

磷酸化和脱磷酸化对牛脑 63kD 环核苷酸磷酸二酯酶同工酶活性的调节

张 光 毅

(徐州医学院生化教研室, 徐州 221002)

提 要

本文报道了 CaM 依赖性磷酸化和脱磷酸化对牛脑 63kD PDE 同工酶活性的调节作用。实验结果如下: (1) 在存在 Ca^{2+} 和 CaM 时, 提纯的牛脑 Ca^{2+} /CaM-PK II 能催化牛脑 63kD PDE 同工酶磷酸化, 最大磷酸参入量是 1mol/mol 亚基; (2) 在 Ni^{2+} 和 CaM 存在时, 提纯的牛脑钙调神经磷酸酶能催化磷酸化型 63kD PDE 同工酶脱磷酸化; (3) Ca^{2+} 对磷酸化型 63kD PDE 同工酶的半激活浓度 (AC_{50}) 高于非磷酸化型。

关键词 磷酸化, 脱磷酸化, 牛脑 63kD 环核苷酸磷酸二酯酶 (PDE) 同工酶, 牛脑 Ca^{2+} /CaM-PK II, 钙调神经磷酸酶

环腺苷酸 (cAMP) 在腺苷酸环化酶的催化下于细胞膜内侧以 ATP 为底物环化合成, 而其分解则由细胞内的环核苷酸磷酸二酯酶 (PDE) 催化水解为 5'-AMP。由此可见, PDE 是调节细胞 cAMP 水平的两个关键酶之一。Sharma 等人^[1]曾报道, 牛脑中主要含有两种钙调素 (CaM) 依赖性环核苷酸磷酸二酯酶 (CaM-PDE), 即两个亚基都是 60kD 的 60kD PDE 同工酶和两个亚基都是 63kD 的 63kD PDE 同工酶。63kD PDE 同工酶同时受着 CaM 依赖性磷酸化和 CaM 依赖性脱磷酸化的可逆调节。

虽然 Sharma 等人^[2]曾研究了牛脑 63kD PDE 同工酶的磷酸化作用, 但是, 他们所用的酶制剂是粗酶, 没有提纯和鉴定催化牛脑 63kD PDE 同工酶磷酸化的 CaM 依赖性蛋白激酶。我们已将该粗酶制剂分离成两种不同的 Ca^{2+} 和 CaM 依赖性蛋白激酶 (Ca^{2+} /CaM-dependent protein kinase, Ca^{2+} /CaM-PK), 其分子量分别为 550kD 和 180kD, 并将前者纯化电泳纯,

经鉴定该酶为 Ca^{2+} /CaM-PK II 族^[3]。本文研究了提纯的牛脑 Ca^{2+} /CaM-PK II 催化牛脑 63kD PDE 同工酶磷酸化和牛脑钙调神经磷酸酶 (Calcineurin, CaN) 催化磷酸化型 63kD PDE 同工酶脱磷酸化的可逆调节作用。

材 料 和 方 法

1. 试剂

苯甲基磺酰氟 (PMSF)、苯甲脒、大豆胰蛋白酶抑制剂、 β -巯基乙醇、乙二醇双 (α -氨基乙基) 醚四乙酸 (EGTA)、 CaCl_2 为 Sigma 产品; DEAE-Sepharose CL-6B、Sephacryl S-300、Phenyl-Sepharose CL-4B 和 Phosphocellulose 均系 Pharmacia 产品; (γ - ^{32}P)ATP 系 Amersham 产品。CaM-Sepharose CL-4B 按 Sharma 等方法^[1]制备。

2. 方法

- (1) 牛脑 CaM 按 Sharma 等方法^[2]制备。
- (2) 牛脑 63kD PDE 同工酶按 Sharma 等方法^[1]提纯。

(3) 牛脑 CaN 按 Sharma 等方法^[4]提纯。

(4) 牛脑 Ca^{2+} /CaM-PK II 按 Zhang 等方法^[3]提纯。

(5) 63kD PDE 同工酶活性测定: 按 Sharma 等方法^[2]。反应总体积为 0.9ml, 反应体系中含 40mmol/L Tris-HCl(pH7.5), 5mmol/L MgAC_2 , 0.33U/ml 5'-核苷酸酶, 0.4mg/ml CaM, 不同浓度的 Ca^{2+} ($0-2.0 \times 10^{-6}$ mol/L), 0.2mg/ml 63kD PDE 同工酶。30℃ 水浴予保温 5min 后, 加入终浓度为 1.2mmol/L cAMP 启动反应。继续保温 30min 后, 立即加终浓度为 5.5% TCA 终止反应, 离心, 取 0.5ml 上清液用定磷法测定 PDE 活性。

(6) Ca^{2+} /CaM-PK II 活性测定: 按 Sharma 等方法^[2]。反应总体积为 50 μ l。反应体系中含 100mmol/L Tris-HCl(pH7.0), 5mmol/L LMgCl_2 , 5mmol/L 巯基乙醇, 0.4mg/ml CaM, 0.1mmol/L Ca^{2+} , 0.2mg/ml 63kD PDE 同工酶(底物), 0.1mg/ml Ca^{2+} /CaM-PK II, 加终浓度为 0.2mmol/L ATP (100—200cpm/pmol) 启动反应, 于 30℃ 水浴中进行。根据需要, 在反应不同时间, 取 20 μ l 反应液滴加在滤纸片(2×2cm)上, 立即将滤纸片投入冰冷的 10% TCA-2% 磷酸溶液中洗涤, 重复一次, 再用 5% TCA 溶液洗涤二次, 最后用无水乙醇洗涤一次, 每次各 20min。用电吹风机吹干滤纸片, 于液闪计数器测定放射性强度。

(7) CaN 活性测定: 按 Sharma 等方法^[2]。反应总体积为 0.5ml。反应体系中含 100mmol/L Tris-HCl(pH7.0), 5mmol/L MgCl_2 , 5mmol/L 巯基乙醇, 0.2mg/ml CaM, 0.1mmol/L Ni^{2+} , 50 μ g/ml CaN, 加适量磷酸化型 63kD PDE 同工酶(γ - ^{32}P 标记 PDE 为底物)。在 30℃ 水浴中保温。于反应不同时间, 取 20 μ l 反应液滴加在滤纸片(2×2cm)上, 余下操作同 Ca^{2+} /CaM-PK II 活性测定。

(8) SDS-PAGE 和放射自显影: SDS-PAGE 按 Laemmli 法^[5], 考马斯亮蓝染色, 干胶后, 用 Kodak X-Omat AR 胶片于 -70℃ 进行放射自显影。

(9) 蛋白质浓度测定: 按 Bradford 法^[6], 以牛血清白蛋白为标准。

结 果

1. 牛脑 63kD PDE 同工酶的磷酸化

(1) 牛脑 63kD PDE 同工酶最大磷酸参入量 图 1 表示牛脑 63kD PDE 同工酶在提纯的牛脑 Ca^{2+} /CaM-PK II 催化下磷酸化反应的时间进程。在反应不同时间, 取 20 μ l 反应液测定磷酸参入量。由图 1 看出, 反应 5min 时, 63kD PDE 同工酶的磷酸参入量几乎达到 0.8mol/mol 亚基, 反应 10min 即达到 0.9mol/mol 亚基, 反应 20min 达到最大磷酸参入量 1mol/mol 亚基。延长反应时间, 磷酸参入量不再增加。由此可知, Ca^{2+} /CaM-PK II 催化 63kD PDE 同工酶的最大磷酸参入量为 1mol/mol 亚基。

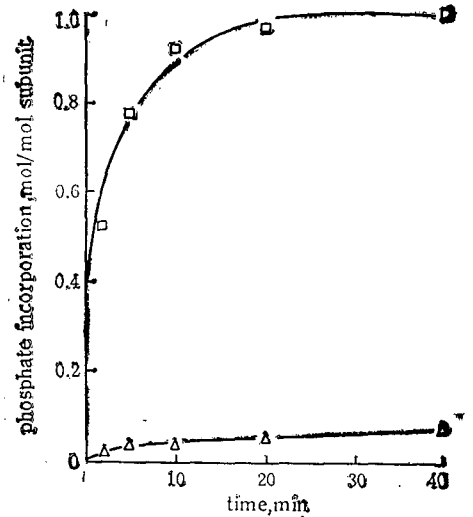


图 1 63kD PDE 同工酶磷酸化反应的时程

Fig. 1 Time course of phosphorylation of 63kD PDE isozyme by Ca^{2+} /CaM-PK II

(□)在 Ca^{2+} 和 CaM 存在时; (Δ) 在无 Ca^{2+} 和无 CaM 存在时 (□) in the presence of Ca^{2+} and CaM; (Δ) in the absence of Ca^{2+} and CaM

(2) 牛脑 63kD PDE 同工酶磷酸化对 Ca^{2+} 和 CaM 的依赖性 图 2 表示, 在不同条件下, 牛脑 Ca^{2+} /CaM-PK II 催化 63kD PDE 同工酶磷酸化后, 经 SDS-PAGE, 再进行放射

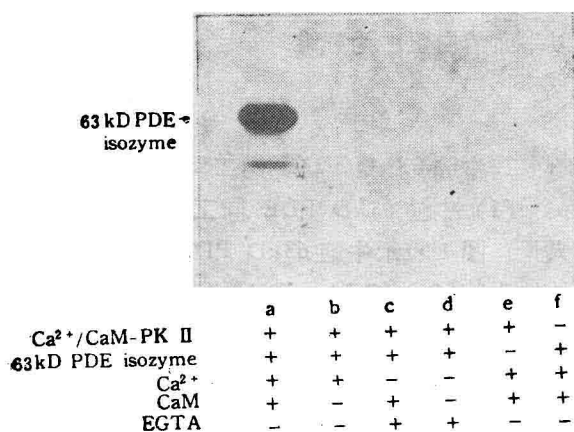


图2 63kD PDE 同工酶磷酸化的放射自显影图
Fig. 2 Autoradiogram of 63kD PDE isozyme phosphorylated by Ca²⁺/CaM-PK II

(+)反应体系含所示各成分; (-)反应体系缺少所示各成分 (+) in the presence of the indicated components; (-) in the absence of the indicated components

自显影的结果。由图2看出,在有Ca²⁺无CaM(图2b)、或无Ca²⁺有CaM(图2c)、或无Ca²⁺无CaM(图2d)时,63kD PDE同工酶均不能被磷酸化;当然,反应体系仅有Ca²⁺/CaM-PK II而无63kD PDE同工酶(图2e),或仅有63kD PDE同工酶而无Ca²⁺/CaM-PK II(图2f)时,在63kD PDE相应的电泳位置也无放射自显影区带。只有在Ca²⁺和CaM同时存在时(图2a),Ca²⁺/CaM-PK II才能催化63kD PDE同工酶磷酸化。由此可见,牛脑Ca²⁺/CaM-PK II催化63kD PDE同工酶磷酸化是Ca²⁺和CaM依赖性的。

图1和图2结果指出,牛脑Ca²⁺/CaM-PK II催化牛脑63kD PDE同工酶磷酸化是依赖于Ca²⁺和CaM的,其最大磷酸参入量是1 mol/mol 亚基。

2. 磷酸化型63kD PDE 同工酶的脱磷酸化

在钙调神经磷酸酶催化下,磷酸化型63kD PDE同工酶可被脱磷酸化。图3表示,随着反应时间的增加,63kD PDE同工酶磷酸参入量逐渐减少。结果还表明,钙调神经磷酸酶的活性是依赖于Ni²⁺和CaM的。

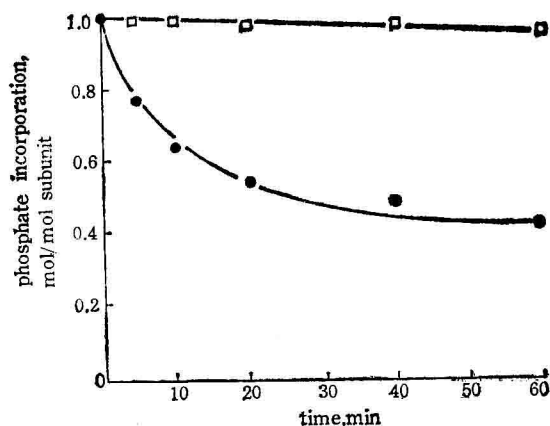


图3 磷酸化型63kD PDE 同工酶脱磷酸化反应的时程
Fig. 3 Time course of dephosphorylation of the phosphorylated 63kD PDE isozyme by calcineurin

(●)反应体系存在Ni²⁺和CaM; (□)反应体系含过量(1mmol/L)EGTA
(●) in the presence of Ni²⁺ and CaM; (□) in the presence of excess EGTA (1mmol/L)

图4表示,在钙调神经磷酸酶催化下,63kD PDE同工酶磷酸参入量随反应时间延长而减少的放射自显影图。由图4可进一步证明,在CaN催化下,磷酸化型63kD PDE同工酶被脱磷酸化。

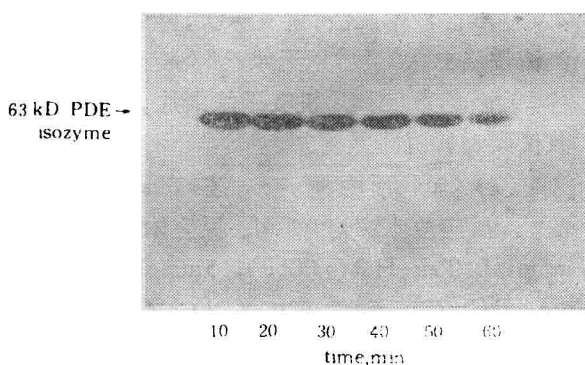


图4 磷酸化型63kD PDE 同工酶脱磷酸化的放射自显影图

Fig. 4 Autoradiogram of dephosphorylation of the phosphorylated 63kD PDE isozyme by calcineurin

3. 磷酸化型63kD PDE 同工酶对Ca²⁺依赖性的变化

我们测定了磷酸化型63kD PDE同工酶活性对Ca²⁺依赖性的变化。由图5可知,在

相同的 CaM 浓度下, 磷酸化型 63kD PDE 同工酶的 Ca^{2+} 半激活浓度 (AC_{50}) 为 $0.78 \mu\text{mol/L}$, 而非磷酸化型 63kD PDE 同工酶的 AC_{50} 为 $0.56 \mu\text{mol/L}$ 。可见, 激活磷酸化型 63kD PDE 同工酶需要更高的 Ca^{2+} 浓度。但是, 结果还表明, 在一定 CaM 浓度下, 适当增加 Ca^{2+} 浓度, 磷酸化型 63kD PDE 同工酶最大酶活性与非磷酸化型相同。

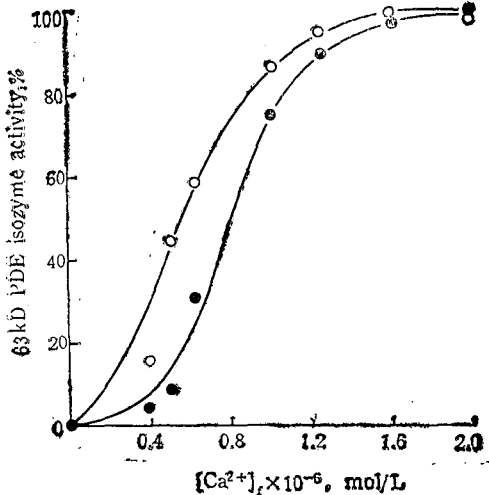


图5 磷酸化型 63kD PDE 同工酶活性对 Ca^{2+} 依赖性的变化

Fig. 5 Change of Ca^{2+} -dependence of the activity of the phosphorylated 63kD PDE isozyme

(○) 非磷酸化型 63kD PDE 同工酶; (●) 磷酸化型 63kD PDE 同工酶

(○) nonphosphorylated 63kD PDE isozyme; (●) phosphorylated 63kD PDE isozyme

讨 论

Sharma 等人^[2]曾报道, 牛脑粗酶催化 63kD PDE 同工酶磷酸化最大磷酸参入量为 2 mol/mol 亚基。本实验结果表明, 提纯的牛脑 Ca^{2+} /CaM-PK II 催化 63kD PDE 同工酶磷酸化, 其最大磷酸参入量仅为 1 mol/mol 亚基。我们由 Sharma 等人使用的粗酶制剂分离成两种不同的 Ca^{2+} /CaM-PK, 除了 Ca^{2+} /CaM-PK II (550kD), 另一种 Ca^{2+} /CaM-PK (180kD) 也能催化 63kD PDE 同工酶磷酸化, 其最大磷酸参入量也为 1 mol/mol 亚基^[3]。但是, 这两种蛋白激酶是否作用于该底物不同位点, 二者协同作

用是否能使最大磷酸参入量达到 2 mol/mol 亚基, 尚待实验证实。

Ca^{2+} 和 CaM 对牛脑 63kD PDE 同工酶的调节作用, 至少涉及到如下三个途径: (1) Ca^{2+} 和 CaM 的激活作用; (2) 依赖于 Ca^{2+} 和 CaM 的磷酸化作用; (3) 依赖于 Ca^{2+} 和 CaM 的脱磷酸化作用。关于该酶依赖于 Ca^{2+} 和 CaM 的磷酸化, Sharma 等人^[2]曾报道, 磷酸化型 63kD PDE 同工酶对 CaM 的亲合力有明显降低。本实验结果表明, Ca^{2+} 对磷酸化型 63kD PDE 同工酶的半激活浓度 (AC_{50}) 增大。可见, 由于该酶的磷酸化, 引起了对 CaM 亲和力的降低, 从而导致该酶对 Ca^{2+} 的敏感性降低。另一方面, 牛脑 Ca^{2+} /CaM-PK II 经自身磷酸化其活性失去对 Ca^{2+} 和 CaM 的依赖性, 因而该酶可在 Ca^{2+} 浓度较低条件下, 催化 63kD PDE 同工酶的磷酸化。其结果是, 在细胞内 Ca^{2+} 浓度较低时, Ca^{2+} /CaM-PK II 催化 63kD PDE 同工酶磷酸化, 磷酸化型 63kD PDE 同工酶对 Ca^{2+} 的敏感性降低, 该酶活性降低, 使 cAMP 分解减少, 有利于细胞内 cAMP 水平的提高, 使细胞由静息状态转向活化状态。

随着细胞内 Ca^{2+} 浓度的增加, 钙调神经磷酸酶被激活, 活化的钙调神经磷酸酶催化磷酸化型 63kD PDE 同工酶脱磷酸化, 导致 63kD PDE 同工酶对 CaM 亲和力增加, 因而提高了该酶对 Ca^{2+} 的敏感性。其结果是, 63kD PDE 同工酶被激活, 活化的 63kD PDE 同工酶催化 cAMP 分解成 5'-AMP, 降低细胞内 cAMP 水平, 使活化的细胞又转向静息状态。

参 考 文 献

- 1 Sharma R K, Wang J H. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1985; 82: 2603
- 2 Sharma R K, Wang J H. *J Biol Chem*, 1986; 261: 1322
- 3 Zhang G Y et al. *FASEB J*, 1988; 2: 4049
- 4 Sharma R K et al. *Methods Enzymol*, 1983; 102: 210
- 5 Laemmli U K. *Nature*, 1970; 227: 680
- 6 Bradford M M. *Anal Biochem*, 1976; 72: 248

[本文于 1990 年 5 月 8 日收到, 8 月 1 日修回]

(Continued on page 298)

CHEMICAL SYNTHESIS AND CLONING OF HUMAN *PLASMODIUM FALCIPARUM* HYBRID PEPTIDE ANTIGEN GENE

Zhong Xionglin* Chen Shirong* Qiu Minyan Wang Changcai*
Min Yongjie Wang Qisong

(Institute of Genetics, Fudan University, Shanghai 200433; *First Medical College
PLA, Guangzhou 510515)

ABSTRACT

Human *P. falciparum* hybrid peptide antigen gene has been synthesized by the solid-phase phosphoramidite method with ABI381A DNA synthesizer. The gene is 216bp in length and divided into 10 fragments to synthesis. All synthetic fragments were annealed and ligated with T4 DNA ligase. The product of synthetic gene was recombined with phage M13 mp18 vector and transfected to *E. coli* JM109. The recombinants were screened by spot hybridization with ³²P-label synthetic fragment. The sequence of synthetic gene was analysed by dideoxynucleotide chain termination method. The results showed that synthesized human *P. falciparum* hybrid antigen gene was identical with the designed one.

Key words Humans *P. falciparum* hybrid peptide antigen gene, DNA chemical synthesis, cloning

(Continued from page 293)

REGULATION OF THE ACTIVITY OF BOVINE BRAIN 63kD PDE ISOZYME BY PHOSPHORYLATION AND DEPHOSPHORYLATION

Zhang Guangyi

(Department of Biochemistry, Xuzhou Medical College, Xuzhou 221002)

ABSTRACT

In this paper the regulation of the activity of bovine brain 63kD PDE isozyme by phosphorylation and dephosphorylation was studied. The experimental results are as follows: 1. The 63kD PDE isozyme was phosphorylated by the purified bovine brain Ca²⁺/CaM-PK II in the presence of Ca²⁺ and CaM, the maximal phosphate incorporation was 1mol/mol subunit of the 63kD PDE isozyme. 2. The phosphorylated 63kD PDE isozyme was dephosphorylated by calcineurin in the presence of Ni²⁺ and CaM. 3. The AC₅₀ for Ca²⁺ of the phosphorylated form of the 63kD PDE isozyme was higher than that of the nonphosphorylated form of the 63kD PDE isozyme.

Key words phosphorylation, dephosphorylation, bovine brain 63kD PDE isozyme, bovine brain Ca²⁺/CaM-PK II, calcineurin