ми. Проведенные эксперименты показали, что нанесение обусловливающего стимула на ПТ и испытательного на РЯПМ вызывает отчетливое подавление второго компонента испытательного ответа, особенно при коротких межимпульсных интервалах. Следует полагать, что последнее является результатом окклюзионного взаимодействия стимулов на уровне моста. Для строгого подтверждения возможности опосредования нейронами РЯПМ корковых сигналов в мозжечок необходимо применение обратной последовательности раздражения исследуемых структур. Нанесение обусловливающего стимула на РЯПМ и испытательного на ПТ показало высокую чувствительность, особенно первого компонента, на такую последовательность раздражения. Совокупность указанных фактов говорит о том, что нейроны РЯПМ принимают участие в передаче корковых командных сигналов в мозжечок через его среднюю ножку.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Косоян О. П., Бантикян А. О.* Физиолог. журн. СССР (в печати).
2. *Фанарджян В. В., Бантикян А. О., Косоян О. П.* Физиолог. журн. СССР, *72*, 12, 1593—1601, 1986.
3. *Allen G. I., Korn H., Oshima T.* Exp. Brain Res., *24*, 1, 1—15, 1975.
4. *Allen G. I., Korn H., Oshima T., Toyama K.* Ibid. *24*, 1, 15—36, 1975.
5. *Allen G. I., Tsukahara N.* Physiol. Rev., *54*, 1, 957—1006, 1974.
6. *Berman A. L.* The Brain Stem of the Cat. A Cytoarchitectonic Atlas with Stereotaxic coordinates. Medison, Milwaukee, 1968.
7. *Brodal A., Brodal P.* Exp. Brain Res., *13*, 1, 90—110, 1971.
8. *Brodal A., Jansen J.* J. Comp. Neurol., *84*, 4, 31—118, 1946.
9. *Brodal A., Lacerda A. M., Destombes J., Angaut P.* Exp. Brain Res., *16*, 2, 140—160, 1972.
10. *Edwards B. J.* Comp. Neurol., *161*, 3, 341—358, 1975.
11. *Gerrit H. M., Woogd J.* Neurosci. Lett., 1, 145, 1978.
12. *Kitai S. T., Kocsis J. D., Kiyohara T.* Exp. Brain Res., *24*, 3, 295—309, 1976.
13. *Maekawa K., Takeda T., Kimura M.* Brain Res., *210*, 1, 17—30, 1981.
14. *Oshima T.* In Cerebro—cerebellar Interactions. (Ed. J. Massion, K. Sasaki.—Amsterdam, New—York: Oxford, North—Holland Biomedical Press, 125—139, 1979.
15. *Tsukahara N., Bando T., Murakami F., Oda Y.* Brain Res., *274*, 2, 249—259, 1983.
16. *Zangger R., Schultz W.* Neurosciens Lett., *7*, 1, 95—99, 1978.

Поступило 4.V 1987 г.

Биолог. ж. Армении, т. 41, № 3, 1988 УДК 574.578.574.963.3

АДФ-РИБОЗИЛИРОВАНИЕ МЕМБРАННЫХ БЕЛКОВ СИНАПТОСОМ МОЗГА БЕЛЫХ КРЫС

А. А. ВАРТАНЯН

Институт биохимии АН АрмССР, Ереван

Впервые приводится количественная характеристика АДФРТ в субклеточных фракциях синаптосом головного мозга белых крыс. Уровень АДФРТ, локализованной в плазматических мембранах синаптосом, возрастает в ряду: головной мозг, мозжечок, ствол мозга. Проведена дискриминация ферментативной активности от неизматического АДФ-рибозилирования.

Сокращения: АДФРТ—(АДФ-рибозо)трансфераза, НАД—никотинамид-аденинди-нуклеотид.

характерного для плазматических и митохондриальных мембран. Кажущееся значение K_M фермента равнялось 10 мкМ.

Առաջին անգամ տրվել է սպիտակ առնետների գլխուղեղի սինապտոսոմների ենթաբջջային ֆրակցիաներում ԱԵՖՈՏ բանակական բնութագիրը։

Պարզվել է, որ սինապտոսոմային մեմբրանի ԱԵՖՈՏ-ի ակտիվությունը ուժեղանում է հետևյալ շարքում. գլխուղեղ, ուղեղիկ, ցողուն։ Կատարվել է նաև ֆերմենտատիվ ակտիվության տարբերակում ոչ ֆերմենտատիվ ԱԵՖ-ոռիբոզիլացումից՝ բնորոշ պլազմատիկ և միտոքոնդրիալ բաղանթներին։ Km ֆերմենտի թվացող արժեքը հավասար է 10 մկՄ։

The quantitative characterization of ADPRT in subcellular fraction of synaptosomes of white rats brain is realized for the first time. ADPRT, localized in synaptosome membrane, increases in this succession: cerebrum, cerebellum, brain stem. The discrimination of enzymatic activity from non-enzymatic ADP—ribosylation, characteristic of plasmatic and mitochondrial membranes is made. The seeming importance of enzyme Km is equal to 10 mkM.

Синаптосомы мозга—АДФРТ—константа Михаэлиса.

Модификация ключевых белков АДФРТ считается одним из способов регуляции клеточного метаболизма. И с этой точки зрения АДФ-рибозилирование можно сравнить с фосфорилированием белков. АДФРТ катализирует вытеснение никотинамида из НАД$^+$ и образование О- или N-гликозидной связи с белком по следующей схеме:

$$\text{белок}-\text{XH} + n\text{НАД} \longrightarrow n \text{ никотинамид} + \text{белок}-\text{X}-[(\text{АДФ-рибоза})]_n$$

где X = O, N, $n = 1 \cdots 100$

Образующиеся продукты могут содержать как моно-, так олиго- и поли-АДФР-остатки [11]. Различают следующие типы АДФРТ: ядерные моно- и поли(АДФ-рибозо)трансферазы, цитоплазматические моно- и поли(АДФ-рибозо)трансферазы, мембранная моно(АДФ-рибозо)трансфераза [14]. И если поли(АДФ-рибозо)трансферазная активность показана почти во всех эукариотических ядрах [13], то сведения о моно(АДФ-рибозо)трансферазе из плазматических мембран пока еще единичные [6, 15]. В связи с этим целью настоящей работы явилось выявление некоторых характеристик АДФРТ мембран нервных окончаний мозга белых крыс.

Материал и методика. Синаптосомы мозга белых крыс получали по методу Хайош [3]. Лизис синаптосом проводили гипотоническим шоком. Фракции мембран синаптосом получали из лизата центрифугированием при 25000 g в течение 30 мин. Синаптические мембраны были очищены промыванием 100-кратным объемом буфера Трис·HCl, pH 7,04, с последующим центрифугированием при 25000×g в течение 30 минут.

Активность АДФРТ определяли по ранее описанной методике с незначительными изменениями [8]. Белок определяли по Лоури [9].

Результаты и обсуждение. Обнаружение субстратов, модифицирующихся холерным токсином, и эндогенной АДФРТ в холинергических нервных окончаниях Torpedo [8], эндогенной АДФРТ плазматических мембран клеток мозга крупного рогатого скота и белых крыс [2, 5], клеток нервного происхождения—РС-12 [1] позволило сформулировать проблему изучения свойств этой ферментной системы в синаптосомах мозга. Первые результаты, полученные при инкубации [^{14}С-аденин]

НАД+ с лизированными синаптосомами, указывали на включение [^{14}C-] АДФ-рибозных остатков в ТХУ-нерастворимые белки синаптосом (рис. 1). Как видно из рисунка, скорость включения [^{14}C-аденин] НАД+ в белки имеет тенденцию к росту на начальных этапах реакции, и далее принимает обычный характер, снижаясь со временем вместе с уменьшением концентрации эндогенных субстратов в реакционной смеси (в качестве контроля мы использовали [^{14}C-карбонил] НАД+).

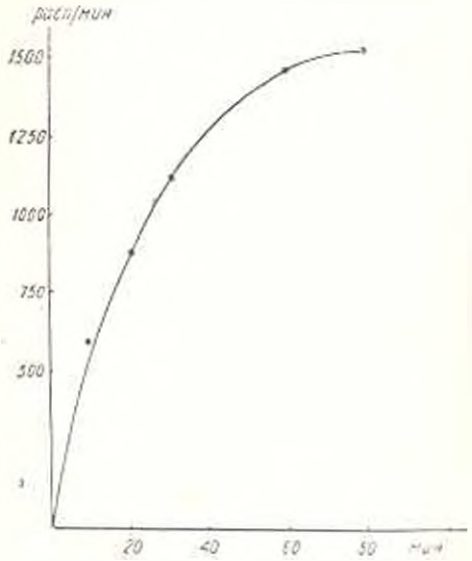

Рис. 1. Зависимость включения ^{14}C-АДФ-рибозных остатков в ТХУ-нерастворимые белки лизированных синаптосом мозга белых крыс от времени. Инкубационная смесь содержала в 100 мкл 0,1 мкКюри ^{14}C-НАД+, 100 мкг белка в буфере, указанном в тексте.

На следующем этапе исследований нами была определена компартментализация АДФ-рибозилированных белков.

Как следует из табл. 1, АДФ-рибозные остатки переносятся в основном на мембранные белки синаптосом и несколько меньше на митохондриальные. Тот факт, что включение [^{14}C-аденин]НАД+ происхо-

Таблица 1. Уровень АДФРТ (пмоль/мг белка) в субклеточных фракциях лизированных синаптосом. Инкубационная смесь содержала в 100 мкл 0,1 мкКюри [^{14}C-аденин] НАД+, 1100 мкг белка в буфере, указанном в «Методике»

Фракции	Единица активности АДФРТ*	Специфическая активность, пмоль/мг белка
Гомогенат	3.6	360
Мембраны	2.2	220
Митохондрии	0.23	23
Цитозоль	0.05	5
Контроль**	0.06	6

* За единицу активности АДФРТ принимали такое его количество, которое катализирует включение 100 пмоль АДФ-рибозных остатков в ТХУ-нерастворимые белки синаптосом при 22° в течение 20 минут.

** В качестве контроля использовали [^{14}C-карбонил]НАД+.

дит исключительно в партикулярных фракциях и отсутствует в цитозоле лизированных синаптосом, указывает на связанность с мембраной как фермента, так и его субстратов.

Для того, чтобы выяснить, как распределяется АДФРТ в разных отделах мозга, была проведена серия экспериментов, содержание которых представлено в табл. 2.

Таблица 2. Уровень АДФРТ (имоль/мг белка) в разных отделах мозга (условия те же).

ТХУ—нерастворимые белки синаптосом	Специфическая активность, имоль/мг белка	Относительная активность
Головной мозг	80	1
Мозжечок	134	1.7
Ствол мозга	225	2.6

Полученные данные указывают на то, что максимальным акцептором АДФ-рибозных остатков являются белки синаптосом ствола мозга.

Следующей и, пожалуй, самой сложной задачей явилась дискриминация эндогенного ферментативного АДФ-рибозилирования мембранных белков от неэнзиматического, впервые описанного Куном [7]. Сущность неэнзиматического АДФ-рибозилирования заключается в следующем: вследствие гидролиза НАД$^+$ НАДазой образуется свободная АДФ-рибоза, которая очень быстро реагирует с некоторыми полипептидами плазматических и митохондриальных мембран с образованием оснований Шиффа. Несмотря на то, что имеющиеся в литературе данные подтверждают эндогенное энзиматическое АДФ-рибозилирование в выбранных нами условиях [4, 12], мы все же сочли необходимым экспериментальное исключение неэнзиматического АДФ-рибозилирования. Попытки подобрать ингибиторы НАДазы, которые не затрагивали бы (АДФ-рибозо)трансферазной активности, не увенчались успехом, и мы решили эту проблему добавлением в инкубационную смесь НАД$^+$-регенерирующую систему, т. е. АТФ [10]. Предварительно была про-

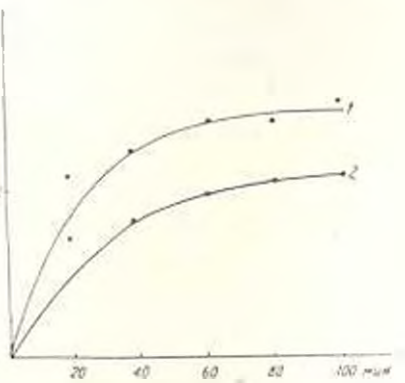

Рис. 2. Зависимость включения ^{14}С-АДФ-рибозных остатков в ТХУ-нерастворимые белки мембран синаптосом мозга белых крыс от времени. Инкубационная смесь содержала в 100 мкл 0,075 мкКюри [^{14}С-аденин] НАД$^+$, 0,05 мМ НАД$^+$, 100 мкг белка в буфере, указанном в тексте (2), и 0,05 мМ АТФ (1)

ведена серия экспериментов, целью которых явилось качественное и количественное определение включения [α-^{32}P]-АТФ в ТХУ-нерастворимые белки синаптосом мозга в условиях ингибирования фосфорилирования и подбор оптимальных условий для протекания этого процесса (данные не приводятся). На рис. 2 представлены результаты изучения

изменения тотального уровня АДФ-рибозилированных белков мембран синаптосом в зависимости от присутствия в инкубационной смеси АТФ. Видно, что включение [^{14}С-аденин] НАД$^+$ в кислото-нерастворимые белки катализируется все же АДФРТ, а не НАДазой, в противном случае не наблюдалось бы изменение тотального уровня АДФ-рибозилированных белков.

Кажущееся значение K_M этого фермента, вычисленное в диапазоне концентраций НАД$^+$ от 5 до 100 мкМ, равнялось 10±2 мкМ, что хорошо согласуется с литературными данными об аргинино-специфичном ферменте. Таким образом, выявлены некоторые характеристики АДФРТ из плазматических мембран нервных клеток. Обсуждаются возможные аспекты физиологического значения этого фермента в мембранах синаптосом мозга белых крыс.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Кондратьев А. Д., Алахов В. Ю., Мовсесян В. А., Черный А. А., Камынин А. Б., Северин Е. С.* Биоорг. химия, *12*, 6, 736—740, 1986.
2. *Фоменко А. И., Халмуратов А. Г., Степаненко С. П., Пожарун С. В.* Биол. мембраны, *3*, 2, 124—128, 1986.
3. *Hajos F.* Brain Res., *93*, 485—489, 197[illegible].
4. *Hilz H., Koch R., Fanick W., Klarpoth K., Adamietz P.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, *81*, 3929—3933, 1984.
5. *Huff R., Neer E. J.* J. Biol. Chem., *261*, 1105—1110, 1986.
6. *Kataoka T., Ui M.* J. Biol. Chem., *257*, 7210—7216, 1982.
7. *Kun E., Kirsten E., Piper W. N.* Method Enzymol., *55*, 115—118, 1979.
8. *Lester H. A., Steer M. L., Michaelson D. M.* J. of Neurochem., *98*, 1080—1086, 1982.
9. *Lowry O. H., Rosenbrough N. J., Farr A. L., Randall R. J.* J. Biol. Chem., *193*, 265—275, 1951.
10. *Moss J., West R. E., Osborne J., Levin L.* "ADP-Ribosylation of Proteins" Ed. Althaus F. K., Hilz H., Springer-Verlag, Berlin, 512-517, 1985.
11. *Papenheimer A. A.* Annual Rev. Biochem., *46*, 69—94, 1977.
12. *Richter C., Winterhalter K., Baumhuter S., Lotser H., Moser B.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, *81*, 3929—1933.
13. *Scovassi A., Stanley S. J.* Eur. J. Biochem., *159*, 77—84, 1986.
14. *Ueda K., Hayaishi O.* Annual. Rev. Biochem., *54*, 73—100, 1985.
15. *Yost D. A., Moss J.* J. Biol. Chem., *258*, 4926—4929, 1983.

Поступило 10.XII 1987 г.