др. было показано наличие специфических белков в гипоталамусе, которые являются носителями низкомолекулярных биологически активных соединений пептидного и гликозидного характера (<sup>11</sup>). Изучалось также органотропное влияние различных пептидов, продуцируемых гипоталамическими ядрами, в частности, люлиберина (ЛРГ). Показано, что ЛРГ, в свою очередь, является предшественником гексапептида и ряда фрагментов, обладающих кардиотропной активностью (<sup>12</sup>).

Исходя из вышесказанного, представляло интерес изучить фосфорилирование указанных белков и пептидов.

В настоящей работе мы испытывали в качестве субстратов фосфорилирования цАМФ-зависимой протеинкиназы ЛРГ и его фрагменты, имеющие следующую аминокислотную последовательность:

Фрагмент I: Н-сер-тир-гли-лей-арг-про-гли-NH<sub>2</sub>

Фрагмент II: Н-гис-трп-сер-тир-гли-лей-про-арг-гли-NH<sub>2</sub>

Фрагмент III: Н-трп-сер-тир-гли-лей-арг-про-гли-NH<sub>2</sub>, а также гипоталамические белки-носители нейрого르몬ов «К» (БНК) и «Г»

(БПГ),  $\beta$ -липотропный гормон и свиной адренокортикотропный гормон (АКТГ).

цАМФ-зависимая протеинкиназа из мозга быка была выделена нами и частично очищена по методу, описанному ранее (<sup>3,14</sup>). Фермент этот катализирует перенос меченого фосфатного остатка с [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]-АТФ на фосфорилируемый субстрат. Инкубационная смесь для определения протеинкиназной активности в общем объеме 0,2 мл содержала следующие компоненты в микромолях: трис-НСI буфер рН 7,4—10, хлористый магний—2, дитиотриэтол—0,2, теофиллин—0,4, ЭГТА—0,06, цАМФ—0,5, подходящее количество фермента и 5 мкмоль [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]-АТФ ( $1-5 \times 10^5$  н.м.п./мик). В качестве субстрата фосфорилирования в контрольных экспериментах использовали различные концентрации гистона тимуса телят IAS, богатого лизином. Реакцию начинали добавлением [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]-АТФ. Смесь инкубировали на водяной бане при 30°C в течение 5 мин. Реакцию останавливали добавлением 2 мл 5% ТХУ, содержащей 0,25% вольфрамат натрия и 0,006 н. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Фосфорилированный белок выделяли из раствора, как описано ранее (<sup>13,14</sup>). Подсчет радиоактивности производили в жидкостном сцинтилляционном спектрометре Inter technique SL-30. За единицу энзимной активности принимали такое количество фермента, которое переносит 1 п.моль <sup>32</sup>P от [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]-АТФ на субстрат за 5 мин при 30°C в стандартной испытываемой системе.

Белок определяли по методу Лоури, используя бычий сывороточный альбумин как стандарт.

Используемые в качестве субстратов вещества вносили в инкубационную смесь в следующих количествах: ЛРГ—100, фрагменты ЛРГ—40, 80,  $\beta$ -липотропный гормон—40—600, АКТГ—40—600 мкг. Способность различных соединений, использованных нами в качестве субстратов фосфорилирования, служить акцепторами фосфата *in vitro*, приведена в табл. 1. Для сравнения даны результаты по фосфорилированию гистона тимуса телят, фракция IAS. Контролем служили пробы, в которых не добавлен субстрат. Из таблицы видно, что как сама молекула ЛРГ, так и ее фрагменты не подвергаются фосфорилированию при данных условиях частично очищенной протеинкиназой. Аналогичный результат получен и с белками гипоталамуса, являющимися носителями нейрогормонов «К» и «Г»,  $\beta$ -липотропным гормоном. Ни в присутствии, ни в отсутствии циклического нуклеотида они не действовали в качестве субстратов для этого фермента. В случае же АКТГ наши эксперименты показали, что эта молекула фосфорилируется цАМФ-зависимой протеинкиназой. Процесс этот зависит от наличия циклического нуклеотида. В присутствии 5 мкМ цАМФ скорость протеинкиназной реакции возрастала почти в 3,5 раза. В отсутствие цАМФ наблюдается очень слабое фосфорилирование. Концентрация АКТГ, при которой скорость реакции равна половине максимальной, составляет 80 мкг. Как видно из таблицы, скорость реакции пропорциональна концентрации АКТГ до 500 мкг, затем происходит некоторое ее снижение.

Зависимость фосфорилирования АКТГ от времени инкубации представлена в табл. 2. Максимальный уровень фосфорилирования в присутствии цАМФ достигается за 5 мин. Дальнейшая 10-минутная инкубация не приводила к изменению уровня протеинкиназной реакции. Таким образом, из соединений, использованных нами в качестве субстратов для протеинкиназы, фосфорилируется только АКТГ. Установлено, что этот фермент переносит фосфатные остатки с АТФ на молекулы серина и треонина в субстратных белках. Анализ аминокислотного состава БНК и БНГ выявил у них наличие определенного коли-

Таблица 1

Фосфорилирование различных соединений цАМФ зависимой протеинкиназой

Субстрат	Количество, мкг	Активность протеинкиназы в пикомолях включенного <sup>32</sup> P	
		+цАМФ	-цАМФ
Контроль	—	30.7	20.0
Гистон	40	217.5	85.0
	100	304.8	115.4
	200	344.7	124.2
	400	405.8	130.1
	600	400.5	128.4
ДРГ	100	48.2	40.0
Фрагмент I	40	38.6	31.4
	80	42.3	38.5
Фрагмент II	40	45.0	37.0
	80	44.7	28.5
Фрагмент III	40	37.8	29.3
	80	40.3	35.0
БНК	50	47.2	41.0
	100	54.8	42.0
БНГ	100	53.2	43.7
β-липотропин	40	38.7	23.5
	100	41.5	22.4
	200	48.8	18.2
	400	47.8	35.0
	600	48.9	27.7
АКТГ	40	80.4	30.1
	100	94.0	42.6
	150	122.3	57.5
	200	170.2	71.3
	400	206.5	67.0
	500	220.7	73.1
	600	208.5	66.8

Таблица 2

Зависимость фосфорилирования АКТГ от времени инкубации

Время инкубации, мин	Активность фермента в пикомолях включенного <sup>32</sup> P	
	+цАМФ	-цАМФ
0	10.2	8.3
1	70.5	28.1
5	164.4	53.0
10	156.7	54.6

чества остатков серина. Однако полученные нами результаты свидетельствуют об отсутствии фосфорилирования. Различными исследованиями показано, что наиболее эффективными *in vitro* субстратами являются небольшие белки — гистоны, протамины, казеин. Некоторые белки с большим молекулярным весом фосфорилируются только после сокращения нативной молекулы различными методами (15-16). Возможно, что в случае БНК и БНГ их конформация мешает фосфорилированию соответствующих остатков аминокислот. Работами других исследователей по фосфорилированию синтетических пептидов показано, что некоторые особенности первичной структуры белков имеют важное значение в определении субстратной специфичности протеинкиназы. Отмечено, что близко от фосфорилируемого серина в этих пептидах обычно находится молекула основной аминокислоты, чаще всего аргинина (17-18). Поэтому наличие лишь аминокислотных остатков, акцептирующих фосфатные группы, еще не является достаточным условием протекания киназной реакции, как это и видно на примере использованных нами соединений. В отношении БНК и БНГ можно полагать, что полученные результаты еще не доказывают, что *in vivo* эти соединения не могут фосфорилироваться, так как процесс этот в организме зависит от многих регулирующих факторов.

Показанное нами фосфорилирование АКТГ цАМФ-зависимой протеинкиназой, возможно, обусловлено как небольшими размерами молекулы этого пептида (всего 39 аминокислотных остатков), так и доступностью двух сериновых остатков, непосредственно находящихся на N-конце молекулы.

Институт экспериментальной биологии  
Академии наук Армянской ССР

Գ. Ա. ՍԱՐԻՐԵԿՅԱՆ

Հիպոքրալամնուսի սպեցիֆիկ սպիտակուցների և որոշ պեպտիդների  
ֆոսֆորիլացման ուսումնասիրությունը ~~ցիկլիկ~~ ԱՄՖ-կախյալ  
պրոտեինկինազայով

Ուսումնասիրվել է նեյրոհորմոններ «K», «G» կրող սպիտակուցների, լյուլիբերինի և նրա ֆրագմենտների, Զ-լիպոտրոպինի, ադրենոկորտիկոտրոպ հորմոնի ֆոսֆորիլացումը ցիկլիկ-ԱՄՖ-կախյալ պրոտեինկինազայով: Ցույց է տրված, որ նշված նյութերից միայն ադրենոկորտիկոտրոպինն է հանդիսանում *in vitro* սուրստրատ այս ֆերմենտի համար: ԱԿՏ-ի ֆոսֆորիլացումը կախված է ցիկլիկ ԱՄՖ-ի ներկայությունից:

5 միկրոմոլ ցիկլիկ ԱՄՖ-ը ակտիվացնում է ադրենոկորտիկոտրոպինի ֆոսֆորիլացումը 3.5 անգամ: Ինակցիան հասնում է մաքսիմում արագությանը 5 րոպեում: Այս միացության ֆոսֆորիլացումը պայմանավորված է N-տերմինալ սերինի երկու մնացորդներով:

- <sup>1</sup> K. P. Huang, F. Huang, W. H. Gilmsmann, J. C. Robinson. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 65, № 4 (1975). <sup>2</sup> O. L. Ljungström, L. Berglund, L. Engström. *Eur. J. Biochem.*, vol. 68, № 2 (1976). <sup>3</sup> S. H. Milstien, J. Abita, N. Chang, N. Kaufman. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA, N.Y.*, vol. 73 № 5 (1976). <sup>4</sup> A. T. Langan. *Ann. New York Acad. Sci.*, vol. 185, 166 (1971). <sup>5</sup> E. M. Johnson, T. Ueda, H. Marnett, P. Greengard. *J. Biol. Chem.*, vol. 247, 5650 (1972). <sup>6</sup> H. Larsson, A. Endström, M. J. Wallin. *J. of Neurochem.*, vol. 29, 115 (1977). <sup>7</sup> P. Dail, P. R. Carnegie. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 61, № 3, (1972). <sup>8</sup> S. J. Yeaman, Ph. Cohen, D. C. Watson et al. *Biochem. J.*, vol. 162, (1977). <sup>9</sup> A. H. Pomerantz, V. G. Alfrey, R. B. Merrifield. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. 74, № 10 (1977). <sup>10</sup> E. Humble, Dahlqvist-Edberg, P. Enman. *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, vol. 90, № 3 (1979). <sup>11</sup> P. Ա. Տրևկոյան, Շ. Ա. Շահյան, Ա. Ա. Գալոյան, *Вопросы биохимии мозга*, вып. 11, АН Арм. ССР Ереван (1976). <sup>12</sup> А. А. Գալոյան, *Вопросы биохимии мозга*, вып. 12, Изд-во АН Арм. ССР, Ереван (1978). <sup>13</sup> J. F. Miyamoto, E. Kuo, P. Greengard. *J. Biol. Chem.*, vol. 244, 6395 (1969). <sup>14</sup> А. С. Կիրակոսովա, Դ. А. Сарибекյան, Т. Х. Марукյան, А. А. Գալոյան. *ДАН Арм. ССР*, т. 64 № 5 (1977). <sup>15</sup> D. B. Bylund, E. O. Krebs. *J. Biol. Chem.*, vol. 250, 6355 (1975). <sup>16</sup> E. Humbl, L. Berglund, V. Titajl et al., *Biochem. Biophys. Res., Commun.* vol. 66, 614 (1975). <sup>17</sup> B. E. Kemp, D. B. Bylund, T. S. Huang. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. 72, 3448 (1975). <sup>18</sup> G. Hjelmqvist, J. Anderson, B. Edlund. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 61, 559 (1974).