



УДК 577.152.314*17.042

КИНЕТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА И РЕГУЛЯЦИЯ ФОСФОДИЭСТЕРАЗ
ЦИКЛИЧЕСКИХ НУКЛЕОТИДОВ ЛИМФОИДНЫХ КЛЕТОК

Ажаева Е. В., Северин Е. С.*

Институт органической химии им. П. Д. Зелинского Академии наук СССР,
Москва;

* Институт молекулярной биологии Академии наук СССР, Москва

Выделены cGMP-зависимые фосфодиэстеразы циклических нуклеотидов из лимфоцитов селезенки и из селезенки мыши. Показано, что ферменты идентичны по своим свойствам и гидролизуют как cAMP, так и cGMP. Исследовано влияние структурных аналогов cAMP и cGMP на кинетические свойства фермента. Анализ позволяет предположить существование у cGMP-активируемой фосфодиэстеразы двух типов аллостерически связанных центров: каталитических и регуляторных, высокоспецифических к cGMP.

Известно, что циклические нуклеотиды играют важную роль в регуляции различных процессов в лимфоидных клетках [1, 2], а уровень cAMP и cGMP в клетке может контролироваться как аденилатциклазой, так и фосфодиэстеразами (КФ 3.1.4.17) циклических нуклеотидов. Фосфодиэстеразы различных типов были выделены из ряда источников [3–5]. В экспериментах с культурами клеток была продемонстрирована связь колебаний внутриклеточных концентраций циклических нуклеотидов с изменениями активности и субстратной специфичности фосфодиэстераз на разных стадиях клеточного цикла [6, 7].

Одной из известных фосфодиэстераз является фермент, активность которого стимулируется микромолярными концентрациями cGMP. Фосфодиэстераза этого типа была выделена из тканей печени, сердца и надпочечников [8]. В исследованиях с помощью химических аналогов cAMP и cGMP было показано существование двух типов центров (регуляторных и каталитических) у cGMP-активируемой фосфодиэстеразы циклических нуклеотидов из ткани надпочечников быка [9, 10]. Фосфодиэстеразный состав лимфоидных клеток в настоящее время мало изучен. Целью нашей работы было изучение свойств фосфодиэстераз циклических нуклеотидов из лимфоцитов селезенки мыши и из клеток человеческой лимфобластомы QOS, а также исследование возможных путей регуляции этих фосфодиэстераз.

Выделение cGMP-активируемой фосфодиэстеразы циклических нуклеотидов из клеток лимфобластами QOS описано нами отдельно*. Аналогичная методика использовалась для выделения фермента из лимфоцитов селезенки мыши. При хроматографии цитоплазматической фракции лимфоцитов на DEAE-Toyorearl 650 M фосфодиэстераза элюируется одним симметричным пиком. Максимумы активности по субстратам cAMP и cGMP совпадают, и фермент активируется микромолярными концентрациями cGMP. Дальнейшая очистка фермента проводилась с использованием гель-фильтрации на колонке с TSK-HW65.

Молекулярная масса выделенной фосфодиэстеразы составляет ~800 кДа. Электрофорез в присутствии 0,1% додецилсульфата натрия указывает на существование двух белковых полос с M_r 89 и 93 кДа. Эти данные совпадают с результатами, полученными для фермента из клеток

Сокращения: PMSF – фенолметилсульфонилфторид; cAMP(Bt) – N⁶, O^{2'} – дибутрил cAMP; cGMP(Bt) – N², O^{2'} – дибутрил cGMP.

* Данные будут опубликованы в журнале «Биохимия» (1987, т. 52).

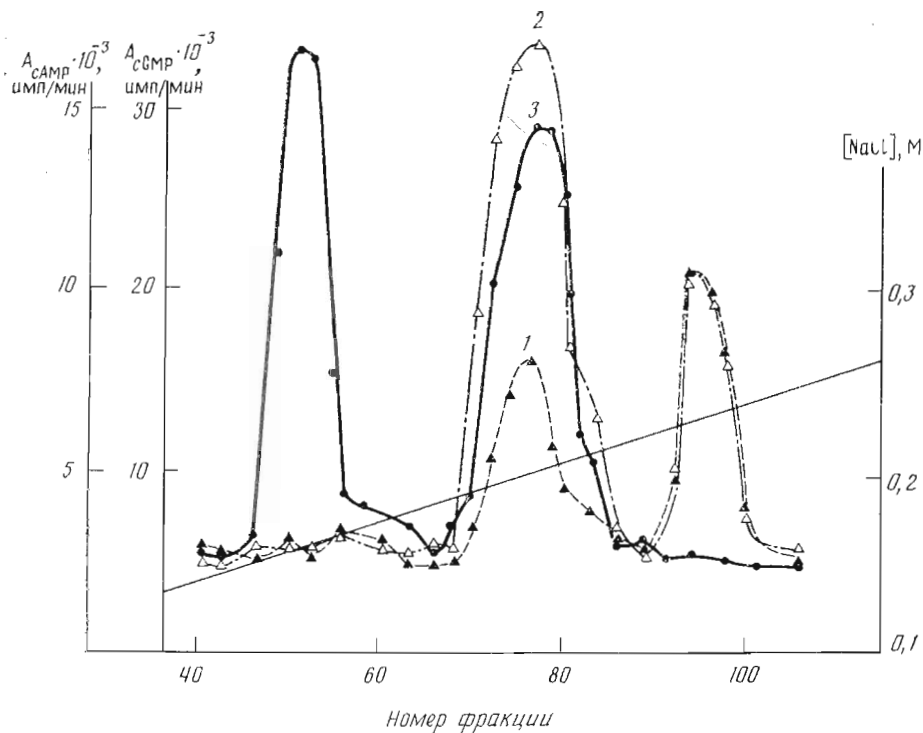


Рис. 1

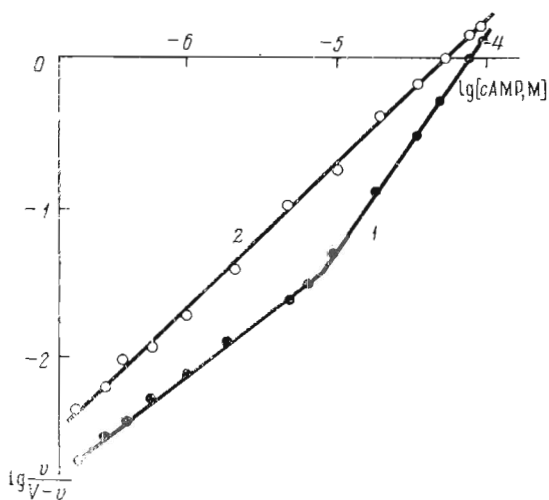


Рис. 2

Рис. 1. Хроматография гомогената ткани селезенки мыши на DEAE-Toyorearl 650 M. Активность по гидролизу сАМР ($A_{сАМР}$) (1), сGMP ($A_{сGMP}$) (2), сАМР в присутствии 1 мкМ сGMP (3). Концентрации субстратов равны 1 мкМ

Рис. 2. Зависимость скорости гидролиза сАМР фосфодиэстеразой из селезенки мыши от концентрации субстрата в отсутствие сGMP (1) и в присутствии 2 мкМ сGMP (2). Данные представлены в координатах Хилла

лимфобластомы QOS. Кинетические свойства этих фосфодиэстераз также оказались очень близкими (см. ниже).

Поскольку процесс выделения большого количества лимфоцитов из селезенки мыши связан со значительными методическими трудностями, мы предприняли попытку выделить фосфодиэстеразу из целых селезенок мыши, что позволило значительно увеличить количество получаемого фермента. Гомогенат ткани центрифугировали и хроматографировали на колонке с DEAE-Toyorearl 650 M (рис. 1). При этом идентифицировали три различные формы фосфодиэстераз. При ионной силе, соответствующей 0,14–0,16 M NaCl, элюируется фермент, который преимущественно гидролизует сGMP (гидролиз сАМР при концентрации 1 мкМ практически отсутствует). В 0,175–0,2 M NaCl элюируется фермент, обладающий способностью гидролизовать как сАМР, так и сGMP, причем гидролиз

**Влияние сGMP (Bt) на кинетические константы гидролиза сАМР и сGMP
фосфодиэстеразой из селезенки мыши**

Субстрат	Концентрация ингибитора, мкМ					
	0		10		50	
	K_m	V	K_m	V	K_m	V
сАМР (+2 мкМ сGMP)	32	0,32	63	0,24	—	—
сGMP	24	0,136	33	0,122	4	0,07

Примечание. Значения K_m и V даны в мкМ и мкмоль/(мин·мг) соответственно.

сАМР активируется микромолярными концентрациями сGMP. Наконец, третий тип фосфодиэстеразы, который элюируется в 0,22–0,23 М NaCl, гидролизует преимущественно сАМР и не активируется сGMP. Фермент, элюирующийся во втором пике, дважды хроматографировали на колошке с гелем TSK-HW65 и полученный препарат окончательно дочистили аффинной хроматографией на геле сGMP-TSK. При электрофорезе выделенной фосфодиэстеразы в присутствии 0,1% додецилсульфата натрия обнаружили две белковые полосы с M_r 89 и 93 кДа. Активации этой фосфодиэстеразы кальмодулином в присутствии ионов Ca^{2+} не наблюдали.

Нами были исследованы кинетические свойства фосфодиэстераз из лимфобластомы QOS, лимфоцитов селезенки и целой селезенки мыши. Оказалось, что ферменты из всех трех источников обладают практически одинаковыми кинетическими параметрами. В координатах Лайнуивера — Берка зависимость скорости гидролиза сАМР от его концентрации имеет нелинейный характер. В присутствии микромолярных концентраций сGMP наблюдается активация фермента и зависимость V^{-1} от $[S]^{-1}$ становится близкой к линейной (рис. 2). Зависимость скорости гидролиза сGMP от его концентрации в этих координатах близка к линейной, и коэффициент Хилла равен $1,1 \pm 0,03$. Константы Михаэлиса для сGMP и сАМР в присутствии 2 мкМ сGMP близки и составляют ~ 20 мкМ. сАМР в концентрациях 10^{-7} – 10^{-4} М не стимулирует гидролиз сGMP.

Нами был проведен также анализ кинетических характеристик фосфодиэстеразы из селезенки в присутствии двух структурных аналогов сАМР и сGMP: сАМР(Bt) и сGMP(Bt). Было показано, что оба аналога в диапазоне концентраций 10^{-7} – 10^{-3} М не активируют гидролиз сАМР и сGMP, но способны ингибировать как базальную активность фермента, так и фермент, активированный микромолярными концентрациями сGMP. При этом сGMP(Bt) — более эффективный ингибитор, чем сАМР(Bt), поскольку одинаковое ингибирование активности фосфодиэстеразы достигается концентрациями сGMP(Bt), на порядок меньшими, чем концентрации сАМР(Bt). Как видно из рис. 3 и 4, ингибирование гидролиза сGMP, а также сАМР в присутствии 2 мкМ сGMP приводит к изменению соответствующих величин K_m и V (таблица).

При рассмотрении зависимости скорости гидролиза сАМР от концентрации активатора (сGMP) видно, что смещения положения максимума колоколообразных кривых не наблюдается (рис. 4). Полученные данные позволяют предположить, что гидролиз сАМР и сGMP, по-видимому, осуществляется в одном и том же каталитическом центре, в то время как активация фермента происходит при связывании сGMP в другом, высокоспецифическом регуляторном центре.

При низких концентрациях сGMP его эффект выражается в активации фермента вследствие преимущественного связывания сGMP в регуляторном центре. Это подтверждается тем, что $K_{1/2}$, т. е. концентрация активатора, необходимая для полумаксимальной активации, составляет $\sim 1,5$ мкМ, что значительно ниже соответствующей K_m (24 мкМ). При повышении концентрации активатора он начинает конкурировать с субстратом в активном центре, этим объясняется наличие нисходящей ветви

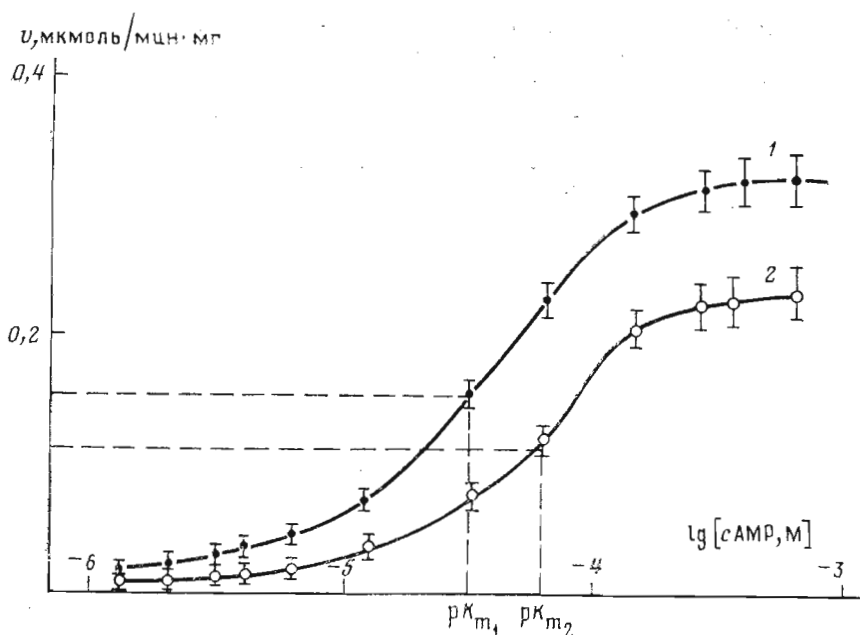


Рис. 3. Зависимость скорости гидролиза сАМР фосфодиэстеразой из селезенки мыши, активированной 2 мкМ сGMP, от концентрации субстрата в отсутствие ингибитора (1) и в присутствии 10 мкМ сGMP(Bt) (2)

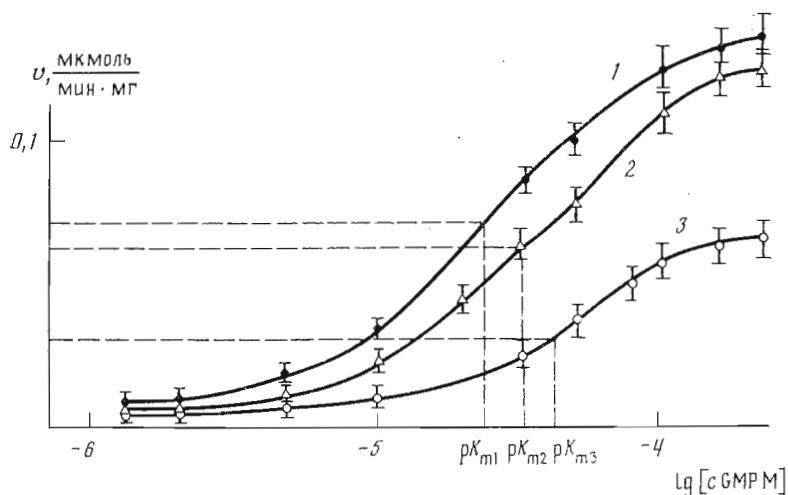


Рис. 4. Зависимость скорости гидролиза сGMP от концентрации субстрата в отсутствие ингибитора (1), в присутствии 10 (2) и 50 (3) мкМ сGMP(Bt)

кривых активации. сАМР(Bt) и сGMP(Bt), по-видимому, не связываются в регуляторном центре, так как увеличения $K_{1/2}$ в их присутствии не наблюдается (рис. 4). Ингибирование гидролиза сАМР и сGMP происходит за счет конкуренции аналогов с субстратами в активном центре фермента.

Аналогичные кинетические кривые в присутствии и в отсутствие сАМР(Bt) и сGMP(Bt) были получены для фосфодиэстеразы из клеток лимфобластомы QOS.

Таким образом, на основании приведенных данных можно сделать вывод, что в двух типах лимфоидных (человеческой лимфобластоидной клеточной линии QOS и в лимфоцитах селезенки мыши) присутствуют фосфодиэстеразы с очень близкими свойствами. Эти ферменты гидролизуют как сАМР, так и сGMP, причем K_m для обоих субстратов оказываются приблизительно равными. Гидролиз сАМР стимулируется микро-

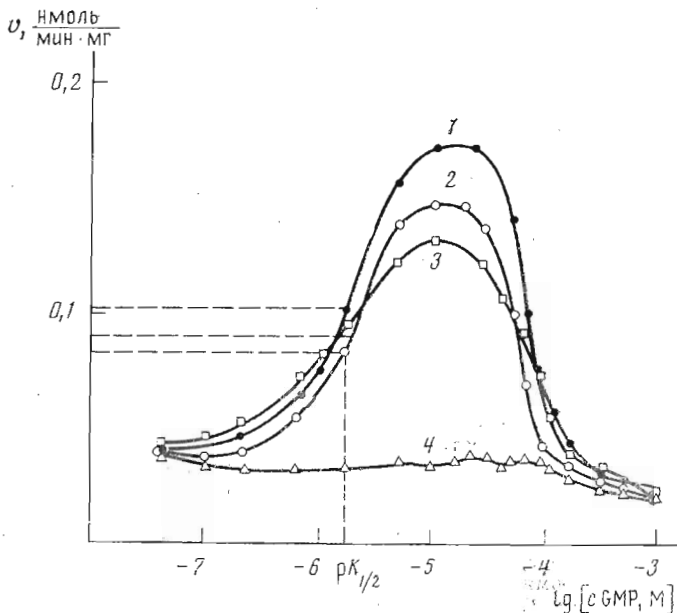


Рис. 5. Зависимость скорости гидролиза сАМР от концентрации активатора (сGMP): в отсутствие ингибитора (1) и в присутствии 4 (2), 10 (3) и 100 (4) мкМ сGMP (Вt). $K_{1/2} = 1,5 \pm 0,05$ мкМ

молярными концентрациями сGMP. Зависимости скорости гидролиза сАМР от его концентрации в обратных координатах нелинейны и линейаризуются при активации фермента. Анализ, проведенный с помощью структурных аналогов, позволяет предположить существование двух типов аллостерически связанных центров — регуляторных и каталитических, что хорошо согласуется с данными других авторов, полученными при изучении сGMP-активируемых фосфодиэстераз из других источников [10].

Экспериментальная часть

В работе использовали $[2,8\text{-}^3\text{H}]$ сАМР, $[8\text{-}^3\text{H}]$ сGMP (уд. акт. 42 и 16 Ки/ммоль соответственно; Amersham, Англия); сАМР, сGMP, сАМР(Вt), сGMP(Вt) (Sigma США); Percoll (Pharmacia, Швеция); среду RPMI-1640, фенилметилсульфонилфторид (Serva, ФРГ); DEAE-Toyopearl 650 M, гели TSK-HW 65 и TSK-HW 55 (Toyo Soda, Япония).

Лимфоциты из селезенки мыши выделяли по методу [11] с модификациями. Селезенки измельчали и гомогенизировали в шариковом стеклянном гомогенизаторе в среде RPMI-1640 с 200 мМ глутамином. Суспензию клеток дефибринизировали легким перемешиванием со стеклянными бусами. Моноциты удаляли инкубацией клеточной взвеси с тетракарбонилем железа в течение 30 мин при 37°С. Суспензию клеток фильтровали через нейлоновую вату от крупных частиц и наносили на слой изотонического раствора Percoll в 0,15 М NaCl (плотность 1,077 г/мл, n_D 1,345). После центрифугирования при 400g в течение 20 мин лимфоциты с границы раздела осторожно собирали пипеткой и суспендировали в буфере А: 10 мМ Hерес (рН 7,4), 150 мМ NaCl, 10 мМ KCl, 0,2% глюкоза. Остаточные эритроциты лизировали трехкратной инкубацией в 30 мМ трис-HCl-буфере, рН 7,2, с 280 мМ NH_4Cl при 4°С. Затем клетки дважды отмывали буфером А. Число жизнеспособных клеток определяли окрашиванием трипановым синим. Чистота лимфоцитов, выделенных таким образом, составляла ~99%. Контроль окрашенных по Романовскому — Гимзе лимфоцитов осуществляли под световым микроскопом.

Приготовление геля сGMP-TSK. В качестве носителей для иммобилизации сGMP использовали гели TSK-HW55 или TSK-HW50. Активацию и связывание нуклеотида проводили по модифицированному методу Пората [12]. 5 г просушенного на стеклянном фильтре геля промывали водой и смешивали с 5 мл диглицидилового эфира 1,4-бутандиола и 5 мл 0,6 М NaOH, содержащего 10 мг NaN_3 . Суспензию перемешивали 8–10 ч при 25°С. Реакцию останавливали промывкой большим объемом воды на стеклянном фильтре. Активированную смолу перемешивали 48 ч при 45°С двумя объемами боратного буфера, рН 10, содержащего 100 мМ NaCl и 20 мМ сGMP. После окончания реакции смолу промывали 20 объемами того же буфера без нуклеотида. Остаточные эпоксигруппы инактивировали 12 ч инкубацией смолы

в 100 мМ боратном буфере, рН 11, содержащем 100 мМ NaCl и 1 М этаноламин. Затем готовую смолу отмывали водой.

Выделение фосфодиэстеразы циклических нуклеотидов. Все операции проводили при 4° С. При выделении фосфодиэстеразы из лимфобластомы QOS цитоплазматическую фракцию клеток, полученную после центрифугирования гомогената при 100 000g, наносили на колонку (1,6×10 см) с DEAE-Toyopearl 650 M, уравновешенную буфером Б (20 мМ HEPES (рН 7,4), 1 мМ EGTA, 2 мМ MgCl₂, 100 мМ NaCl, 10 мМ меркаптоэтанол, 0,4 мМ PMSF, 1 мМ бензамидинхлорид, 1 мМ NaN₃). Колонку промывали 10 объемами того же буфера. Элюцию проводили линейным градиентом 0,1–0,5 М NaCl (400 мл), скорость элюции 25 мл/ч. Фракции (2 мл), обладающие фосфодиэстеразной активностью, собирали, концентрировали ультрафильтрацией через мембрану XM-30 и наносили на колонку (1,6×80 см) с гелем TSK-HW 65. Гель-фильтрацию проводили в буфере Б с 10% глицерина со скоростью 5 мл/ч. Объединяли фракции, содержащие фермент с максимальной активацией cGMP, и проводили аффинную хроматографию на геле cGMP-TSK. Образец диализовали против буфера Б и наносили на колонку с гелем cGMP-TSK со скоростью 4 мл/ч при 4° С, промывали двумя объемами буфера Б. Затем колонку нагревали до комнатной температуры. Фосфодиэстеразу элюировали буфером Б с 20 мМ cGMP. Фракции, содержащие белок, диализовали 12 ч против буфера Б и проверяли на фосфодиэстеразную активность и активацию cGMP. Регенерацию геля cGMP-TSK проводили промывкой двумя объемами 4 М гуанидинхлоридом, 2 М NaCl, 1 мМ EDTA, затем водой. Обычно аффинную смолу использовали 4–5 раз после регенерации.

Аналогично выделяли фосфодиэстеразу из лимфоцитов селезенки мыши.

При выделении фермента из целых селезенок материал измельчали и гомогенизировали с четырьмя объемами буфера в гомогенизаторе Поттера (тефлон-стекло) при 1500 об/мин. В процессе гомогенизации добавляли ингибитор трипсина из соевых бобов (1 мг/мл), 0,4 мМ PMSF (трижды), 1 мМ NaN₃, 1 мМ бензамидинхлорид. Гомогенат центрифугировали 1 ч при 40 000g. Дальнейшие операции проводили аналогично описанному выше. При элюции фермента с DEAE-колонки использовали градиент 0,1–0,3 М NaCl. При выделении фосфодиэстеразы из лимфоцитов или клеток QOS в некоторых случаях мы ограничивались первыми двумя стадиями очистки, так как после гель-фильтрации отдельные фракции содержали фермент в состоянии, близком к гомогенному.

Определение активности фосфодиэстеразы проводили по методу Томпсона и др. [13] в две стадии.

Диск-электрофорез в присутствии 0,1% додецилсульфата натрия проводили по методу Лэммли и др. [14], концентрацию белка определяли по методу Брэдфорд [15].

ЛИТЕРАТУРА

1. Coffey R. G., Hadden E. M., Lopez C. // *Adv. Cyclic Nucleotide Res.* 1977. V. 9. P. 661–676.
2. Plaut M., Marone G., Thomas L. L., Lichtenstein L. M. // *Adv. Cyclic Nucleotide Res.* 1980. V. 12. P. 161–172.
3. Thompson W. J., Epstein P. M., Strada S. J. // *Biochemistry.* 1979. V. 18. № 23. P. 5228–5237.
4. Tucker M. M., Robinson J. B., Stellwagen E. // *J. Biol. Chem.* 1981. V. 256. № 18. P. 9051–9058.
5. Martins T. J., Mumby M. C., Beavo J. A. // *J. Biol. Chem.* 1982. V. 257. № 4. P. 1973–1979.
6. Epstein P. M., Hachisky R. // *Adv. Cyclic Nucleotide Prot. Phosphoryl. Res.* 1984. V. 16. P. 303–324.
7. Manganiello V. C., Yamamoto M., Elks M. C., Lin C., Vaughan M. // *Adv. Cyclic Nucleotide Prot. Phosphoryl. Res.* 1984. V. 16. P. 291–302.
8. Beavo J. A., Hansen R. S., Harrison S. A., Hurvitz R. L., Martins T. J., Mumby M. C. // *Mol. Cell. Endocrinol.* 1982. V. 28. № 2. P. 384–410.
9. Couchie D., Petridis E. G., Jastorff B., Erneux C. // *Eur. J. Biochem.* 1983. V. 136. № 3. P. 571–575.
10. Erneux C., Miot F., Van Haastert P. J. M., Jastorff M. // *J. Cyclic Nucleotide Prot. Phosphoryl. Res.* 1985. V. 10. № 6. P. 463–472.
11. Thompson W. J., Ross C. P., Pledger W. J., Strada S. J. // *J. Biol. Chem.* 1976. V. 251. № 16. P. 4922–4929.
12. Sunderg L., Porath J. // *J. Chromatogr.* 1974. V. 90. № 1. P. 87–98.
13. Thompson W. J., Appleman M. M. // *Biochemistry.* 1971. V. 10. № 2. P. 311–316.
14. Laemmli V. K. // *Nature.* 1970. V. 227. № 5259. P. 680–684.
15. Bradford M. M. // *Anal. Biochem.* 1976. V. 72. № 1. P. 248–254.

Поступила в редакцию

9.XII.1986

После доработки

28.III.1987

KINETIC PROPERTIES AND REGULATION OF THE CYCLIC
NUCLEOTIDE PHOSPHODIESTERASES FROM LYMPHOID CELLS

AZHAYEVA E. V., SEVERIN E. S.*

N. D. Zelinsky Institute of Organic Chemistry;
**Institute of Molecular*
Biology, Academy of Sciences of the USSR, Moscow

cGMP-dependent cyclic nucleotide phosphodiesterases have been isolated from spleen lymphocytes and the whole mice spleen and shown to possess identical properties. Two structure analogues of cAMP and cGMP, viz. N⁶,O^{2'}-dibutyryl-cAMP and N²,O^{2'}-dibutyryl-cGMP, were used to investigate the properties of the phosphodiesterase and found to inhibit hydrolysis of both cAMP and cGMP. This inhibition did not affect the cGMP activation constant. Existence of two different centres of catalytic and regulatory types in cGMP-stimulated phosphodiesterase is suggested.