

УДК 612.822.0.015.1:577.152.311.014.46

СИСТЕМА РЕГУЛЯЦИИ БИОСИНТЕЗА АЦЕТИЛХОЛИНЭСТЕРАЗЫ МИКРОСОМ КЛЕТОК ГОЛОВНОГО МОЗГА АЦЕТИЛХОЛИНОМ И ЦИКЛИЧЕСКИМИ НУКЛЕОТИДАМИ

СУДАҚОВА Н. М., ЕЛАЕВ Н. Р.

В бесклеточной системе, содержащей изолированные ядра и микросомно-цитоплазматическую фракцию гомогената головного мозга, имело место спонтанное пуромин-чувствительное увеличение активности ацетилхолинэстеразы (АХЭ) микросом. В результате преникубации такой системы с ацетилхолином (АХ) в концентрациях 10^{-6} — 10^{-3} М наблюдалось увеличение активности АХЭ микросом с максимумом при концентрации АХ 10^{-5} М (более 20% за 60 мин инкубации). Эффект АХ не проявлялся на фоне актиномицина Д и пуромина. При отсутствии в бесклеточной системе ядер преникубация с АХ вызывала уменьшение активности АХЭ микросом, чувствительное к пуромину. Видимо, АХ является положительным эффектором биосинтеза АХЭ на ядерном уровне и отрицательным—на цитоплазматическом. Эффекты АХ не опосредуются циклическими нуклеотидами. Показано, что сАМР в противоположность АХ тормозил биосинтез АХЭ в ядрах и активировал его в цитоплазме, а сGMP подавлял этот процесс в обоих случаях. На ядерном уровне АХ, сАМР и сGMP оказывали свое влияние совместно с низкомолекулярными факторами, а на цитоплазматическом—без них.

Обсуждается система регуляции биосинтеза АХЭ микросом клеток мозга, в основу которой положено влияние АХ на экспрессию генов АХЭ, а влияние сАМР и сGMP рассматривается как корректирующее звено.

Ацетилхолинэстераза (АХЭ) клеток нервной ткани является ферментом, изучение биосинтеза которого может помочь выяснению взаимосвязи функциональной нагрузки и количества фермента в клетке, трансформации нервного импульса в метаболические сигналы и т. д. В этом смысле интересным является тот факт, что АХЭ нервной ткани имеет короткий период полужизни [1]. Представление об адаптивном синтезе АХЭ в ответ на увеличение количества субстрата—АХ трудно в настоящее время совместить со многими новыми фактами, в частности, ингибиторным действием сGMP на процессы синтеза белков в клетках нервной ткани [2, 3], так как установлено, что сGMP является метаболическим посредником в ряде процессов АХ. В то же время показано, что АХ регулирует экспрессию, например, таких генов клеток нервной ткани, как Na^+ , K^+ -АТРаза [2, 3], являясь в этом отношении внутриклеточным гормоном. Такого рода сведения относительно АХЭ отсутствуют.

В связи с этим в настоящей работе было изучено влияние АХ, сGMP и сAMP на активность АХЭ микросом клеток ткани мозга в модельной (бесклеточной) системе, разработанной ранее [2, 4] для изучения регуляции экспрессии гена Na^+ , K^+ -АТФазы.

Материалы и методы

Опыты выполнены на белых крысах массой 150—200 г. Животных быстро обезглавливали, головной мозг (исключая мозжечок и каудальную часть продолговатого мозга) гомогенизировали в 2,45 М растворе сахарозы из расчета 7 мл на один мозг. Все процедуры проводили на холоду. Гомогенат центрифугировали 75 мин при 27 000 g. Осадок, содержащий ядра (микроскопический контроль), ресуспендировали в среде А, состоявшей из 0,33 М $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $2 \cdot 10^{-3}$ М MnSO_4 , $5 \cdot 10^{-3}$ М MgCl_2 , 10^{-3} М глутатиона (GSH), 10^{-3} М АТФ, $3 \cdot 10^{-1}$ М GTP, $5 \cdot 10^{-5}$ М UTP, $5 \cdot 10^{-5}$ М СТР, $5 \cdot 10^{-2}$ М трис-НСl (рН 8,0), эквимолярной смеси 20 аминокислот (50 мкг/мл). Ядра ресуспендировали из расчета 2,5 мл среды А на один исходный мозг. К аликвотам ядерной суспензии (2,5 мл) добавляли равный объем микросомно-цитоплазматической фракции. Последнюю получали путем центрифугирования гомогената (2,5—3,0 мл 0,3 М сахарозы на мозг) при 8000 g в течение 10 мин. Опытные пробы содержали АХ (10^{-6} — 10^{-3} М), либо сAMP (10^{-6} М), либо сGMP (10^{-6} М), либо пуromинци (25 мкг/мл). В тех случаях, когда действие АХ изучали на фоне пуromинци (50 мкг/мл), ях, когда действие АХ изучали на фоне пуromинци (50 мкг/мл), все пробы—контрольные и опытные—содержали антибиотик или фермент. При отсутствии в системе ядер их суспензию заменяли равным объемом среды А. Когда выясняли влияние низкомолекулярных цитоплазматических факторов на эффекты АХ и циклических нуклеотидов, микросомно-цитоплазматическую фракцию диализовали в течение 20 ч против 20 объемов 0,3 М сахарозы (две смены среды); в других случаях диализ проводили против равного объема среды А, и изолированные ядра ресуспендировали в этой среде, осуществляя таким образом возврат в бесклеточную систему низкомолекулярных цитоплазматических факторов. Пробы инкубировали 60 мин при 37° с периодическим перемешиванием, добавляли равный объем 0,3 М сахарозы и центрифугировали 7 мин при 4000 g. Надосадочную жидкость отбирали и центрифугировали 75 мин при 27000 g. Осадок микросом ресуспендировали в 3 мл 0,1 М фосфатного буфера (рН 7,8), содержавшего 0,075 М NaCl и 0,04 MgCl_2 . Активность АХЭ определяли по методу Ellman [5]; содержание белка—по методу Lowry [6]. Результат каждого опыта представлял среднее значение трех параллельных проб. Метод Ellman, простой и быстрый в исполнении, наиболее удобен при работе с большим количеством анализов. Его недостаток—ограниченная точность—был компенсирован в настоящей работе большим количеством повторов. Контрольный уровень активности АХЭ микросом составлял 3,9—13,1 мкмоль АХ/мг белка/ч; препаратами микросом практически не гидроли-

зовался бутирилтихолин, что свидетельствовало о присутствии в микросомах мозга преимущественно именно АХЭ. Так как контрольные величины активности фермента варьировали от опыта к опыту, то окончательные результаты в каждом эксперименте выражали в процентах от контроля. Статистическую обработку результатов опытов проводили методом попарно связанных вариант [7].

Реактивы: нуклеозидтрифосфаты, сGMP, сАМР, GSH, пуромицин, актиномицин Д и рибонуклеаза фирмы «Reanal» (Венгрия); дитро-биснитро-бензоат фирмы «Calbiochem» (США); ацетилтихолин фирмы «Lachema» (ЧССР); остальные реактивы отечественного производства.

Результаты исследований

Было установлено, что в результате преинкубации бесклеточной системы с АХ (10^{-6} — 10^{-3} М) активность АХЭ микросом увеличивалась (таблица). Максимальный прирост наблюдали при концентрации АХ 10^{-5} М (более 20% за 60 мин инкубации). При дальнейшем увеличении концентрации АХ до 10^{-4} — 10^{-3} М эффект не только не возрастал, но и в значительной мере снижался. Аналогичная зависимость от концентрации АХ была обнаружена ранее для синтеза РНК в изолированных ядрах [8]. Если систему преинкубировали с пуромицином без АХ, то выделенные затем из нее микросомы имели более низкую активность АХЭ, чем в контроле. Эффект АХ полностью нивелировался, когда преинкубацию бесклеточной системы с АХ проводили на фоне актиномицина Д или пуромицина—ингибиторов соответственно транскрипции и трансляции. При отсутствии в системе ядер преинкубация с АХ существенно снижала активность фермента в микросомах.

В то же время в противоположность действию АХ преинкубация бесклеточной системы с циклическими нуклеотидами вызывала снижение активности фермента. Этот факт не позволяет рассматривать их в качестве возможных посредников в индукторном действии АХ на активность АХЭ. В случае сАМР при отсутствии в системе ядер наблюдали трансформацию эффекта в противоположный. На фоне рибонуклеазы, использованной в этих опытах вместо пуромицина, эффект сАМР отсутствовал. Действие сGMP, в отличие от АХ и сАМР, в полной и редуцированной системе было однонаправленным и состояло в угнетении активности АХЭ микросом. Как и в случае сАМР, эффект сGMP снимался рибонуклеазой.

Ранее было показано [4, 8], что действие АХ и сАМР на синтез суммарной ядерной РНК сопряжено с участием в этих процессах растворимых термостабильных цитоплазматических факторов. В настоящей работе также был исследован вопрос об участии такого рода факторов в процессах регуляции биосинтеза АХЭ. Было установлено, что в диализованной микросомно-цитоплазматической фракции (то есть лишенной низкомолекулярных растворимых веществ), действие АХ становилось противоположным—активность АХЭ при добавлении АХ снижалась. По-

следнее свидетельствует об участии в действии АХ совместно с ним и анализируемых цитоплазматических факторов. При изъятии из dialизованной системы ядер эффект АХ в количественном и качественном отношении сохранялся в отличие от аналогичного варианта с использованием недialизованной микросомно-цитоплазматической фракции. На фоне пуromинина в бесклеточной системе с dialизованной микросомно-цитоплазматической фракцией ингибирующий эффект АХ полностью отсутствует.

Таблица

Активность АХЭ микросом, преникубированных в бесклеточной системе с различными добавками (АХ, сАМР и сGMP)

Варианты бесклеточной системы	Активность АХЭ (% от контроля) M±m
I. Недialизованная микросомно-цитоплазматическая фракция	
Полная система + АХ (10^{-6} М)	111±4 (9)*
" " + АХ (10^{-5} М)	122±4 (39)*
" " + АХ (10^{-4} М)	111±6 (15)
" " + АХ (10^{-3} М)	105±6 (14)
" " + пуromинин (25 мкг/мл)	91±3 (18)*
Полная система + активноминин Д + АХ (10^{-5} М) (50 мкг/мл)	95±4 (10)
Полная система + пуromинин + АХ (10^{-5}) (25 мкг/мл)	96±5 (17)
Система без ядер + АХ (10^{-5} М)	82±8 (9)*
Полная система + сАМР (10^{-6} М)	81±4 (14)*
" " + сGMP (10^{-6} М)	89±5 (17)**
Система без ядер + сАМР (10^{-6} М)	127±9 (13)*
" " + сGMP (10^{-6} М)	77±4 (7)*
Система без ядер + рибонуклеаза + сАМР (10^{-6} М) (1,0 мкг/мл)	100±2 (7)
" " + сGMP (10^{-6} М)	95±5 (7)
II. Dialизованная микросомно-цитоплазматическая фракция	
Полная система + АХ (10^{-5} М)	78±3 (14)*
Система без ядер + АХ (10^{-5} М)	78±7 (15)**
Система без ядер + пуromинин + АХ (10^{-5} М) (25 мкг/мл)	112±6 (12)
Полная система + сАМР (10^{-6} М)	95±5 (6)
" " + сGMP (10^{-6} М)	135±8 (6)*
Система без ядер + сGMP (10^{-6} М)	75±5 (6)**
Полная система + анализируемый цитоплазматический материал + АХ (10^{-5} М)	130±9 (6)*

* $p < 0,01$; ** $p < 0,05$; в остальных случаях различия недостоверны. В скобках указано количество опытов

Влияние сАМР в системе с dialизованной микросомно-цитоплазматической фракцией практически не проявлялось. Последнее свидетельствует в пользу того, что в исходной системе сАМР действовал на процессы биосинтеза АХЭ, как и АХ, совместно с низкомолекулярным цитоплазматическим фактором. Преникубация dialизованной системы

с cGMP вызывала значительный прирост активности АХЭ микросом, то есть эффект cGMP в диализованном цитозоле трансформировался в противоположный.

Доказательством существования низкомолекулярного цитоплазматического фактора, совместно с которым АХ регулирует экспрессию гена АХЭ, служат результаты следующих опытов. Диализат с низкомолекулярными диализуемыми веществами добавляли к бесклеточной системе, содержащей ядра и диализованную микросомно-цитоплазматическую жидкость (см. методы), то есть регенерировали систему, и исходный эффект АХ полностью восстанавливался.

Обсуждение результатов

Проведенный анализ свидетельствует о возможном участии АХ в процессах регуляции биосинтеза АХЭ мембран клеток нервной ткани. Снижение активности этого фермента в результате преникубации бесклеточной системы с пурамицином можно рассматривать, очевидно, как ингибирование его спонтанного синтеза. На фоне актиномицина Д и пурамицина—ингибиторов соответственно транскрипции и трансляции, а также в отсутствие аппарата синтеза РНК, то есть ядер, активирующий эффект АХ не проявлялся. Поэтому можно допустить, что АХ ускоряет спонтанный синтез АХЭ, воздействуя на синтез РНК и ДНК генов АХЭ. В пользу настоящего предположения свидетельствуют также те факты, что в данной системе под влиянием АХ активируется включение ^{14}C -аминокислот в белки микросом, чувствительное к актиномицину Д [9], и ускоряется синтез РНК в ядрах [8]. При этом во всех трех случаях обнаружена аналогичная зависимость от концентрации АХ.

При отсутствии в системе ядер преникубация с АХ приводила к снижению активности фермента в микросомах. Так как на фоне пурамицина, то есть в случае заблокированной трансляции, такого эффекта АХ не оказывал, то можно полагать, что он является ингибитором трансляции. На этом основании полученные факты позволяют предложить такую схему регуляторного влияния АХ на биосинтез АХЭ в микросомах: активирующее действие на ядерном уровне экспрессии генов АХЭ и ингибиторное—на цитоплазматическом. Поскольку в полной системе АХ индуцировал увеличение активности фермента в микросомах, то первое влияние, видимо, может быть основным звеном, а второе—корректирующим.

В то же время полученные результаты не позволяют рассматривать циклические нуклеотиды в качестве посредников в индукторном действии АХ на активность АХЭ, так как они оказывали принципиально иное влияние в бесклеточной системе. Эффект cAMP в различных вариантах бесклеточной системы свидетельствует о том, что его регуляторное влияние на биосинтез АХЭ также представляет самокорректирующуюся систему, в основе которой лежит ингибиторное действие на ядерном уровне и активирующее—на цитоплазматическом. Эффект cGMP как в полной,

так и в безъядерной бесклеточной системе, заключался в снижении активности фермента, не проявлявшемся на фоне рибонуклеазы. Сопоставление же эффектов сGMP в системе с недифференцированной и дифференцированной микросомно-цитоплазматической фракцией дает основание предполагать, что этот циклический нуклеотид влияет на ядерное и цитоплазматическое звенья регуляции биосинтеза АХЭ, причем и в том и в другом случае как ингибитор.

В дифференцированной микросомно-цитоплазматической фракции эффекты АХ и сGMP трансформировались в противоположные, а влияние сАМР почти исчезало. При отсутствии в системе при этом ядер эффект во всех случаях оставался аналогичным тому, который имел место с недифференцированной микросомно-цитоплазматической фракцией. Настоящие результаты свидетельствуют о том, что на ядерное звено регуляции АХ, сАМР и сGMP действовали в комплексе с какими-то анализируемыми цитоплазматическими факторами. Доказательством этому служит восстановление эффекта АХ при добавлении анализируемого материала. Необходимо отметить, что эта реверсия аналогична обнаруженному ранее феномену трансформации эффекта АХ на синтез РНК в ядрах при добавлении цитозоля [8].

Если попытаться экстраполировать результаты, полученные в модельной системе, на цельную клетку, то можно представить систему регуляции биосинтеза АХЭ микросом нервных клеток следующим образом. АХ является положительным эффектором ядерного уровня экспрессии генов АХЭ; сАМР и сGMP служат отрицательными эффекторами—их действие противоположно АХ и, вероятно, является корректирующим. На цитоплазматическом уровне АХ и сGMP выступают как отрицательные эффекторы, а сАМР—как положительный. В основу же всей системы регуляции биосинтеза АХЭ в клетках нервной ткани, вероятно, должно быть положено влияние АХ (в комплексе с цитоплазматическим фактором) на ядерный уровень экспрессии генов АХЭ, так как только АХ проявлял себя как активатор на этом уровне.

Поддержание оптимального количества молекул АХЭ в соответствующих клетках нервной ткани может осуществляться АХ, постоянно присутствующим в цитоплазме холинергических нейронов. Следует заметить, что 20—30% АХ в нервной ткани представляет так называемый «свободный АХ» [10]. Нельзя также исключить, что какая-то часть освобождающегося в синапсах АХ при проведении нервного импульса может поступать в перикариальный постсинаптических клеток. Принципиальная возможность поступления внеклеточного АХ в перикариальный нейрон была постулирована в литературе [11, 12].

Таким образом, в настоящей работе было показано регуляторное влияние АХ, сGMP и сАМР на уровень активности АХЭ микросом, которое позволяет предполагать существование сложной системы регуляции экспрессии генов АХЭ с участием этих агентов.

SYSTEM REGULATING ACETYLCHOLINESTERASE BIOSYNTHESIS VIA ACETYLCHOLINE, cAMP AND cGMP IN NERVE CELL MICROSOMES

SUDAKOVA N. M., ELAEV N. R.

Chair of Biochemistry and Organic Chemistry, State University,
Petrozavodsk

A spontaneous puromycin-sensitive increase in microsomal acetylcholinesterase (AChE) activity has been detected in a cell-free system containing isolated nuclei and microsome-cytosol fraction from rat brain. On preincubating this system with acetylcholine (ACh) (10^{-6} – 10^{-3} M) an increase in microsomal AChE activity is registered with maximal value of 20% (10^{-5} M ACh, 60 min incubation). In the presence of actinomycin D and puromycin ACh has no effect on the enzyme activity. Preincubation with cAMP and cGMP produces opposite effect on the activity of microsomal AChE. Without nuclei in this cell-free system ACh induces a decrease in puromycin-sensitive AChE activity.

Data obtained make it possible to regard ACh as a positive effector of AChE gene transcription and a negative effector of the enzyme polypeptide chains assemblage in cytosol. It has been demonstrated that ACh acts in concert with a low molecular weight cytosol factor when directing transcription or posttranscriptional processing and without the latter when directing translation. A system regulating AChE biosynthesis via ACh, cAMP and cGMP in nerve cell microsomes is proposed.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Wethold R., Mahler H., Woor W. J. *Neurochem.*, 22, 4, 941–944, 1974.
2. Елаев Н. Р. *Биохимия*, 45, 10, 1749–1754, 1980.
3. Елаев Н. Р.—В кн.: I Всесоюзный семинар. Роль циклических нуклеотидов в метаболизме нервной ткани, Пушино, Изд-во АН СССР, с. 8–9, 1980.
4. Елаев Н. Р. *Пробл. эндокринолог.*, 27, 1, 58–62, 1981.
5. Ellman A. L., Courtney K. D., Andres V., Teatherstone R. M. *Biochem. Pharmacol.*, 7, 1, 88–95, 1961.
6. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. I. J. *Biol. Chem.*, 193, 1, 265–269, 1951.
7. Урбах В. Ю. *Математическая статистика для биологов и медиков*, М., Изд-во АН СССР, 1963.
8. Елаев Н. Р. *Цитология*, 20, 10, 1173–1178, 1978.
9. Елаев Н. Р. *Цитология*, 20, 8, 970–972, 1978.
10. De Robertis E. *Science*, 156, 4046, 907–914, 1967.
11. Polak R. L. *Brit. J. Pharmacol.*, 36, 2, 144–152, 1969.
12. Schuberth V., Sundwall A. *Acta Physiol. Scand.*, 72, 1, 65–71, 1968.

Кафедра биохимии и органической химии
Петрозаводского госуниверситета

Поступила 15. II 1982