

Идентификация фосфодиэстеразы цАМФ, чувствительной к ионам Ca^{2+} и кальмодулину, и ее возможная роль во взаимодействии аденилатциклазной системы с фитогормонами

И. В. Драговоз, В. К. Яворская, Ю. П. Мельничук

Институт физиологии растений и генетики НАН Украины
252022, Киев, ул. Васильковская, 31/17

*В двухсуточных проростках ржи (*Secale cereale* sp.) идентифицирована фосфодиэстераза (ФДЭ) цАМФ, чувствительная к метилксантинам, ионам Ca^{2+} и кальмодулину, аналогичная ферменту животных клеток. В системе *in vitro* продемонстрированы регуляторные эффекты цитокининов и абсцизовой кислоты на ФДЭ цАМФ. Сделано предположение о возможной роли фермента метаболизма цАМФ во взаимодействии аденилатциклазной системы с фитогормонами.*

Введение. Гормональный сигнал передается на генном животных клеток с помощью вторичных посредников, усиливающих этот сигнал [1]. Наиболее изученными среди них являются цАМФ, цГМФ, а также Ca^{2+} , действие которого реализуется с участием Ca^{2+} -связывающего белка кальмодулина или без него. Наряду с этим в клетках животных функционируют и другие вторичные посредники — инозитолтрифосфат и диацилглицерол, действующие совместно как с Ca^{2+} , так и с цАМФ-зависимыми рецепторными системами [2].

К работе этих «усилителей» причастен ряд рецепторных и сопрягающих белков (в первую очередь ГТФ-связывающих), обеспечивающих за счет белок-белкового взаимодействия передачу и параметры активации клетки [3].

Внешние сигналы, в том числе фитогормоны, регулируют различные процессы растительных клеток. Однако биохимический механизм преобразования этих сигналов, включающий функционирование вторичных посредников, изучен недостаточно. Сравнительно недавно установлено, что в опосредовании сигналов клеток растений участвуют ионы Ca^{2+} , а аналогичная функция цАМФ долгое время считалась спорной [4]. Имеются дан-

ные о том, что Ca^{2+} регулирует активность более десяти «рецепторных» ферментов, которые рассматриваются как своеобразные «молекулярные мишени», способствующие реализации эффекта внешних сигналов [3]. Одним из них является фосфодиэстераза цАМФ (ФДЭ) с низким сродством к цАМФ ($K_m \approx 10^{-4}$ М), регулируемая комплексом Ca^{2+} — кальмодулин. Этот фермент достаточно основательно исследован в клетках животных, и лишь отдельные публикации указывают на возможность существования аналогичной формы в клетках растений [2, 5].

ФДЭ растений отличаются большим разнообразием как в отношении рН-оптимума реакции разложения субстрата, так и чувствительности к дивалентным ионам (Mg^{2+} , Mn^{2+}) и метилксантинам. Большинство из них проявляло активность при кислотных значениях рН и, в отличие от животных ФДЭ, являлось неспецифичным к цАМФ как к субстрату. Некоторые из этих ферментов в той или иной мере были чувствительными к комплексу Ca^{2+} — кальмодулин [6], но детального изучения регуляции ферментов этим комплексом не проводилось. Можно лишь предполагать, что общность биохимических механизмов регуляции разнообразных процессов в клетках животных и растений обусловлена зависимостью активности этого фер-

мента от ионов кальция. Особый интерес представляет исследование участия Ca^{2+} — кальмодулин-зависимой ФДЭ в молекулярных механизмах действия фитогормонов.

В связи с этим цель нашей работы состояла в выделении, очистке и исследовании свойств ФДЭ цАМФ, чувствительной к ионам Ca^{2+} и кальмодулину, а также в изучении характера взаимодействия между ней и фитогормонами противоположного физиологического действия, в частности, абсцизовой кислотой и цитокинином.

Материалы и методы. В качестве объекта исследования использовали двухдневные проростки озимой ржи (*Secale cereale* sp.) сорта Вятка-2, выращенные в термостате в стерильных условиях при температуре 24 ± 1 °С. Фермент выделяли с помощью метода, основанного на фракционировании белков $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ и очистке соответствующей фракции ионообменной хроматографией [7]. Для этого навеску растительного материала (10—15 г) гомогенизировали в буферном растворе: (10 мМ трис-НCl, рН 7,4, 2 мМ MgCl_2 , 2 мМ ЭДТА, 2 мМ β -меркаптоэтанол, 0,5 мМ ФМСФ (буфер А). Гомогенат центрифугировали (70 000 г, 1 ч), а супернатант фракционировали сульфатом аммония (от 0 до 50 % и от 50 до 80 % насыщения). Поскольку основная масса ФДЭ-белка осаждалась в интервале насыщения от 50 до 80 %, эту фракцию концентрировали центрифугированием (20 000 г, 20 мин), растворяли в минимальном объеме буфера для экстракции и диализовали в течение 16 ч для удаления $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Отдиализованный раствор использовали для дальнейшей очистки фермента методом ионообменной хроматографии на колонках с ДЭАЭ-целлюлозой (16 × 1,5 ДЭ-52, «Sigma», США). Элюцию проводили линейным градиентом KCl (0—1 М) в буфере для экстракции (буфер А). Отдельные фракции концентрировали с помощью повторного высаливания до 80 % насыщения $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Активность ФДЭ определяли микрометодом, описанным Гулиевым и соавт. [8]. Концентрацию белка определяли по Лоури [9]. Фермент инкубировали в среде следующего состава: 10 мМ трис-НCl, рН 7,2, 20 мМ MgCl_2 , 0,5—3 мМ цАМФ («Serva», ФРГ), $0,04 \cdot 10^{11}$ Бк ^3H -цАМФ на пробу (удельная активность $1377 \cdot 10^{11}$ Бк/мМ) и белок в концентрации 10—40 мкг на пробу. Радиоактивность проб подсчитывали на жидкостном сцинтилляционном счетчике с автоматическим дрп-процессором («Бета-2», Украина). В качестве модифицирующих активность ФДЭ добавок в работе использовали следующие соединения: теофиллин («Serva»), ЭГТА («Sigma»), кальмодулин из сердца быка («Amersham», Анг-

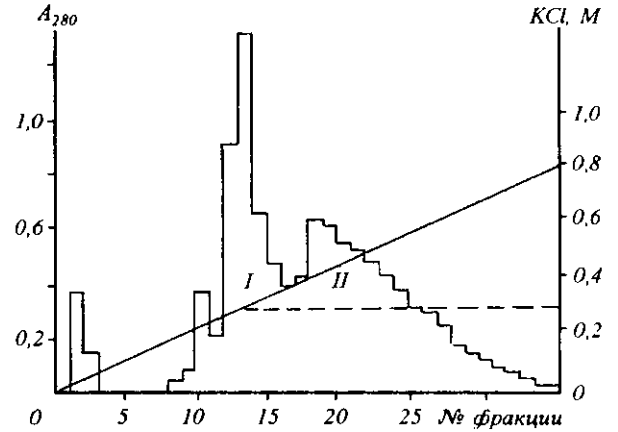


Рис. 1. Профиль элюции белковой фракции (50—80 % насыщения сульфатом аммония) линейным градиентом KCl (0—0,8 М) с колонки, заполненной ДЭАЭ-целлюлозой; объем фракции 3 мл, размер колонки 1,6 × 20 см

лия), хлорпромазин («Sigma»), зеатин («Serva»), абсцизовая кислота (АБК) («Calbiochem», США), CaCl_2 (осч, «Реахим», СССР).

Результаты и обсуждение. После очистки белковой фракции, высаливающейся при 50—80 % от насыщения $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ на колонках с ДЭАЭ-целлюлозой, обнаружены две фракции, проявляющие фосфодиэстеразную активность. Первая белковая фракция элюировалась ионной силой ≈ 300 мМ KCl и выходила в объеме 15 мл (рис. 1). Вторая фракция белков элюировалась 425 мМ KCl и выходила в объеме, значительно превышающем объем первой фракции. Согласно литературным данным

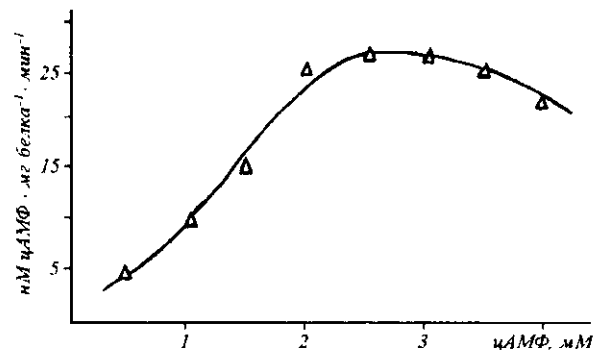


Рис. 2. Зависимость активности щелочной формы ФДЭ, выделенной из проростков ржи, от концентрации субстрата

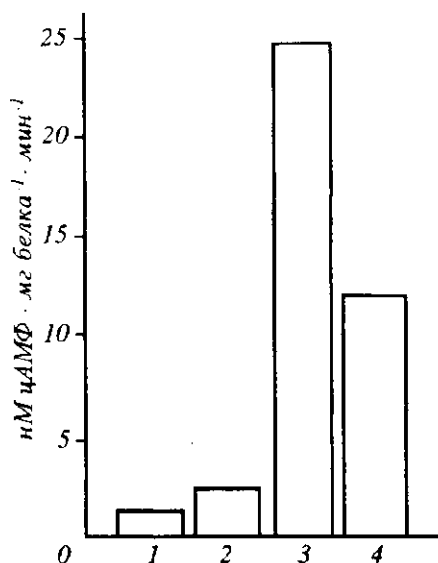


Рис. 3. Влияние ионов Ca^{2+} и кальмодулина на активность щелочной формы ФДЭ цАМФ: 1 — + ЭГТА (1 мМ); 2 — + ЭГТА (1 мМ) + кальмодулин (6 мкМ); 3 — + Ca^{2+} (10 мМ) + кальмодулин (6 мкМ); 4 — + Ca^{2+} (100 мкМ) + кальмодулин (2 мкМ)

[10], первая фракция содержит основную массу фосфодиэстеразного белка. С помощью электрофореза в денатурирующих условиях установлена ее значительная гетерогенность. Молекулярная масса белков первой фракции составляла от 20 до 70 кДа. По-видимому, молекулярная масса ФДЭ, регулируемой комплексом Ca^{2+} — кальмодулин, находится в пределах 50—60 кДа [11]. Чтобы не потерять регуляторных компонентов ФДЭ в процессе дальнейшей очистки, мы остановились на этой стадии и далее работали лишь с частично очищенным ферментом. Для тестирования формы ФДЭ, специфически разрушающей 3',5'-цАМФ и чувствительной к ионам Ca^{2+} и кальмодулину, реакцию проводили при pH 7,2 и наличии в среде ионов Mg^{2+} , т. е. при условиях, оптимальных для ее выявления [12].

Далее исследовали кинетические параметры фермента, рассчитанные методом нелинейного регрессионного анализа с помощью ПЭВМ [13]. Максимальная активность ФДЭ наблюдалась при концентрации субстрата 1,5—2,5 мМ, K_m для 3',5'-цАМФ составляла 2,9 мМ, максимальная скорость ферментативной реакции (V_{max}) — 72 нМ · мг⁻¹ · мин⁻¹ (рис. 2).

Дальнейшая работа была направлена на исследование аллостерической регуляции активности

фермента с помощью кальмодулина и ионов Ca^{2+} (рис. 3). Видно, что при добавлении в среду ионов Ca^{2+} (10 мкМ) совместно с кальмодулином активность фермента повышалась в несколько раз. В присутствии в среде хелатирующего агента ЭГТА (1 мМ), избирательно связывающего ионы Ca^{2+} , активность ФДЭ резко уменьшалась и практически равнялась нулю. При повышении концентрации ионов Ca^{2+} (до 100 мкМ) с одновременным уменьшением концентрации кальмодулина (до 2 мкМ) активность ФДЭ снижалась.

Очевидно, в молекуле кальмодулина из сердца быка, в структурном отношении идентичном растительному [14], находятся определенные участки с различным сродством к Ca^{2+} . Аналогичный механизм регуляции активности ФДЭ может иметь место и в условиях интактной растительной клетки при действии эндогенного кальмодулина. О существовании такого механизма регуляции свидетельствуют также данные, полученные при внесении в среду хлорпромазина, антагониста кальмодулина. Видно, что хлорпромазин одинаково эффективно

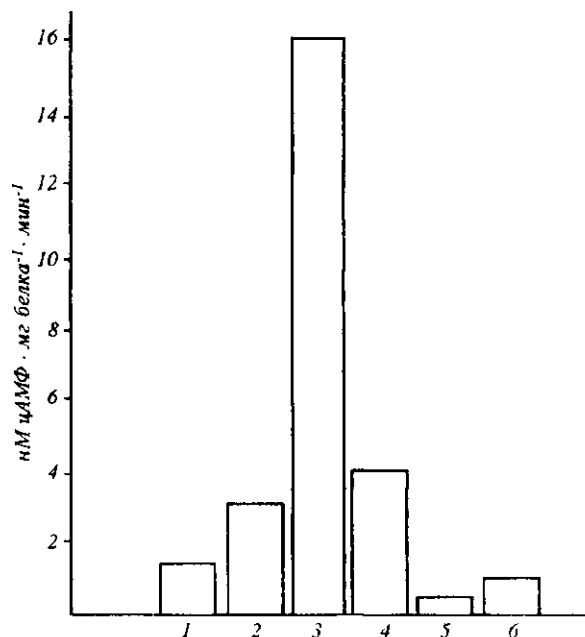


Рис. 4. Влияние ионов Ca^{2+} , кальмодулина и хлорпромазина на активность щелочной формы ФДЭ циклического АМФ: 1 — контроль; 2 — + Ca^{2+} (10 мкМ); 3 — + Ca^{2+} (10 мкМ) + кальмодулин (6 мкМ); 4 — + Ca^{2+} (10 мкМ) + хлорпромазин (1 мМ); 5 — + хлорпромазин (1 мМ); 6 — + хлорпромазин (0,5 мМ)

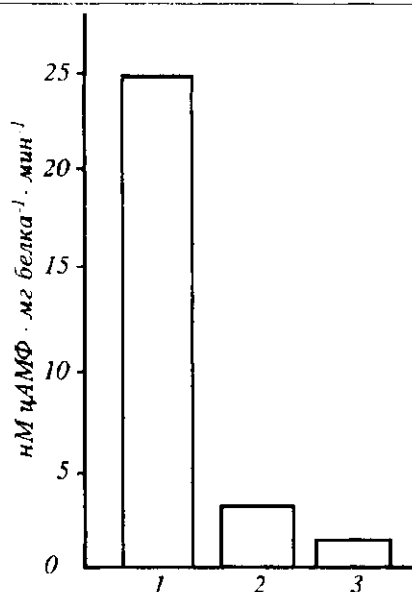


Рис. 5. Влияние теофиллина на активность щелочной формы фосфодиэстеразы цАМФ: 1 — контроль; 2 — + теофиллин (8 мМ); 3 — + теофиллин (8 мМ) + ЭГТА (1 мМ)

ингибирует активность фосфодиэстеразы как в вариантах без кальмодулина, так и при наличии его в среде (рис. 4).

Очевидно, в первом случае в пробах содержится кальмодулин растительного происхождения, который подобно аналогичному аллостерическому регулятору из сердца быка, блокируется хлорпромазином. Как видно из рис. 5, эта форма ФДЭ оказалась чувствительной и к метилксантинам, в частности теофиллину.

Одновременное внесение в среду инкубации теофиллина и хелатирующего агента увеличивало ингибирующий эффект, вероятно, вследствие их аддитивного действия. Эффективным ингибитором этой ФДЭ оказался и цитокинин зеатин (рис. 6). Максимальный (78 %) ингибирующий эффект зеатина наблюдался при его концентрации в среде 10^{-5} М, т. е. на уровне эндогенных цитокининов в компартментах клетки [15].

Аналогичный ингибирующий эффект зеатина на форму ФДЭ с широкой субстратной специфичностью, выделенную из гипокотилей салата, достигался при более высоких концентрациях гормона ($2 \cdot 10^{-5}$ М) [16]. Эффект же синтетических цитокининов в этом случае проявлялся при значительно более высоких ($5 \cdot 10^{-4}$ М) «фармакологических» концентрациях [17].

Вероятно, выделенная нами форма фермента отличается от мультифункциональной ФДЭ из гипокотилей салата как субстратной специфичностью, так и чувствительностью к эффекторам, в роли которых могут выступать цитокинины. В связи с полученными данными представляло интерес исследование эффекта фитогормона противоположного физиологического действия. Добавление в среду инкубации АБК в 2—9 раз повышало активность этой ФДЭ (см. рис. 6). Максимальная активация фермента наблюдалась при концентрации фитогормона в среде инкубации 10^{-6} М. Аналогичный эффект (в присутствии содержащей кальмодулин фракции) оказывала АБК на активность ФДЭ проростков фасоли [18]. По-видимому, ФДЭ-содержащая фракция белка, выделенная нами, содержала эндогенный кальмодулин, оказывающий вместе с АБК стимулирующий эффект, аналогично эффекту Ca^{2+} — кальмодулина.

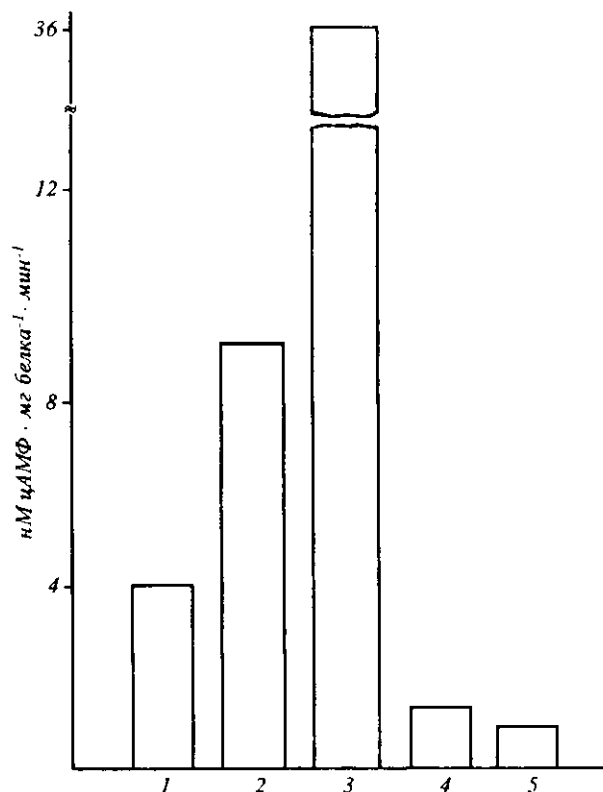


Рис. 6. Влияние различных концентраций абсцизовой кислоты и зеатина на активность щелочной формы фосфодиэстеразы цАМФ: 1 — контроль; 2 — + АБК (10^{-5} М); 3 — + АБК (10^{-6} М); 4 — + зеатин (10^{-5} М); 5 — + зеатин (10^{-4} М)

Таким образом, в системе *in vitro* нами показаны возможные регуляторные эффекты цитокининов и АБК на фосфодиэстеразу цАМФ, чувствительную к комплексу Ca^{2+} — кальмодулин. Полученные данные свидетельствуют о взаимодействии двух систем регуляции, а также об их роли и месте в формировании первичного ответа клетки на различные сигналы внешней среды.

І. В. Драговоз, В. К. Яворська, Ю. П. Мельничук

Идентификация фосфодиэстеразы цАМФ, чувствительной к ионам Ca^{2+} и кальмодулину, та її можлива роль у взаємодії аденілатциклазної системи з фітогормонами

Резюме

У дводобових проростках жита (*Secale cereale* sp.) ідентифіковано фосфодіестеразу цАМФ, чутливу до метилксантинів, іонів Ca^{2+} і кальмодуліну, аналогічну ферментові тваринних клітин. В системі *in vitro* продемонстровано регуляторні ефекти цитокинінів і абсцизової кислоти на ФДЕ цАМФ. Зроблено припущення про можливу роль ферменту метаболізму цАМФ у взаємодії аденілатциклазної системи з фітогормонами.

I. V. Dragovoz, V. K. Javorska, Yu. P. Melnichuk

Identification of Ca^{2+} and calmoduline sensitive cAMP phosphodiesterase (PDE) and its possible role in the interaction of adenylate cyclase system with phytohormones

Summary

cAMP PDE sensitive to methylxanthine, Ca^{2+} ions and calmoduline and similar to animal PDE has been identified in 2 days old rye seedlings (*Secale cereale*). The regulatory effect of cytokinins and abscisic acid on rye PDE has been shown *in vitro*. The conclusion is made on the possible role of cAMP metabolism enzyme in the interrelation of adenylate cyclase system with phytohormones.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Иткес А. В., Туницкая В. Л., Северин Е. С. Регуляция биологической активности клетки системой вторичных мессенджеров: cAMP, 2, 5'-олигоаденилата и кальция // Успехи биол. химии.—1985.—26.—С. 125—152.
2. Северин Е. С., Кочеткова Н. М. Роль фосфорилирования в регуляции клеточной активности.—М.: Наука, 1985.—287 с.
3. Ranjeva R., Boudet A. M. Phosphorylation of protein in plants: regulatory effects and potential involvement in stimulus: Response coupling // Ann. Rev. Plant Physiol.—1987.—38.—Р. 73—93.
4. Newton R. P., Brown E. G. The biochemistry and physiology of cyclic AMP in higher plants // Hormones, receptors and

cellular interaction in plants / Ed. C. M. Chadvik, D. R. Garrod.—Cambridg, 1986.—Р. 115—153.

5. Григорович Ю. А. Кальмодулин- Ca^{2+} -зависимый белковый активатор ФДЭ и других ферментных систем // Успехи биол. химии.—1982.—22.—С. 76—99.
6. Иванов Г. Г., Выхребенцева Э. И. Выделение и краткая характеристика фосфодиэстеразы циклического АМФ и Ca^{2+} -зависимого белкового активатора из корнеплода сахарной свеклы // Физиология растений.—1986.—33, № 1.—С. 5—9.
7. Яворська В. К., Драговоз І. В. та ін. Ідентифікація фосфодіестерази цАМФ, чутливої до йонів кальцію та кальмодуліну, та її можлива роль в процесі пухлинної трансформації рослинних клітин // Физиология и биохимия культ. растений.—1994.—26.—С. 136—141.
8. Гулиев Н. М., Феденко Е. П., Доман Н. Г. Фосфодиэстераза 3,5-АМФ фототрофной бактерии *Rhodospirillum rubrum* // Биохимия.—1976.—41, № 11.—С. 2043—2046.
9. Lowry O. H., Rosenbrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent // J. Biol. Chem.—1951.—193, N 1.—Р. 265—275.
10. Dupon M., Van Onchelen H. A., De Greef J. A. Characterisation of cyclic nucleotide phosphodiesterase activity in *Phaseolus vulgaris* // Physiol. Plant.—1987.—69, N 2.—Р. 361—365.
11. Этингоф Р. Н., Думлер И. Л. Фосфодиэстераза циклических нуклеотидов // Укр. биохим. журнал.—1981.—53, № 2.—С. 29—43.
12. Феденко Е. П., Доман И. Л., Яворская В. К., Проїсер Э. Характеристика двух фракций фосфодиэстеразы циклического АМФ проростков кукурузы и их взаимоотношение с кальмодулином // Физиология растений.—1988.—35, № 1.—С. 98—105.
13. Page A. A non-linear regression program in BASIC for estimation K_m and V_{max} // Cadios commun.—1987.—3, N 1.—Р. 49—51.
14. Dieter P. Calmodulin and calmodulin-mediated processes in plants // Plant Cell Environ.—1984.—7, N 6.—Р. 371—375.
15. Van Staden J., Bosse C. A. Cytokinins in cut carnation flowers. The transport and metabolism of zeatin and dihydrozeatin // J. Plant Physiol.—1990.—135, N 2.—Р. 160—163.
16. Chiatante D., Portello C., Levi M. et al. Inhibition by cytokinins of the activity of a multifunctional phosphodiesterase purified from cotyledons of *Lactuca sativa* // Plant Physiol. Biochem.—1988.—26, N 3.—Р. 297—301.
17. Chiatante D., Newton R. P., Crignola S. et al. The 3',5'-cyclic nucleotide phosphodiesterases of meristematic and differentiated tissues of pea roots // Phytochemistry.—1990.—29.—Р. 2815—2820.
18. Brown E. G., Al-Najafi T., Newton R. P. Cyclic nucleotide phosphodiesterase activity in *Phaseolus vulgaris* // Ibid.—1977.—16, N 9.—Р. 1333-1337.

УДК 577.151.04.581.1:581.54
Поступила в редакцию 07.10.96