НЕЙРОХИМИЯ
т. 7, № 2, 1988

УДК 616—008.939.633.2—02

О ВЗАИМОСВЯЗИ МЕЖДУ ФОСФОДИЭСТЕРАЗОЙ ЦИКЛИЧЕСКИХ НУКЛЕОТИДОВ И 5′-НУКЛЕОТИДАЗОЙ ГИПОТАЛАМУСА БЫКА

ШАРОВА Н. П., ГУРВИЦ Б. Я., ГАЛОЯН А. А.
Институт биохимии АН АрмССР, Ереван

Обнаружено, что множественные формы ФДЭ циклических нуклеотидов (КФ 3.1.4.17) и 5′-нуклеотидазы (5′-НК; КФ 3.1.3.5) из растворимых фракций гипоталамуса быка элюируются совместно на всех этапах многостадийной очистки этих ферментов, включающих ИОХ на ДЭАЭ-TSK, аффинную хроматографию на фенил-сефарозе, голубой сефарозе, cAMP-силикагеле и конканавалин А-сефарозе, гель-фильтрацию на сефакриле S-200, а также ВЭЖХ.

Показана функциональная взаимосвязь между ФДЭ и 5′-НК, проявляющаяся в эффективном ускорении суммарной реакции, катализируемой этими ферментами: cAMP→5′-AMP→аденозин.

Высказано предположение о существовании в мозгу сопряженной системы ФДЭ и 5′-НК).

Имеющиеся в литературе данные о возможности существования мультиферментной системы, катализирующей последовательное превращение cAMP→5′-AMP→аденозин→инозин, носят противоречивый характер. В 1976 г. Nakamura, выделив при помощи аффинной хроматографии на 5′-AMP-сефарозе из плазматических мембран печени крысы 5′-НК, обнаружил, что она наряду с 5′-мононуклеотидами гидролизует и фосфодиэфирную связь cAMP [1]. В 1982 г. Montero и Fes, использовав тот же метод очистки, выделили из мозга быка гомогенную 5′-НК, которая не гидролизовала циклические нуклеотиды [2]. Однако методикой выделения 5′-НК в этой работе было предусмотрено нагревание фракций ферментов до 60° в течение 5 мин, что послужило, вероятно, причиной потери активности ФДЭ. Сообщалось также о существовании комплекса ФДЭ и 5′-НК в коре надпочечников и о возможности разделения его на индивидуальные ферменты [3]. Некоторыми авторами было высказано преположение о том, что 5′-НК и аденозиндезаминаза (КФ 3.5.4.4) мозга крысы являются составными частями одного и того же белка [4], однако оказалось, что эти ферменты могут быть разделены в процессе очистки [3].

Недавно нами было обнаружено, что 5′-НК, выделенная из гипота-

ламуса крупного рогатого скота, обладает фосфодиэстеразной активностью [5].

Настоящая работа посвящена изучению взаимодействия ФДЭ и 5′-НК, осуществляющих реакции превращения cAMP→5′-AMP→аденозин.

Материалы и методы

В работе были использованы следующие реактивы: cAMP («Calbiochem», США); дибутирил-cAMP и cGMP («Serva», ФРГ); 5′-AMP, 5′-GMP, дитиотреитол и NaN_3 («Reanal», Венгрия); меркаптоэтанол («Merck», ФРГ); ЭГТА («Calbiochem», США); трис («Serva», ФРГ); пластины «Силуфол» («Kavalier», ЧССР); хроматографические сорбенты: TSK DEAE-Toyopearl 650 M («Toyo Soda», Япония); фенил-сефароза, голубая сефароза, конканавалин А (Con A)-сефароза, сефакрил S-200 («Pharmacia», Швеция); анионообменная смола амберлит CG-400, 100—200 меш («Serva», ФРГ); [^{14}C] 5′-AMP и [^{14}C] 5′-GMP («Chemapol», ЧССР); α-метилманноза (α-MM) была предоставлена сотрудником нашей лаборатории Возным Я. В. Остальные препараты коммерческие марок х. ч. и сс. ч. отечественного производства.

Ферменты выделяли из гипоталамуса быка в соответствии с методом, использованным ранее для очистки ФДЭ [6] в модификации Бобрускина и соавт. [7], на основе аффинной хроматографии на фенил-сефарозе [8]. При очистке ФДЭ использовали также оригинальный аффинный сорбент на основе cAMP, иммобилизованного нами на эпоксиактивированном силикагеле [9]. Была применена также хроматография на голубой сефарозе [10], а также на Con A-сефарозе.

Ткань гомогенизировали в 25 мМ трис-HCl буфере, pH 7,0 (1:2,5), содержащем 0,1 мМ NaN_3, 5 мМ дитиотреитол или меркаптоэтанол и 1 мМ $MgCl_2$. Супернатант гомогената (75000 g, 60 мин) наносили на колонку (4×6 см) с ДЭАЭ-TSK. Колонку промывали тем же буфером, содержащим 0,05 М NaCl. Элюцию проводили с использованием линейного и ступенчатого градиентов NaCl (0,05—0,35 М). Суммарный элюат каждого из пиков, содержащих ферментативную активность, наносили на колонку с фенил-сефарозой (4×6 см), предварительно уравновешенную буфером, включающим 1 мМ $CaCl_2$. После промывки колонки элюцию осуществляли буфером, в котором Ca^{2+} был заменен на 0,2 мМ ЭГТА, в присутствии 0,15 М NaCl, а затем в его отсутствие.

Элюат подвергали аффинной хроматографии на колонках с Con A-сефарозой (1,2×1,5 см), голубой сефарозой (2×4 см), или cAMP-силикагелем (1,2×2 см). Колонку с Con A-сефарозой предварительно уравновешивали, а также промывали после нанесения фермента 25 мМ трис-HCl буфером, pH 7,0, содержащим 0,1 М NaCl, 1 мМ $MgCl_2$, 1 мМ $CaCl_2$, 1 мМ $MnCl_2$. При использовании голубой сефарозы или cAMP-силикагеля для этого применяли тот же буфер, содержащий 1 мМ $MgCl_2$. Элюцию фермента осуществляли с Con A-сефарозы с по-

мощью 0,1 М α-ММ. с cAMP-силикагеля—0,15 М NaCl или 5 мМ cAMP, с голубой сефарозы—с использованием линейного и ступенчатого градиентов NaCl (0,05—1 М). Фермент, элюированный 5 мМ cAMP, подвергали далее диализу против 25 мМ трис-HCl буфера, содержащего 1 мМ $MgCl_2$. Гель-фильтрацию проводили на колонке (1,5×100 см) с сефакрилом S-200 со скоростью 10 мл/ч в 25 мМ трис-HCl буфере в присутствии с 1 мМ $MgCl_2$, 0,1 М NaCl и 0,1 мМ ЭГТА. Для определения величины M_r фермента колонку калибровали с помощью стандартных белков («Serva», ФРГ). Все указанные операции проводили при 4°. Выход белка контролировали по изменению УФ-поглощения при длине волны 280 нм. ВЭЖХ проводили на колонках ДЭАЭ-TSK (21,5×150 мм) («LKB», Швеция) и SW-3000 (7,5×600 мм) («Altex Spherogel TSK», США) с использованием хроматографа «Altex Beckman» (США).

Активность ФДЭ и 5′-НК определяли двумя способами. В первом случае для этого использовали инкубационную среду (10 мкл), содержащую 50 мМ трис-HCl буфер, pH 7,0, 1 мМ $MgCl_2$, cAMP и [^{3}H]cAMP (0,1 мкКи) или cGMP и [^{3}H]cGMP (0,1 мкКи) для определения активности ФДЭ и 5′-AMP в сочетании с [^{14}C]5′-AMP (0,1 мкКи) или 5′-GMP в сочетании с [^{14}C]5′-GMP (0,1 мкКи) в качестве субстратов для определения активности 5′-НК, а также определенное количество фермента элюированных с колонок фракций. Инкубацию проводили при 30° в течение различных промежутков времени. Реакцию останавливали в кипящей водяной бане. Продукты реакции разделяли с помощью ТСХ на силикагеле, идентифицировали их с применением свидетелей в УФ, соответствующие пятна вырезали из пластины «Силуфол». Счет радиоактивности проб определяли с помощью жидкостного сцинтилляционного спектрометра типа «Intertechnique» (Франция).

Во втором случае суммарный объем инкубационной среды составлял 100 мкл. При определении активности ФДЭ реакцию проводили в два этапа. После остановки реакции, катализируемой ФДЭ, в кипящей водяной бане пробы инкубировали в течение 10 мин при 30° в присутствии 5′-НК змеиного яда (0,3 мг/мл). Продукты гидролиза разделяли с помощью анионообменной смолы «Амберлит». По окончании ферментативной реакции к пробам добавляли 500 мкл смолы, суспендированной в воде (1:2) [11]. После центрифугирования производили счет радиоактивности супернатанта (8000 об/мин, 5 мин), содержавшего меченые аденозин или гуанозин, не сорбирующиеся на смоле в отличие от соответствующих нуклеотидов. Активность 5′-НК элюированных с колонок фракций определяли аналогичным способом, не требующим, однако, применения змеиного яда.

В первом случае использовали сцинтиллятор ЖС-106, во втором—ЖС-8. Результаты рассчитывали по количеству гидролизованного субстрата с учетом остаточной радиоактивности проб в отсутствие фермента и уровня неспецифической сорбции аденозина или гуанозина на ионообменнике при полном гидролизе субстратов при избытке фермента. Профили элюций определяли при концентрации субстратов 3 мкМ.

Результаты и обсуждение

С помощью ИОХ растворимой фракции гомогената гипоталамуса быка на колонке с ДЭАЭ-TSK выявлены два пика активности ФДЭ (рис. 1). Эти пики элюируются при концентрации NaCl в буфере 0,15

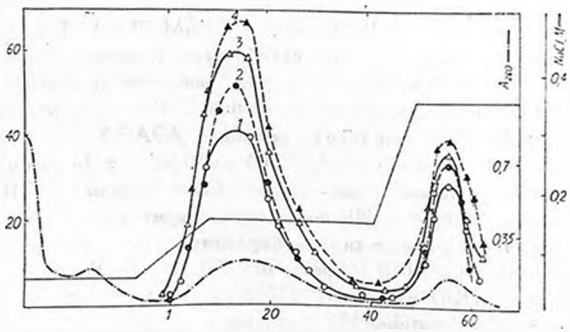

Рис. 1. Выделение ФДЭ (1, 3) и 5′-НК (2, 4) на колонке с ДЭАЭ-TSK. По оси абсцисс—номера фракций (по 5 мл); по оси ординат (слева)—базальная активность ферментов (нмоль/мин) при использовании в качестве субстратов cAMP *(1)*, cGMP *(3)*, 5′-AMP *(2)* или 5′-GMP *(4)*

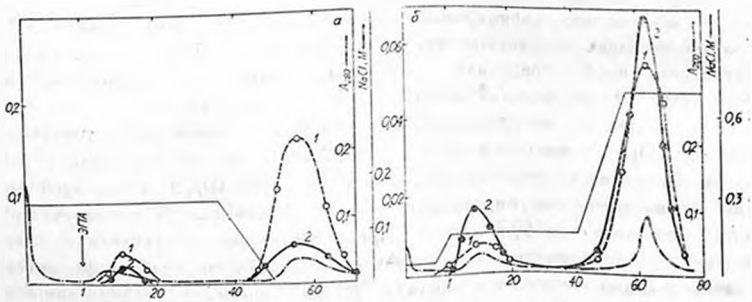

Рис. 2. Выделение ФДЭ *(1)* и 5′-НК *(2)* на колонках с фенил-сефарозой *(а)* и голубой сефарозой *(б)*. По оси абсцисс—номера фракций (по 6 мл); по оси ординат (слева)—базальная активность ферментов (мкмоль/мин) при использовании в качестве субстратов cAMP *(1)* или 5′-AMP *(2)*

и 0,3 М соответственно. Оказалось, что пикам активности ФДЭ строго соответствуют пики активности 5′-НК. Последующая хроматография суммарного элюата первого пика ферментов на фенил-сефарозе позволила в свою очередь получить также два пика, фракции которых проявляли как активность ФДЭ, так и 5′-НК (рис. 2, *а*). Аналогичную картину можно было наблюдать при хроматографии на фенил-сефарозе второго пика ферментативной активности выделенного на колонке с ДЭАЭ-TSK.

Формы ферментов, элюируемые в двух пиках с фенил-сефарозы, различаются, очевидно, по способности вступать в гидрофобные взаимодействия с этим хроматографическим адсорбентом. Можно полагать, что связывание с фенил-сефарозой ферментов первого пика опосредуется участием кальмодулина, молекула которого характеризуется высокой степенью гидрофобности в присутствии Ca^{2+}. Элюция этого пика осуществляется с помощью ЭГТА, хелатирующего Ca^{2+} и ослабляющего таким образом гидрофобные взаимодействия. Эти взаимодействия можно также нарушить снижением ионной силы среды [8], что позволяет выделить второй пик активности ферментов удалением из элюирующего буфера NaCl (рис. 2, *а*).

Обнаружено также, что на колонках с голубой сефарозой каждый из пиков, выделенных с помощью ИОХ, можно разделить на два пика, элюируемых буфером, содержащим NaCl в концентрациях 0,15 М и 0,7 М соответственно (рис. 2, *б*). Фракции этих пиков одновременно проявляли активность двух ферментов—ФДЭ и 5′-НК. Разделение ФДЭ и 5′-НК не было достигнуто и в результате применения аффинной хроматографии на Con A-сефарозе. Нами было показано, что 5′-НК, выделенная как в первом, так и во втором пиках с колонки с фенил-сефарозой, связывается с Con A в присутствии Mn^{2+} и Ca^{2+} (1 мМ) и элюируется буфером, содержащим 0,1 М α-ММ. Это, вероятно, свидетельствует о том, что выделенная из растворимой фракции гомогената 5′-НК, подобно ферменту фракции мембран [12], является гликопротеином, имеющим в своем составе α-D-маннопиранозильные остатки. В этом случае активность 5′-НК, элюированная с Con A-сефарозы, также сопровождалась активностью ФДЭ (рис. 3, *а*).

Выделенная таким образом ФДЭ обладала низкой базальной активностью, которая, однако, возрастала в 5—20 раз в присутствии кальмодулиноподобного активатора ФДЭ циклических нуклеотидов, получившего название С-модулин (рис. 3, *а*). С-модулин был обнаружен в составе препарата кардиотропного нейрогормона «С», выделенного ранее из магноцеллюлярных ядер гипоталамуса быка [13].

Кроме того, ферменты подвергали аффинной хроматографии на сАМР-силикагеле с целью специфичного выделения ФДЭ на основе ее высокого сродства к лиганду этого адсорбента. Пик ферментативной активности, элюированный буфером, содержащим сАМР, характеризуется наличием как ФДЭ, так и 5′-НК (рис. 3, *б*).

Была использована также возможность специфичного выделения 5′-НК с применением 5′-АМР-сефарозы, с которой 5′-НК элюировалась совместно с ФДЭ (рис. 3, *в*). В этом случае ферменты выделялись буфером, содержащим 1 мМ 5′-АМР, обладающим специфичностью лишь к 5′-НК.

Гель-фильтрация на сефакриле S-200 суммарного элюата двух пиков ферментов, полученных на фенил-сефарозе, выявила наличие строго соответствующих друг другу активностей ФДЭ и 5′-НК в трех пиках, которые характеризовались величинами M_r 220, 114 и 57 кД (рис. 4).

Гель-фильтрация на сефакриле S-200 лишь второго пика ферментов, элюированного с фенил-сефарозы, приводила к появлению тех же трех пиков, содержащих как ФДЭ, так и 5′-НК. Полученные нами результа-

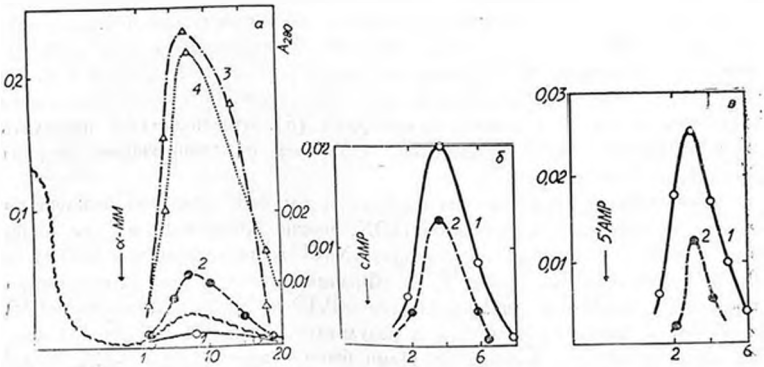

Рис. 3. Аффинная хроматография ФДЭ *(1, 3)* и 5′-НК *(2, 4)* на колонках с Con A-сефарозой *(а)*, cAMP-силикагелем *(б)* и 5′-AMP-сефарозой *(в)*. По оси абсцисс—номера фракций (по 1 мл); по оси ординат (слева)—базальная активность ферментов *(1, 2)* и их активность в присутствии 1 мкг/мл С-модулина *(3,4)* (мкмоль/мин) при использовании в качестве субстратов cAMP *(1, 3)* или 5′-AMP *(2, 4)*.

Рис. 4. Гель-фильтрация ФДЭ *(1)* и 5′-НК *(2)* на колонке с сефакрилом S-200. По оси абсцисс—объем элюата (мл); по оси ординат (слева)—базальная активность ферментов (нмоль/мин) при использовании в качестве субстратов cAMP *(1)* или 5′-AMP *(2)*. Стандарты M_r (кД): *а*—каталаза (240); *б*—альдолаза (160); *в*—альбумин бычий сывороточный (67); *г*—альбумин яичный (45); *д*—химотрипсиноген (25); *е*—миоглобин (17, 8)

ты в сочетании с литературными данными дают основание полагать, что с помощью гель-фильтрации на сефакриле выделяется тетрамер, димер и мономер, обладающие ферментативной активностью [3, 14]. Обнаруже-

ние активности двух ферментов в пике, соответствующем M_r 57 кД (мономер), позволяет предположить, что один и тот же фермент обладает двумя ферментативными активностями. Предварительные данные, полученные с применением гель-фильтрации в системе ВЭЖХ на колонке SW-3000, свидетельствуют о гомогенности белка с M_r 57 кД.

Нам удалось продемонстрировать функциональную взаимосвязь между ФДЭ и 5′-НК. Так, при исследовании кинетических характеристик 5′-НК установлено, что константа скорости I порядка для этого фермента, гидролизующего 5′-АМР, образовавшегося из cAMP под действием ФДЭ в препаратах ферментов, в 100 раз превышает константу скорости I порядка при гидролизе 5′-АМР, внесенного в пробы извне. Это может быть следствием направленного переноса интермедиата, которым в данном случае является 5′-АМР ,от активного центра одного фермента к активному центру другого в условиях их сопряженности.

По всей вероятности, обнаруженная нами взаимосвязь между ФДЭ и 5′-НК характерна и для мозга быка: множественные формы ФДЭ, выделенные с помощью ИОХ в системе ВЭЖХ на колонке ДЭАЭ-TSK, также обладали активностью 5′-НК.

Функциональная роль межферментных взаимодействий может проявляться в координированной регуляции метаболических процессов, обеспечивающей более быстрый ответ на изменения концентраций метаболитов.

Результаты наших исследований показывают, что в гипоталамусе животных существует сопряженная система ФДЭ—5′-НК, направленная на быстрое превращение cAMP в 5′-АМР и аденозин, что весьма важно для регуляции тонуса гладкой мускулатуры сосудов [15, 16] и образования новых порций cAMP путем активации аденилатциклазы [17].

INTERRELATION BETWEEN BOVINE HYPOTHALAMUS CYCLIC NUCLEOTIDE PHOSPHODIESTERASE AND 5′-NUCLEOTIDASE

SHAROVA N. P., GURVITS B. Ya., GALOYAN A. A.

Institute of Biochemistry, Arm. SSR Acad. Sci., Yerevan

It has been discovered that multiple forms of cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE) and 5′-nucleotidase (5′-N) of bovine hypothalamus soluble fractions are coeluted at all steps of the purification scheme, including chromatography on DEAE—TSK, concanavalin A-, phenyl-, blue- and 5′-AMP-Sepharose, cAMP-silica gel, Sephacryl S-200 and HPLC.

Functional interrelation between PDE 5′-N is expressed in drastic acceleration of the reaction: cAMP→5′-AMP→adenosine.

A suggestion about existence of a coupled enzyme system involving cAMP PDE & 5′-N in brain tissue is put forward.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Nakamura S.* Biochim. et biophys. acta, v. 426, p. 339—347, 1976.
2. *Montero J. M., Fes J. B.* J. Neurochem., v. 39, p. 982—989, 1982.
3. *Boldicke T. W., Schubert-Rehberg K., Wombacher M.* FEBS Lett., v. 204, p. 125—128, 1986.
4. *Centelles J. J., Franco R., Canela E. I., Bozal J.* Neurochem. Res., v. 11, p. 471—479, 1986.
5. *Галоян А. А., Гурвиц Б. Я., Шарова Н. П., Алексанян С. С.* Нейрохимия, т. 6, №4, с. 544—551, 1987.
6. *Galoyan A. A., Gurvitz B. Ya.* Neurochem. Res., v. 10, p. 1467—1481, 1985.
7. *Бобрускин И. Д., Шайхин С. М., Муратова М. В., Баранова Л. А., Северин Е. С.* Биохимия, т. 52, с. 1344—1351, 1987.
8. *Gopalakrishna R., Anderson W. B.* Biochem. and Biophys. Res. Commun., v. 104, p. 830—836, 1982.
9. *Малиновский В. А., Староверов С. М., Лисичкин Г. В.* Общая химия, т. 55, с. 2767—2772, 1985.
10. *Morrill M. E., Thompson S. T., Stellwagen E.* J. Biol. Chem., v. 254, p. 4371—4374, 1979.
11. *Thompson W. J., Appleman M. M.* Biochemistry, v. 10, p. 311—316, 1971.
12. *Nakamura S., Mimori Y., Iijima S., Nagata H., Yamao S., Kameyama M.* — In: Physiology and Pharmacology of Adenosine Derivatives (eds. J. W. Daly et al.), p. 21—29, N. Y., Raven Press, 1983.
13. *Galoyan A. A.* Neurochem. Res., v. 11, p. 769—787, 1986.
14. *Sharma R. K., Wang J. H.* J. Biol. Chem., v. 261, p. 1322—1328, 1986.
15. *Berne R. M.* Amer. J. Physiol., v. 204, p. 317—322, 1967.
16. *Arch J. R., Newsholm E. A.* Biochem. J., v. 174, p. 965—977, 1978.
17. *Daly J. W.* — In: Physiology and Pharmacology of Adenosine Derivatives (eds. J. W. Daly et al.), p. 275—290, N. Y., Raven Press, 1983.

Поступила 11. 1. 1988