

УДК 577.152.277:612.8.015

ЭНДОГЕННОЕ ADP-РИБОЗИЛИРОВАНИЕ ОСТАТКОВ ЦИСТЕИНА И ГИСТИДИНА В БЕЛКАХ СИНАПТИЧЕСКИХ МЕМБРАН

МОИСЕСЯН Н. О., БУРНАЗЯН Л. Б., АРУТЮНЯН А. В.

Институт биохимии АН Армении им. Г. Х. Бунятыан, Ереван

Установлено, что повышение уровня ADP-рибозилирования в синаптических мембранах (СМ) мозга крыс сопровождается увеличением выделения $[^{14}\text{C}]$ ADP-рибозы в определенные, особенно высокомолекулярные, зоны белков (M_r 130—140 кД, 130—210 кД, 250 и 270 кД). При инкубации СМ, используемых в качестве источника высвобождаемых ADP-рибозилтрансфераз, с меченым NAD и свободными аминокислотами (аргинин, цистин и гистидин) последние образуют конъюгаты с $[^{14}\text{C}]$ ADP-рибозой, о чем свидетельствуют данные по разделению продуктов реакции на Dowex 1×4. Предполагается о том, что акцепторами аминокислотами в белках СМ, подвергающихся ADP-рибозилированию, могут быть, помимо аргинина, цистина и гистидина, участвующие в опытах с применением HgCl_2 , NH_4OH и NaOH , селективно разрушающих определенные ADP-рибоза-аминокислотные связи.

В настоящее время установлено, что процесс ADP-рибозилирования в нервной ткани осуществляется при участии нескольких ферментов. К ним относятся ДНК-зависимая (ADP-рибоза)-полимераза, присутствующая преимущественно в ядерной фракции [1—3], митохондриальная и цитоплазматическая (ADP-рибозил)-трансфераза, катализирующая в отличие от (ADP-рибоза)-полимеразы присоединение ДНК-независимым путем нескольких ADP-рибозных остатков к акцентирующим белкам [4, 5] и моно-ADP-рибозилтрансфераза, специфическим образом модифицирующая остатки аргинина мембранных белков, в частности в синапсоммах [6—8].

Исследованиями Lester и соавт. [6] и Фоменко и соавт. [7] было доказано, что в лизированных СМ протекает аргининспецифическое моно-ADP-рибозилирование белков. Проведенные нами ранее эксперименты [8] показали, что при экспозиции СМ мозга крыс при комнатной температуре в течение 20 ч уровень ADP-рибозилирования в них резко возрастает. При этом процесс ингибируется не только в присутствии Met-аргинина, являющегося субстратом присутствующей в СМ моно-ADP-рибозилтрансферазы [6, 7], но также гистидина и цистина. На основании этого нами было высказано предположение, что в мозгу могут функционировать ADP-рибозилтрансферазы, специ-

фические по отношению к этим аминокислотным остаткам в белках СМ [8].

Для выяснения этого вопроса были поставлены эксперименты, в которых исследовалась способность СМ осуществлять АDP-рибозилирование, наряду с аргинином, цистеином и гистидином.

Материалы и методы

Из коры больших полушарий беспородных крыс изолировали фракцию синапсом и после ее осмотического шока путем центрифугирования в градиенте сахарозы 1,2:1:0,8 М выделяли СМ [9], которые после 20 ч хранения при комнатной температуре или при 0° в присутствии ингибитора протеолиза фенилметилсульфонилфлуорид использовали в качестве источника АDP-рибозилтрансфераз. АDP-рибозилирование СМ осуществляли, как описано в предыдущей работе [8], но с использованием двойной метки NAD. Инкубационная смесь (0,35 мл) содержала по 42 пмоль [аденозин-¹⁴C]NAD и [никотинамид-³H]NAD («Amersham», Англия); 50 мМ трис-HCl буфер pH 7,0; 0,5 мМ ДТТ, 10 мМ тимидин и СМ (150 мкг белка). В качестве акцепторов меченой АDP-рибозы использовали цистеин, гистидин и метиловый эфир аргинина. Для разделения продуктов реакции АDP-рибозилирования пробы наносили на Dowex 1×4 или подвергали гель-фильтрации на сефадексе G-25 superfine [10, 11].

В опытах по определению природы химической связи АDP-рибоза-белок реакцию останавливали 100 мМ Перес-буфера pH 7,5, содержащего 2%-ный ДДС-Na. К реакционной смеси добавляли равный объем 1 М NaCl, NH₂OH, NaOH или 20 мМ HgCl₂ и инкубировали от 15 до 60 мин при 37°. После этого к пробам добавляли 20%-ную ТХУ, пропускали их через фильтры Millipore (толщина пор 0,65 мкм) и определяли количество метки, оставшейся связанной с белком [12].

Для выявления белков СМ, подвергающихся АDP-рибозилированию, исследовали включение радиоактивности в белки СМ после их 2 ч инкубации с [аденозин-¹⁴C]NAD, 100 пмоль (остальные компоненты инкубационной среды были те же, что приведены выше). После инкубации проводили электрофорез в присутствии 0,1%-ного ДДС-Na [13], гели разрезали на полоски по 3 мм, помещали их в 1%-ный раствор NH₄OH в пергидроле и затем определяли радиоактивность на счетчике SL-4221 («Intertechnique», Франция).

Результаты и обсуждение

Одной из возможных причин стимулирования процесса АDP-рибозилирования в СМ при хранении может быть их деструкция с высвобождением акцепторных белков, а также соответствующих мембраносвязанных АDP-рибозилтрансфераз. Проведенные исследования показали, что усиление АDP-рибозилирования в СМ, хранившихся в течение 20 ч при комнатной температуре в условиях ингибирования

протеолиза (при добавлении фенилметилсульфонилфлуорида), сопровождается увеличением включения метки в определенные зоны белков.

Как видно из данных, представленных на рис. 1, б, включение [^{14}C]ADP-рибозы в белки СМ, хранившиеся при 0° , очень незначительно, независимо от величины их M_r . Несколько интенсивнее, по сравнению с другими, метка включается в белок с $M_r \approx 45$ кД, что соответствует литературным данным, согласно которым в СМ мозга

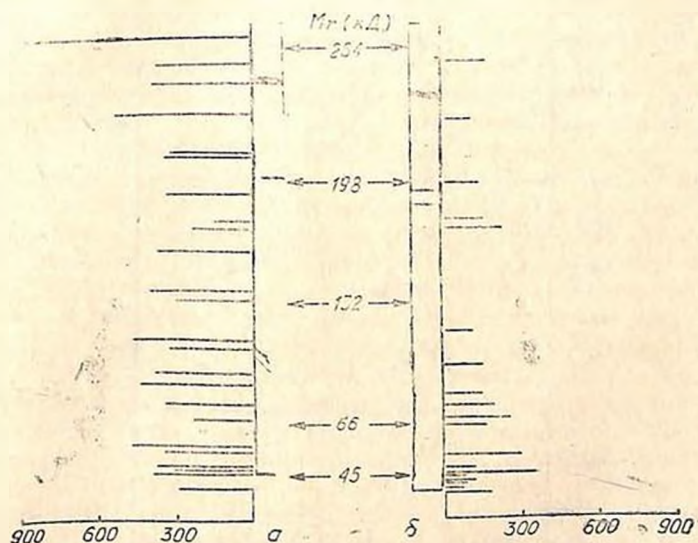


Рис. 1. Включение [^{14}C] ADP-рибозы (в расп/мин) в белки СМ, хранившиеся при 20° (а) и 0° (б) при их инкубации с [аденозин- ^{14}C] NAD. В качестве маркеров при определении M_r белков СМ использовали яичный альбумин

крыс происходит моно-ADP-рибозилирование белка с M_r 42 кД, относящегося к GTP-связывающим белкам аденилатциклазной системы [6, 7]. В СМ, хранившихся при 20° , наряду с усилением ADP-рибозилирования белков, в которые метка, хотя и слабо, включается и при 0° , происходит включение радиоактивности в высокомолекулярные зоны белков с M_r 130—150, 210—215, 250 и 270 кД. По данным Lester и соавт. [6], акцепторной аминокислотой в белках синапсом электрического органа Torpedo является аргинин, аналогичные результаты были получены при исследовании моно-ADP-рибозилирования в СМ мозга крыс [7].

Ранее нами было обнаружено, что процесс ADP-рибозилирования в СМ мозга крыс ингибируется, наряду с аргинином, также с гистидином, и, особенно, цистеином. Эти данные указывали на возможность того, что в СМ, помимо ADP-рибозилирования остатков аргинина в белках СМ, происходит перенос остатка ADP-рибозы с NAD

на другие акцепторные аминокислоты. Для подтверждения этого была поставлена специальная серия опытов, в которых СМ, используемые в качестве источника АDP-рибозилтрансфераз, инкубировали в присутствии радиоактивного NAD с двойной меткой и Met-аргинина, цистеина или гистидина (см. материалы и методы).

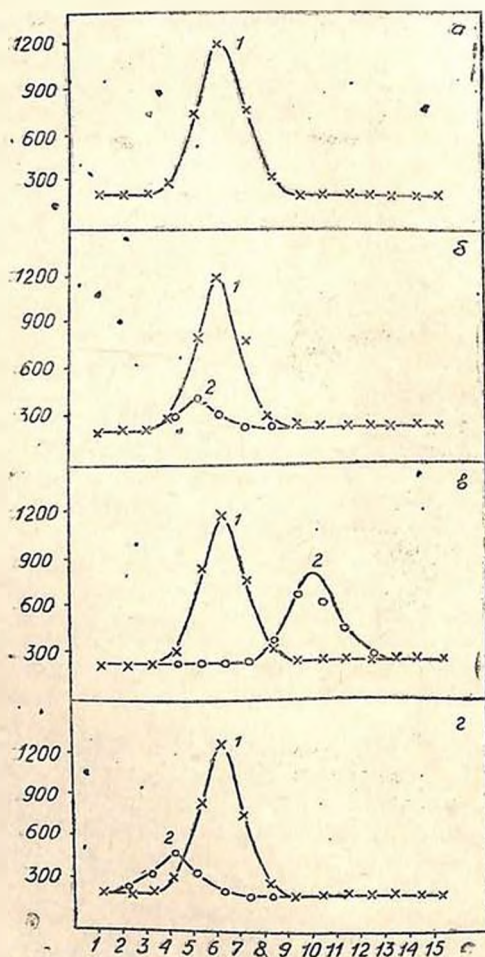


Рис. 2. Разделение на Dowex 1.4 (100—200 меш) продуктов реакции АDP-рибозилирования после инкубации СМ меченым NAD (смесь аденозин [^{14}C]NAD и никотинамид [^3H] NAD) и аминокислотами: а—контроль (без аминокислот); б—Met-аргинином; в—цистеином; г—гистидином. По оси абсцисс—объем элюирующего буфера (в мл), по оси ординат (в расч/мин): 1—включение [^3H] никотинамида, 2—включение [^{14}C]ADP-рибозы

Проведенные исследования показали, что при разделении на Dowex 1×4 проб, содержащих СМ и меченый NAD, обнаруживался лишь пик [^3H]никотинамида (рис. 2, а), при добавлении же аминокислот, помимо него, выявлялась также метка [^{14}C]ADP-рибозы. Эти данные наглядно свидетельствуют об образовании конъюгатов использованных нами аминокислот с меченой ADP-рибозой, отличающихся между собой профилем элюции (рис. 2, б-г). Следует также подчеркнуть, что наиболее эффективное включение метки [^{14}C]ADP-рибозы наблюдалось при наличии в среде инкубации цистенина.

В последнее время появились данные, свидетельствующие о наличии цистенинспецифических тканевых моно-ADP-рибозилтрансфераз с механизмом действия, подобным коклюшному токсину [14—16]. Тапшта и соавт. [14] выделили из эритроцитов человека так называемую ADP-рибозилтрансферазу С, которая катализирует перенос ADP-рибозного остатка с [аденин- ^3H]NAD на метиловый эфир цистенина. Методом тонкослойной хроматографии удалось разделить образовавшийся продукт от меченых NAD и ADP-рибозы. Было показано также, что ADP-рибозилтрансфераза С катализирует и образование [^{14}C]никотинамида из [карбонил- ^{14}C]NAD. S-бензил-цистенин, в котором SH-группы заблокированы, а также цистин не эффективны в реакции моно-ADP-рибозилирования, что свидетельствует о том, что ADP-рибоза присоединяется к SH-группам цистенина, хотя нельзя полностью исключить, что акцептирующим участком могут быть и его NH_2 -группы. Последующими исследованиями японских авторов было установлено, что ADP-рибозилтрансфераза С из эритроцитов катализирует ADP-рибозилирование GTP-связывающих Gi-регуляторных белков [15]. Было обнаружено также эндогенное цистенинспецифическое ADP-рибозилирование белков в печени крыс. Исследования Jacobson и соавт. показали, что ADP-рибозилирование цистенина в кислотонерастворимой фракции печени крыс составляет 14,2 пмоль ADP-рибозы на мг белка, что несколько уступает уровню ADP-рибозилирования аргинина, равному 19,2 пмоль на мг белка [16]. Наряду с этим, были опубликованы данные о том, что тиогликозидная связь, в отличие от других гликозидных связей, специфическим образом разрушается в присутствии ионов ртути [16—18].

Полученные нами результаты также можно рассматривать с позиции наличия в синаптической фракции мозга ADP-рибозилтрансферазы, катализирующей перенос остатка ADP-рибозы на свободный цистенин с образованием ADP-рибозилцистенина. Это было подтверждено в опытах с обработкой СМ, подвергшихся ADP-рибозилированию, HgCl_2 (рис. 3).

Ингибирование включения метки в белки СМ при их инкубации с [аденозин ^{14}C]NAD почти на 20% под влиянием HgCl_2 свидетельствует о наличии тиогликозидной связи. Из данных, представленных на рис. 3, видно также, что примерно такое же действие на уровень ADP-рибозилирования белков СМ оказывает 1 М NH_2OH , который в при-

меняемых нами условиях (60 мин обработки) не действует на тно-гликозидную связь и обладает относительной специфичностью по отношению к N-гликозидной связи, образуемой между остатками аргинина и ADP-рибозой [12, 19]. Оба типа гликозидной связи чувствительны к NaOH [20, 21], который, как было обнаружено нами значительно снижает уровень ADP-рибозилирования белков СМ (рис. 3). Однако обработка 1 M NaOH не приводит к полному исчезновению метки, около 40% ее остается, что свидетельствует о наличии других типов модифицированных аминокислотных остатков в белках СМ. К числу гликозидных связей, не распадающихся под влиянием NaOH, относится так называемый дифтаמיד [19, 22], представляющий собой амидированную форму гистидина, присутствующую в факторе элонгации 2 [22].

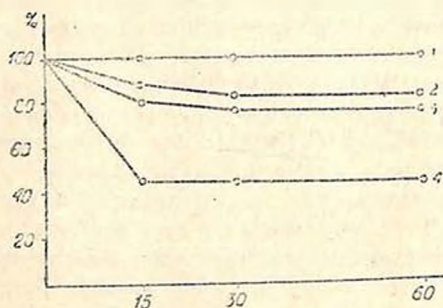


Рис. 3. Действие специфических реагентов на различные ADP-рибоза-аминокислотные связи, образующиеся в белках СМ при инкубации с [аденозин-¹⁴C] NAD в присутствии: 1—NaCl (контроль, 1 M), 2—HgCl₂ (20 мМ), 3—NH₂OH (1 M), 4—NaOH (1 M). По оси абсцисс — время инкубации (мин), по оси ординат — количество связанной с белком метки (%).

Обнаружено, что фактор элонгации 2, выделенный из почечной ткани хомячка и печени крупного рогатого скота, обладает дифтаמיד-специфической ADP-рибозилтрансферазной активностью и может подвергаться ауто-ADP-рибозилированию [23]. На основании приведенных нами данных нельзя исключить, что дифтаמיד или его предшественник гистидин служат мишенью эндогенного ADP-рибозилирования в СМ.

Резюмируя вышесказанное, можно предположить, что в головном мозгу крыс происходит ADP-рибозилирование остатков аргинина, цистенина, гистидина (дифтамида—?) белков СМ. Этот вывод основывается на фактах ингибирования этими аминокислотами процесса ADP-рибозилирования в СМ, образования меченых аддуктов при инкубации с ними меченого по аденозину и никотинамиду NAD и расщепления образующихся связей ADP-рибоза—белок в присутствии селективных в отношении различных аминокислотных остатков соединений. В пользу наличия в мозгу субстратов эндогенного ADP-рибозилирования с различными акцепторными аминокислотами (аргинин, цистенин) свидетельствуют исследования, в которых описаны мембранные, так называемые малые G-белки, подвергающиеся ADP-рибозилированию в присутствии бактериальных токсинов [24, 25]. Однако для окончательного суждения о природе аминокислотных ос-

татов, подвергающихся в мозговой ткани эндогенному ADP-рибозилированию, необходимы дополнительные исследования, которые бы позволили охарактеризовать соответствующие ADP-рибозилтрансферазы.

ENDOGENOUS ADP-RIBOSYLATION OF CYSTEINE AND HISTIDINE RESIDUES OF SYNAPTIC MEMBRANE PROTEINS

MOVSESSIAN N. H., BURNASIAN L. B., HAROUTUNIAN A. V.

Institute of Biochemistry, Academy of Sciences of Armenia, Yerevan,

The incorporation of labeled ADP-ribose residues in the high molecular weight proteins (M_r 130–140 kD, 210–215 kD, 250 and 270 kD) of synaptic membranes of rat brain cerebral cortex have been established. The different types of ADP-ribose–amino acid bonds have been shown to be formed by endogenous ADP-ribosyltransferases of synaptic membranes. Arginine, cysteine and histidine were supposed as acceptor amino acids. The idea was confirmed in the experiments where $HgCl_2$, NH_4OH and $NaOH$ selectively destroyed appropriate ADP-ribose–amino acid bonds.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Заалишвили Т. М., Маргулян Д. О., Тамазян А. С. Изв. АН ГССР, т. 6, № 2, с. 141–146, 1980.
2. Заалишвили Т. М., Сабелашвили Д. П. Нейрохимия, т. 8, № 3, с. 385–389, 1989.
3. Арутюнян Д. Д., Погосян А. А., Мхитарян А. Г. ДАН АрмССР, т. 86, № 4, с. 178–180, 1988.
4. Masmodi A., Mandel P. J. Neurochem., v. 51, p. 188–193, 1988.
5. Chypre G., Maniez C., Mandel P. J. Neurochem., v. 51, № 2, p. 561–565, 1988.
6. Lester H. A., Steer L., Michaelson D. M. J. Neurochem., v. 38, № 4, p. 1030–1086, 1982.
7. Фоменко А. И., Халмуратов А. Г., Степаненко С. П., Пожарун С. В. Биол. мембраны, т. 3, № 2, с. 124–130, 1986.
8. Арутюнян А. В., Мовсесян Н. О., Бурназян Л. Б., Еранян С. С., Геворкян Г. А. Нейрохимия, т. 7, № 4, с. 500–508, 1988.
9. Abita J. P., Chicheptortiche R., Schweitz H., Lazdunski M. Biochemistry, v. 16, № 9, p. 1838–1864, 1977.
10. De Wolf M. J. S., Vitti P., Ambesi-Impombato F. S., Kohn L. D. J. Biol. Chem., v. 256, № 23, p. 12287–12296, 1981.
11. Moss J., Vaughan M. J. Biol. Chem., v. 252, p. 2455–2457, 1977.
12. Aktories K., Just I., Rosenthal W. Biochem. Biophys. Res. Commun., v. 156, № 1, p. 361–367, 1988.
13. Laemmli U. K. Nature, v. 227, p. 680–685, 1970.
14. Tanuma S., Kawashima K., Endo H. J. Biol. Chem., v. 101, p. 821–824, 1987.
15. Tanuma S., Kawashima K., Endo H. J. Biol. Chem., v. 263, № 11, p. 5483–5493, 1988.

16. Jacobson E. L., Mitgmuang M., Aboul-E'la N., Jacobson P. K. — In: ADP-Ribose Transfer Reactions, Mechanisms and Biological Significance (ed. by Jacobson E. L. and Jacobson M. K.), p. 13—17, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-N. Y., 1989.
17. Payne D. M., Jacobson E. L., Moss J., Jacobson M. K. *Polymer Chemistry*, v. 21, p. 7540—7549, 1989.
18. Meyer T., Koch R., Fanick W., Hiltz H. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler*, v. 319, p. 579—583, 1988.
19. Pirson K. J., McMahon K. K. *Biochem. J.*, v. 270, p. 591—597, 1990.
20. Richter C. — In: ADP-Ribosylation of Proteins (ed. by Althaus P. R., and Richter C.), p. 216—230, Springer-Verlag, Berlin, 1988.
21. Sekine A., Fujiwara M., Naramiya S. J. *Biol. Chem.*, v. 264, p. 3602—3607, 1989.
22. Brown B. A., Bodley J. W. *FEBS Lett.*, v. 191, p. 251—254, 1979.
23. Lee H., Iglewski W. J. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, v. 131, p. 2691—2701, 1981.
24. Ros M., Gonzalez-Galero G., Martin M., Cabello A. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 171, № 2, p. 770—776, 1990.
25. Shinoda M., Katada T., Ui M. *Cell Signall.*, v. 2, № 4, p. 403—414, 1990.

Поступила 26.XII.1990

Neurocytochemical Methods. NATO ASI Series, (E) by A. Calles, D. Eugene), N° 58, Springer-Verlag, Berlin, 1991, 335 p.

Нейроцитохимические методы. ASI серия НАТО, т. N° 58 Изд. Springer-Verlag, Берлин, 1991, 335 с.

Книга «Нейрохимические методы» представляет исследователям, аспирантам, нейрологам и персоналу биологических лабораторий точное и подробное описание наиболее современных и действенных методов нейроцитохимии, позволяющих определять локализацию и совместное распределение нейротрансмиттеров, изучать их взаимодействие на клеточном и субклеточном уровне, производить гистологическое и ультраструктурное детектирование рецепторов, количественно определять медиаторы, выявлять нейроны, их отростки и проводить 3-D реконструкцию нейронов. Это руководство включает цитофункциональные подходы к описанию аксонального транспорта, методологию изучения экспрессии генов и физиологических эффектов нейротрансмиттеров (РЕТ, ионо- и электрочувствительные красители). Особое внимание уделяется возможностям, ограничениям, техническим сложностям и путям применения описанных методик, равно как и их возможному сочетанию при изучении одних и тех же образцов тканей.