

12. Zilber E. A., Penman S. (1971) Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A. 68, 2861—2867.
 13. Davies K. E., Malker J. O. (1978) FEBS Letters 86, 303—306.
 14. Krawozyk Z., Chorazy M. (1978) Acta biochim. polon. 25, 257—271.
 15. Tsai M. J., Schwartz R. J., Tsai S. J. (1975) J. Biol. Chem. 250, 5165—5174.

Лаборатория молекулярной биологии
и биоорганической химии
им. А. Н. Белозерского
Московского государственного университета
им. М. В. Ломоносова

Поступила в редакцию
7.IV.1980

**DEPENDENCE OF RNA SYNTHESIS IN THE CELL CYCLE
OF *PHYSARUM POLYCEPHALUM* ON CONCENTRATION
AND ACTIVITY OF RNA-POLYMERASE II**

KOSTYUCHENKO V. I., KOSTYUCHENKO D. A., KOLOMIJTSHEVA G. YA.
*A. N. Belozersky Laboratory of Molecular Biology and Bioorganic Chemistry,
 M. V. Lomonosov Moscow State University*

The RNA synthesis detected by incorporation of [³H]uridine chase label proceeds in macroplasmidium and in isolated nuclei throughout the cell cycle of a synchronous myxomycetes culture of *Physarum polycephalum*, producing two well-shaped peaks at the postmitotic and premitotic steps. Such RNA synthesis is due to the activity of α -amanitin-sensitive RNA-polymerase II. Concentrations of RNA-polymerase II at various steps of the cell cycle were determined by α -amanitin titration; the specific activity of the enzyme was assayed. The increase in the rate of mRNA synthesis was accompanied by a rise in the concentration and specific activity of the enzyme: for the postmitotic peak, for instance, the corresponding values were about 2—2.5 and 2—4 times as high as the minimum values revealed during the cycle. The results obtained are discussed in terms of transcription control in eukaryotic systems.

УДК 577.157

**УЧАСТИЕ ГУАНИЛОВЫХ НУКЛЕОТИДОВ В РЕГУЛЯЦИИ
АКТИВНОСТИ АДЕНИЛАТИЦИЛАЗЫ СЕРДЦА ИОНАМИ ХЛОРА
ТКАЧУК В. А., АВДОНИН П. В., ПАНЧЕНКО М. П.**

Гуаниловые нуклеотиды усиливают активирующе влияние ионов хлора на аденилатцилазу сарколеммы сердца кролика. Хлорид уменьшает лаг-период в действии на аденилатцилазу гуанил-5'-илимидодифосфата (Gpp(NH)p), негидролизуемого аналога GTP. Обнаружен синергизм в активации аденилатцилазы гуаниловыми нуклеотидами и ионами хлора. Помимо хлорида активность аденилатцилазы в присутствии Gpp(NH)p увеличивали и другие анионы. Активирующий эффект хлорида на аденилатцилазу усиливался под действием как GTP, так и GDP. В отличие от этого GDP полностью подавлял активацию аденилатцилазы изопротеренолом. Предположено, что хлорид способствует образованию комплекса между каталитической субъединицей аденилатцилазы и регуляторным белком независимо от того, какой гуаниловый нуклеотид (GTP, Gpp(NH)p или GDP) находится в нуклеотидсвязывающем центре регуляторного белка.

Активность аденилатцилазы (ATP-пироfosфатлиаза, циклизующая КФ 4.6.1.1) регулируется веществами разной природы: низкомолекулярными и пептидными гормонами, холерным токсином, двухвалентными катионами и ионами фтора [1—6]. Показано, что действие на аденилатцилазу гормонов [1, 2], холерного токсина [3] и ионов Ca^{2+} [4] находится под контролем гуаниловых нуклеотидов. Механизмы взаимодействия между этими регуляторами и гуаниловыми нуклеотидами не установлены. Более детально изучено участие гуаниловых нуклеотидов в регуляции активности фермента гормонами. Считается, что под действием гормонов в регуляторном центре фермента происходит замещение GDP на GTP и это приводит к значительному повышению активности аденилатцилазы [7].

В настоящей работе показано, что влияние хлорида и других анионов на активность аденилатцилазы также опосредуется гуаниловыми нуклеотидами.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Выделение неочищенного препарата мембран из сердца кролика. После декапитации кролика сердце быстро извлекали, промывали охлажденным физиологическим раствором, очищали от жира и удаляли предсердия. Все дальнейшее выделение проводили при 0—5°. Желудочки сердца (4—5 г) разрезали на кусочки и гомогенизировали 1 мин гомогенизатором типа Поттера в 50 мл раствора, содержащего 50 мМ трис-HCl и 1 мМ ЭДТА, pH 7.5. Гомогенат фильтровали через 2 слоя марли и центрифугировали 10 мин при 1000 г. Надосадочную жидкость отбрасывали, а осадок супспендировали с помощью гомогенизатора Поттера в 50 мл среды гомогенизирования и повторно центрифугировали в тех же условиях. Полученный осадок супспендировали в 50 мл среды гомогенизирования и хранили при температуре жидкого азота.

Выделение очищенных плазматических мембранных проводили по раннее описанному методу [8] с некоторыми модификациями. Первые стадии выделения проводили так же, как и при выделении неочищенной мембранный фракции. Осадок после второго центрифугирования супспендировали в среде, содержащей 20 мМ трис-HCl, 1 мМ ЭДТА,

Сокращения: Gpp(NH)p — гуанил-5'-илимидодифосфат, App(NH)p — аденил-5'-илимидодифосфат.

1 М KCl и 0,25 М сахарозу, pH 7,5, и медленно перемешивали в течение 1 ч. После этого суспензию центрифугировали 20 мин при 3000 g, осадок супензировали в 50 мл среды гомогенизирования с помощью гомогенизатора Поттера и вновь центрифугировали 10 мин при 3000 g. Полученный осадок супензировали в среде гомогенизирования и хранили при температуре жидкого азота.

Активность аденилаткиназы измеряли по модифицированному методу Уайта [9]. Инкубацию проводили при 37° в среде (50 мкл), содержащей 50 мМ трис-HCl, pH 7,5, 5 мМ MgCl₂, 0,2 мМ ЭДТА, 1 мМ 3':5'-AMP, 0,1 мМ ATP, 20 мМ креатинфосфат, 0,5 мг/мл креатинкиназы и [α -³²P]ATP, (0,2—0,4) · 10⁶ имп/мин. При определении зависимости активности аденилаткиназы от концентрации хлорида и ацетата калия концентрация ATP в среде инкубации составляла 0,25 мМ. Реакцию начинали добавлением мембранных препаратов (30—40 мкг) и останавливали через 20 мин добавлением 200 мкл 0,5 Н HCl. Затем пробы помещали в кипящую водяную баню на 6 мин, после чего нейтрализовали добавлением 200 мкл 1,5 М имидазола. Содержимое проб наносили на колонки с нейтральной окисью алюминия 3':5'-AMP элюировали 5 мл H₂O непосредственно в сцинтилляционные фланкеры. Радиоактивность во фланкерах определяли в сцинтилляционном счетчике SL 4221 («InterTechnique», Франция) по методу Черенкова. Выход [³²P]3':5'-AMP определяли с помощью [³H]3':5'-AMP. Для этого в пробирки вместо инкубационной среды добавляли по 50 мкл раствора, содержащего [³H]3':5'-AMP (0,02—0,03 мКи на пробу). Эти пробы обрабатывали таким же образом, как и инкубационные. После кипячения в соляной кислоте и нейтрализации содержимое проб с [³H]3':5'-AMP наносили на колонки с нейтральной окисью алюминия и элюировали 5 мл H₂O. Объем каждого элюата доводили до 5 мл; 0,5 мл элюата добавляли во фланкеры, содержащие 10 мл сцинтилляционной жидкости ЖС-8. Радиоактивность определяли в сцинтилляционном счетчике.

Выход 3':5'-AMP составлял 60—90%. Для каждой отдельной партии окиси алюминия выход [³H]3':5'-AMP был постоянным. При изучении временной зависимости активности аденилаткиназы инкубацию проводили в среде объемом 500 мкл при условиях, описанных выше. Количество мембранных белка в среде инкубации составляло 300—400 мкг, а [α -³²P]ATP — (5—6) · 10⁶ имп/мин. Через определенные промежутки времени из инкубационной среды отбирали по 2 пробы объемом 20 мкл и в них определяли содержание 3':5'-AMP по вышеописанному методу.

В опытах по изучению влияния GDP на аденилаткиназу в качестве субстрата использовали App(NH)p, негидролизуемый АТРазами аналог АТР. Это было вызвано необходимостью удаления из среды инкубации АТР-регенерирующей системы, которая способна также катализировать превращение GDP в GTP. В этих опытах инкубацию проводили при 37° в течение 20 мин в среде объемом 150 мкл, содержащей 50 мМ трис-HCl, pH 7,5, 5 мМ MgCl₂, 0,2 мМ ЭДТА и 0,2 мМ App(NH)p. В опытах по изучению влияния GTP на аденилаткиназу для предотвращения гидролиза этого нуклеотида в среде инкубации добавляли регенерирующую систему, содержащую 20 мМ креатинфосфат и креатинкиназу в концентрации 0,5 мг/мл. После окончания реакции герметизированные пробы выдерживали в кипящей водяной бане в течение 3 мин и центрифугировали при 1000 g для осаждения денатурированного белка. Содержание 3':5'-AMP устанавливали с помощью набора реактивов фирмы «Amersham» (Англия).

Все значения активности на рисунках и в таблицах представляют средние величины, полученные из 3—5 параллельных измерений.

Преинкубацию неочищенного мембранных препарата проводили при 37° в течение 10 мин в среде, содержащей 50 мМ трис-HCl, pH 7,5, 5 мМ MgCl₂, 0,2 мМ ЭДТА. После этого суспензию мембран разводили в 5 раз охлажденным буферным раствором, содержащим 20 мМ трис-HCl и 1 мМ ЭДТА, pH 7,5, и центрифугировали 10 мин при 1000 g. Осадок супензировали в этом же буфере и использовали для измерения активности аденилаткиназы.

Другие аналитические методы. Содержание белка определяли по методу Лоуренса и др. [10], предварительно разрушая мембранные 1%-ным раствором дезоксихолата натрия. В качестве стандарта использовали человеческий сывороточный альбумин. Для выяснения точной концентрации MgCl₂ раствор этой соли титровали с эриохромом черного Т [11].

Реактивы. В работе использовали: [α -³²P]ATP, [³H]3':5'-AMP и набор для определения содержания 3':5'-AMP фирмы «Amersham» (Англия); Gpp(NH)p, App(NH)p — фирмы «Boehringer» (ФРГ); GTP, GDP, креатинфосфат, окись алюминия, человеческий сывороточный альбумин — фирмы «Reanal» (Венгрия); изопротеренол — фирмы «Serva» (ФРГ); АТР, 3':5'-AMP, трис — фирмы «Sigma» (США). Остальные реактивы — отечественного производства. Креатинкиназа, обладающая активностью 200—400 МЕ, была выделена из скелетных мышц кролика по методу Четвериковой и др. [12].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

На рис. 1а показана зависимость активности аденилаткиназы неочищенного препарата мембран сердца от концентрации добавленного KCl в среду инкубации. Видно, что при увеличении концентрации KCl в среде инкубации 100—500 мМ происходит увеличение активности аденилаткиназы, изме-

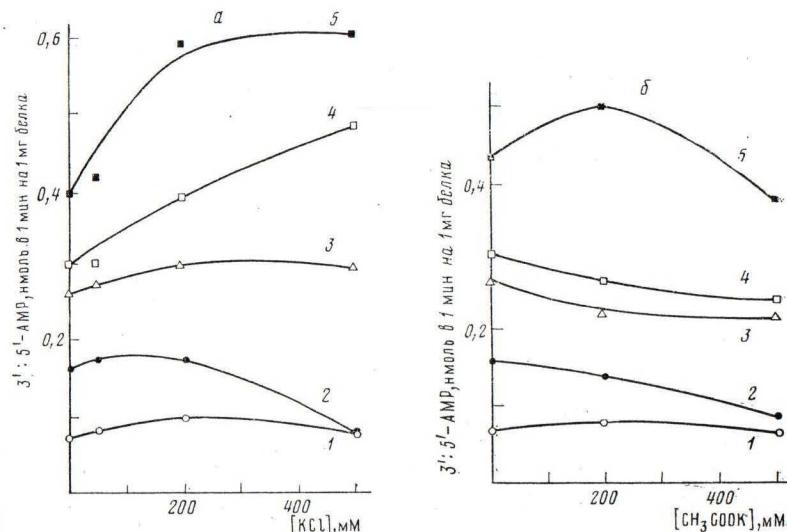


Рис. 1. Влияние хлорида калия (а) и ацетата калия (б) на активность аденилаткиназы в неочищенном мембранный фракции сердца кролика. Активность аденилаткиназы измеряли в отсутствие эффекторов (1) или в присутствии 5 · 10⁻⁵ M изопротеренола (2), 10⁻² M фторида натрия (3), 10⁻⁴ M Gpp(NH)p (4) и 10⁻⁴ M Gpp(NH)p + 5 · 10⁻⁵ M изопротеренола (5)

няемой в присутствии Gpp(NH)p или изопротеренол + Gpp(NH)p. Стимулированная фторидом активность аденилаткиназы изменилась не значительно. Исходная и изопротеренолстимулированная активности аденилаткиназы под действием 50—200 мМ KCl несколько возрастают, а при 500 мМ концентрации хлорида происходит понижение исходной активности и полное устранение действия гормона на фермент.

Аналогичные результаты были получены и при изучении аденилаткиназы препарата мембран, подвергнутых экстракции высокой ионной силой (рис. 2). Удельная активность аденилаткиназы такого препарата была значительно выше в результате удаления части балластных белков [8]. Как видно на рис. 2а, после процедуры очистки происходит резкое снижение активации аденилаткиназы под действием Gpp(NH)p, однако под действием хлорида Gpp(NH)p-стимулированная активность значительно увеличивалась — от 0,6 до 1,7 нмоль 3':5'-AMP на 1 мг белка в 1 мин. Под влиянием хлорида исходная и стимулированная изопротеренолом активности изменились так же, как и в неочищенном мембранным препарате (рис. 1а и 2а): при увеличении концентрации хлорида до 200 мМ эти активности возрастают, а затем снижаются. В обоих препаратах мембран KCl вызывает уменьшение активации аденилаткиназы изопротеренолом. Фторидстимулированная активность аденилаткиназы очищенного препарата мембран незначительно возрастала при низких концентрациях хлорида, а в присутствии 500 мМ KCl понижалась. При сравнении данных, представленных на рис. 1а и 2а, видно, что общим свойством аденилаткиназы в очищенных мембранах и неочищенном мембранным препарате является увеличение Gpp(NH)p-стимулированной активности под действием хлорида.

Для выяснения вопроса о том, не связан ли эффект хлорида калия на Gpp(NH)p-стимулированную активность с повышением ионной силы раствора, была определена зависимость активности аденилаткиназы от концентрации ацетата калия. На рис. 1б видно, что ацетат калия

Таблица 2

Влияние преинкубации мембран на аденилатцилазу неочищенной мембранный фракции (37°, 10 мин)

Условия инкубации	3':5'-AMP, пмоль в 1 мин на 1 мг белка		
	до преинкубации	после преинкубации	
	исходная активность	10 ⁻⁴ М Gpp(NH)p	
Без добавок 200 мМ KCl	51,6±3,4 76,3±4,1	301±13 393±4	52,4±1,0 71,0±0,4
			229±2 400±18

ходную активность увеличивали только азид, хлорид и бромид (соответственно на 140, 35 и 15%). Нитрат незначительно уменьшал исходную активность аденилатцилазы, а йодид и сульфат оказывали очень сильное ингибирующее действие. Таким образом, эффект хлорида, по-видимому, отражает чувствительность аденилатцилазы к широкому классу анионов.

Как видно из сравнения данных, представленных на рис. 1а и 2а, увеличение Gpp(NH)p-стимулированной активности аденилатцилазы под влиянием хлорида проявляется значительно сильнее в случае мембранных препаратов, экстрагированных раствором высокой ионной силы, чем при использовании препаратов неочищенных мембран. Оказалось, что преинкубация аденилатцилазы в буферном растворе при 37° в течение 10 мин также увеличивает активирующий эффект хлорида на Gpp(NH)p-стимулированную активность аденилатцилазы. Как следует

Рис. 2. Влияние хлорида калия (а) и ацетата калия (б) на активность аденилатцилазы в препарате очищенных мембран сердца кролика. Активность аденилатцилазы изменилась в отсутствие эффекторов (1) или в присутствии 5·10⁻⁵ М изопротеренола (2), мерапирина (3), 10⁻² М фторида натрия (4) и 10⁻⁴ М Gpp(NH)p+5·10⁻⁵ М изопротеренола (5).

подавляет активацию аденилатцилазы изопротеренолом и понижает фторидстимулированную активность аденилатцилазы. Возможно, что эти эффекты, присущие как хлориду калия, так и ацетату калия, обусловлены действием ионов калия и связаны с повышением ионной силы раствора. Как видно из рис. 1б и 2б, Gpp(NH)p-стимулированная активность аденилатцилазы под влиянием ацетата калия не возрастила, а несколько снизилась. Таким образом, активирующее действие хлорида калия не связано с повышением ионной силы раствора. Кроме того, эти данные свидетельствуют о том, что увеличение Gpp(NH)p-стимулированной активности под влиянием KCl обусловлено действием ионов хлора, а не калия.

В табл. 1 приведены данные о влиянии различных солей калия и натрия на исходную и Gpp(NH)p-стимулированную активности аденилатцилазы. Из этих данных видно, что увеличение Gpp(NH)p-стимулированной активности происходит под влиянием не только хлорида, но и иных солей. Наибольшим активирующим действием среди ионов обладают хлорид, бромид, нитрат и азид. Из всех изученных солей ис-

Таблица 1

Влияние различных солей калия и натрия на активность аденилатцилазы в отсутствие и в присутствии Gpp(NH)p
Концентрация сульфатов калия и натрия — 100 мМ; все остальные соли в 200 мМ концентрации

Соли	3':5'-AMP, пмоль в 1 мин на 1 мг белка		Соли	3':5'-AMP, пмоль в 1 мин на 1 мг белка	
	исходная активность	10 ⁻⁴ М Gpp(NH)p		исходная активность	10 ⁻⁴ М Gpp(NH)p
Без добавок	52,4±1,0	229±2	K ₂ SO ₄	27,2±1,1	301±4
KCl	71,0±0,4	400±18	NaCl	64,3±1,2	373±11
KBr	60,7±1,4	454±14	NaN ₃	125±4	487±13
KI	17,4±0,6	310±8	Na ₂ SO ₄	28,2±1,1	297±8
KNO ₃	46,7±0,3	446±4			

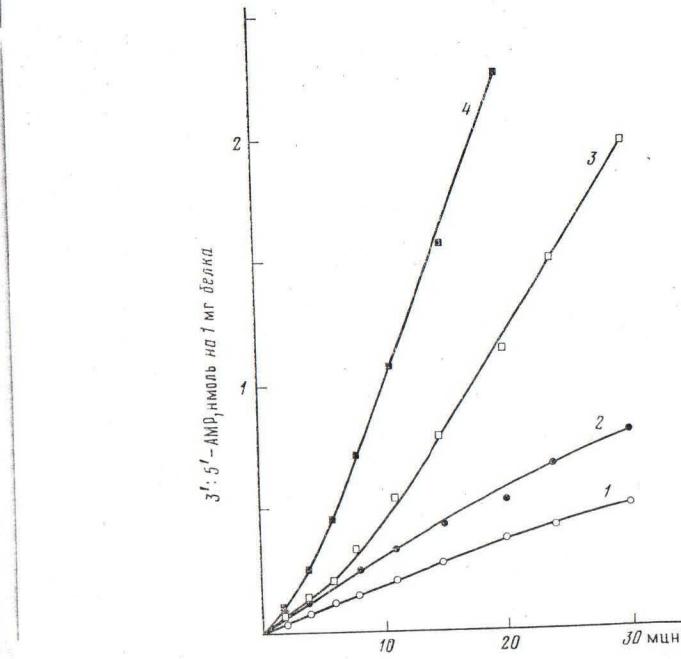


Рис. 3. Зависимость образования 3':5'-AMP от времени инкубации аденилатцилазы. 1 — в отсутствие эффекторов, 2 — 10⁻⁴ М Gpp(NH)p, 3 — 10⁻⁴ М Gpp(NH)p+200 мМ KCl, 4 — 10⁻⁴ М Gpp(NH)p+200 мМ KCl

Таблица 3

Влияние GDP на активацию аденилаткиназы изопротеренолом и хлоридом калия

Условия инкубации	3':5'-AMP, пмоль в 1 мин на 1 мг белка	
	без добавок	10 ⁻⁴ М GDP
Исходная активность	8,41±0,53	11,9±1,3
5·10 ⁻⁶ М изопротеренол	43,3±0,1	12,4±1,4
200 мМ KCl	15,1±0,1	21,9±0,7

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Приведенные в работе данные показывают, что хлорид калия и ряд других солей усиливают активацию аденилаткиназы сердца гуаниловыми нуклеотидами. Активирующий эффект обусловлен действием анионов, а не катионов, входящих в состав солей. Об этом свидетельствует то, что ацетат калия в отличие от хлорида калия, не увеличивал Gpp(NH)p-стимулированную активность аденилаткиназы (рис. 1 и 2), а замена хлорида калия на хлорид натрия не изменяла степени активации аденилаткиназы Gpp(NH)p (табл. 1).

Из ряда исследованных анионов по характеру действия на аденилаткиназу существенно выделяются ионы фтора. Под влиянием анионов, приведенных в табл. 1, увеличивается активация аденилаткиназы Gpp(NH)p, в то время как фторид подавляет Gpp(NH)p-стимулированную активность аденилаткиназы [15]. Свобода и Кристофф [16], изучавшие аденилаткиназу поджелудочной железы, показали, что хлорид и азид в несколько раз повышают фторидстимулированную активность аденилаткиназы, но в значительно меньшей степени увеличивают исходную активность фермента. Эти результаты также свидетельствуют, что указанные выше анионы и фторид действуют на разные участки аденилаткиназного комплекса.

Согласно модели Касселя и Селинджера [7], неактивная аденилаткиназа содержит в регуляторном центре GDP, а гормоны переводят аденилаткиназу в активное состояние путем замещения GDP на GTP. После связывания в регуляторном центре GTP гидролизуется специфической ГТРазой до GDP и P_i, в результате чего аденилаткиназа вновь переходит в неактивное состояние. Исходя из этой модели, суммарная активность аденилаткиназы определяется долей активных молекул фермента. Gpp(NH)p переводит аденилаткиназу в состояние с максимальной активностью, поскольку ГТРаза не может гидролизовать этот аналог GTP. Лаг-период в действии Gpp(NH)p на аденилаткиназу объясняется медленным вытеснением GDP из регуляторного центра. Гормон, облегчая замещение нуклеотидов, сокращает или полностью устраняет лаг-период в действии Gpp(NH)p [7, 13].

Под влиянием хлорида лаг-период в действии Gpp(NH)p на аденилаткиназу также уменьшается (рис. 3). Это означает, что хлорид ускоряет переход аденилаткиназы из низкоактивного в высокоактивное состояние, происходящий под действием Gpp(NH)p. Для обсуждения механизма действия хлорида необходимо рассмотреть последние данные о молекулярной организации аденилаткиназного комплекса в мемbrane. В настоящее время можно считать доказанным, что регуляция аденилаткиназы гуаниловыми нуклеотидами опосредуется специфическим мембранным белком (G-белок), связывающим гуаниловые нуклеотиды. Показано, что при связывании GTP или его аналогов G-белок образует комплекс с каталитической субъединицей аденилаткиназы и тем самым переводит фермент в активное состояние [17]. Поскольку эффект GTP обратим, а G-белок является ГТРазой, предполагается, что гидролиз GTP до GDP приводит к немедленному распаду каталитически активного комплекса (рис. 4). Согласно этой концепции, роль гормон-рецепторного комплекса в регуляции активности аденилаткиназы сводится лишь к замещению GDP на GTP в нуклеотидсвязывающем центре G-белка [17].

Следовательно, GDP должен подавлять гормональную активацию аденилаткиназы. Действительно, GDP полностью устраивает активирующее действие изопротеренола на аденилаткиназу сердца (табл. 3). В отличие от эффекта гормона действие хлорида на аденилаткиназу не подавлялось под влиянием GDP, а в некоторых случаях GDP даже усиливал активирующий эффект хлорида (табл. 4). В отношении акти-

из данных, приведенных в табл. 2, после преинкубации исходная активность фермента не изменяется, а активация аденилаткиназы под действием Gpp(NH)p выражена в меньшей степени. Однако в присутствии KCl эффективность стимулирующего действия Gpp(NH)p на активность аденилаткиназы повышается и достигает того же уровня, как и в случае действия на активность фермента до преинкубации. Поскольку данная преинкубация представляла собой лишь прогревание мембран при 37° в течение 10 мин, можно думать, что влияние анионов на аденилаткиназу зависит от структуры белок-липидного аденилаткиназного комплекса.

Согласно литературным данным, активация аденилаткиназы под действием Gpp(NH)p развивается с лаг-периодом и сохраняется даже после тщательного отмытия фермента от избытка нуклеотида [13]. В присутствии гормона эффект Gpp(NH)p на аденилаткиназу развивается быстрее (лаг-период в действии Gpp(NH)p на аденилаткиназу уменьшается или исчезает вовсе [13]). Гормоны могут также увеличивать степень активации аденилаткиназы при действии Gpp(NH)p [7]. В наших опытах активация аденилаткиназы сердца Gpp(NH)p также осуществлялась с лаг-периодом, равным ~10 мин, после чего фермент переходил в стационарное состояние с высокой активностью (рис. 3). Хлорид калия несколько сокращал лаг-период в действии Gpp(NH)p на аденилаткиназу и значительно увеличивал активность фермента в стационарном состоянии (рис. 3, кривая 4). В отсутствие Gpp(NH)p хлорид также активировал аденилаткиназу (рис. 3, кривая 2). Таким образом, есть определенное сходство в действии хлорида и гормона на аденилаткиназу как в присутствии Gpp(NH)p, так и в его отсутствие.

Для сравнения эффектов хлорида и гормона было исследовано их влияние на аденилаткиназу в присутствии других гуаниловых нуклеотидов. Ранее было показано, что активация аденилаткиназы катехоламинами подавляется под действием GDP [14]. По нашим данным, GDP также устранил активацию аденилаткиназы изопротеренолом (табл. 3). В отличие от этого GDP не подавлял активацию аденилаткиназы хлоридом. В некоторых случаях GDP даже усиливал активирующую эффект хлорида, причем в такой же степени, как и GTP (табл. 4).

вации аденилатциклизы ионами хлора мы не обнаружили качественных различий в действии GDP, GTP и Gpp(NH)p. Эти данные позволяют критически рассмотреть положение о том, что аденилатциклиза, содержащая в своем регуляторном центре GDP, каталитически неактивна.

Согласно изложенной выше модели, гидролиз GTP приводит к немедленному распаду комплекса между G-белком и каталитической субъединицей, в результате чего аденилатциклиза переходит в неактивное состояние (рис. 4). Наши данные (табл. 3 и 4) об активации аденилатциклизы под действием GTP позволяют предполагать, что после гидролиза GTP образуется промежуточный комплекс между каталитической субъединицей (C) и G-белком, имеющим в своем составе GDP (комплекс

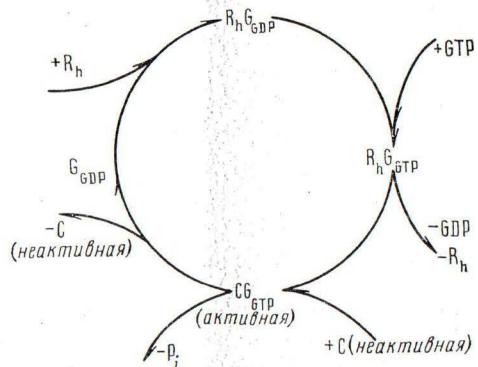


Рис. 4. Модель регуляции активности аденилатциклизы гуаниловыми нуклеотидами по Пфойфферу [17]. Rh — гормон-рецепторный комплекс, G — GTP-связывающий белок, C — каталитическая субъединица аденилатциклизы

лекс C·G_{GDP}). Если распад этого каталитически активного комплекса является обратимым процессом, то активация аденилатциклизы под действием GDP может объясняться стабилизацией комплекса C·G_{GDP}. Согласно такой гипотезе, хлорид может сдвигать равновесие в сторону образования комплекса между каталитической субъединицей аденилатциклизы и G-белком независимо от того, какой гуаниловый нуклеотид (GTP, Gpp(NH)p или GDP) находится в нуклеотидсвязывающем центре G-белка.

ЛИТЕРАТУРА

1. Lefkowitz R. J. (1974) J. Biol. Chem. 249, 6119—6124.
2. Rodbell M., Birnbaumer L., Pohl S. L., Krans H. M. J. (1971) J. Biol. Chem. 246, 1877—1882.
3. Lin M. C., Welton A. F., Berman M. (1978) J. Cycl. Nucl. Res. 4, 159—168.
4. Brostrom M. A., Brostrom C. O., Wolff D. J. (1978) Arch. Biochem. and Biophys. 191, 341—350.
5. Drummond G. I., Duncan L. (1970) J. Biol. Chem. 245, 976—983.
6. Manganiello V. C., Vaughan M. (1976) J. Biol. Chem. 251, 6205—6209.
7. Cassel D., Selinger Z. (1978) Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A. 75, 4155—4159.
8. Ткачук В. А., Балдеников Г. Н. (1978) Биохимия 43, 1097—1110.
9. White A. A. (1974) in Methods in Enzymology (Hardmann J. G. and O'Malley B. W. eds), v. 38C, p. 41—46, Acad. Press, N. Y.
10. Lowry O. H., Roseborough N. J., Farr A. L., Randall R. J. (1951) J. Biol. Chem. 193, 265—275.
11. Пришиб Р. (1960) Комплексы в химическом анализе, с. 304, «Мир», М.
12. Четверикова Е. П., Кринская А. В., Рыбина В. В., Розанова Н. А., Алиевская Л. Л. (1969) в кн. Свойства и функции макромолекул и макромолекулярных систем (ред. Франк Г. М.), с. 111—120, «Наука», М.
13. Salomon Y., Lin M. C., Londos C., Rendell M., Rodbell M. (1975) J. Biol. Chem. 250, 4239—4245.
14. Birnbaumer L., Po-Chang Yang (1974) J. Biol. Chem. 249, 7867—7873.
15. Lefkowitz R. J., Caron M. C. (1975) J. Biol. Chem. 250, 4418—4422.
16. Svoboda M., Cristophe J. (1978) FEBS Letters 86, 230—234.
17. Pfeuffer T. (1979) FEBS Letters 101, 85—89.

Московский государственный университет
им. М. В. Ломоносова

Поступила в редакцию
8.IV.1980

THE ROLE OF GUANYL NUCLEOTIDES IN REGULATION OF ACTIVITY OF HEART ADENYLATE CYCLASE BY CHLORIDE IONS

TKACHUK V. A., AVDONIN P. V., PANCHENKO M. P.

Department of Biochemistry and Laboratory of Enzyme Chemistry,
M. V. Lomonosov Moscow State University

Guanyl nucleotides enhance the activating effect of chloride ions on adenylate cyclase of rabbit heart sarcolemma. Chloride ions decrease the lag period in the effect of guanyl-5'-ylimidodiphosphate (Gpp(NH)p), the non-hydrolyzed analog of GTP, on adenylate cyclase. Guanyl nucleotides and chloride ions exert a synergistic effect on the enzyme activation. The adenylate cyclase activity in the presence of Gpp(NH)p is increased by other anions as well. The activating effect of chloride ions on the enzyme is enhanced by GTP, as well as by GDP. On the contrast, GDP completely inhibits the enzyme activation by isoproterenol. It was assumed that chloride ions favour the formation of a complex between the adenylate cyclase catalytic subunit and the regulatory protein irrespective of the type of guanyl nucleotide, i. e. GTP, Gpp(NH)p or GDP, present in the nucleotide binding site of the regulatory protein.