



УДК 547.963.3:577.157:591.88

ОБРАЗОВАНИЕ ДЕЗАМИДО-NAD В МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ФРАКЦИИ ГОЛОВНОГО МОЗГА

АРУТЮНЯН А. В., МОВСЕСЯН П. О., УРГАНДЖЯН М. Г., БУРНАЗЯН Л. Б.
Институт биохимии АН АрмССР, Ереван

Исследованы продукты превращения NAD в динамике его инкубации (5—60 мин) с митохондриальной фракцией мозга. Использование ряда методических приемов (гель-фильтрация на сефадексе G-25 superfine и G-10, тонкослойная хроматография на пластинках «Silufol», исследование УФ- и инфракрасного (ИК) спектров) позволило установить, что при кратковременной инкубации (5—20 мин) из NAD образуется динуклеотид, который может быть идентифицирован как дезамидо-NAD.

Еще в 1940—50-х гг. было показано образование аммиака из NAD в препаратах печени, почек [1] и мозга [2]. NAD как источник свободного аммиака не может играть существенной роли ввиду его низкого содержания в этих органах. Однако в связи с тем, что было обнаружено участие дезамидо-NAD в циклическом процессе образования аммиака из аминокислот [3, 4] NAD приобретает определенное значение в аммиакообразовании в животном организме.

Образование аммиака из NAD представляет интерес также потому, что при модификации молекулы NAD меняются его коферментные функции и метаболическая роль [5, 6].

В настоящем сообщении приводятся данные, касающиеся изучения продуктов превращения NAD в митохондриальной фракции мозга.

Материалы и методы

Исследования проводились на кроликах массой 2 кг, содержащихся на обычном пищевом рационе.

10%-ный гомогенат мозга, приготовленный на 0,25 М сахарозе (рН 7,4), центрифугировали на холоду (0—4°) для удаления ядер в течение 10 мин при 800 g, после чего, центрифугируя надосадочную жидкость при 20000 g (15 мин), выделяли митохондриальную фракцию [7].

Инкубационная смесь содержала: 0,2 мл 0,2 М трис-НСl буфера, рН 7,4, 0,1 мл 0,12 М $MgSO_4$; 0,1 мл 2,14 М NAD, 0,1 мл 12,3 М никотинамида (NA) и 0,5 мл митохондриальной фракции (4—5 мг белка, что соответствует 500 мг свежей ткани). Объем доводили до 2 мл 0,25 М сахарозой. Инкубацию проводили в течение 5, 10, 15, 20, 30, 45 и 60 мин. Пробы

фиксируют трихлоруксусной кислотой (ТХУ), конечная концентрация которой составляла 2,6%.

В безбелковых экстрактах определяли продукты превращения NAD после последовательного разделения на колонках с сефадексом G-25 superfine (2,6×65 см) и G-10 (3,0×95 см), аммиак и амидный азот определяли методом микродиффузионной перегонки [8], фосфор—микрориметрическим методом [9].

Перед нанесением на сефадекс G-25 из безбелкового экстракта экстрагировали ТХУ эфиром, который удаляли затем выпариванием при постоянном взбалтывании.

Продукты расщепления NAD элюировали с колонки с сефадексом G-25 бидистиллированной водой, регистрировали при 253 нм на фотометре «Uvisord II» («ЛКВ») и концентрировали на ротационном испарителе RVO-64 № 280.

УФ-спектры полученных соединений исследовали на спектрофотометре «Spectord UV VIS». Некоторые из них подвергали дополнительно разделению на сефадексе G-10, после чего исследовали методом тонкослойной хроматографии на пластинках «Silufol» в системе, содержащей 0,5 М LiCl и 0,5 М CH₃COOH (1 : 1). В качестве проявителя использовали 0,015%-ный раствор флюорама в ацетоне и 10%-ный раствор H₂SO₄, пятна детектировали в УФ-хемископе. Для исследования коферментных свойств полученных продуктов использовали метод определения лактатдегидрогеназной и алкогольдегидрогеназной активностей [10]. В отдельных опытах продукты превращения NAD исследовали на инфракрасном спектрофотометре УР-20.

Результаты и обсуждение

Как видно из представленных в таблице данных, из инкубированного с митохондриальной фракцией мозга NAD образуется свободный аммиак, количество которого в динамике инкубации (5—60 мин) прогрессивно возрастает и достигает к 60-й мин 423 нмоль/1 мкмоль NAD.

Образование аммиака в начальные сроки инкубации (до 30-й мин) не сопровождается приростом P_i, что указывает на то, что в этих условиях не происходит дефосфорилирования NAD под влиянием соответствующих митохондриальных ферментов.

Начиная с 30-й мин инкубации, отмечается некоторый прирост P_i, однако его уровень значительно уступает количеству образующегося аммиака. Продукция фосфата может быть обусловлена распадом NAD, который осуществляется в нервной, как и в других тканях, под влиянием NAD-нуклеотидазы, NAD-пирофосфатазы и NAD-пирофосфорилазы. Образующиеся в реакциях, катализируемых этими ферментами, аденин-нуклеотиды (ADP-рибоза, АМР и АТР) подвергаются в митохондриальной фракции мозга дефосфорилированию [4].

На рис. 1, 2 представлены абсорбционные кривые продуктов деградации NAD, инкубируемого с митохондриальной фракцией мозга,

выявляемые при пропускании ее безбелкового экстракта через сефадекс G-25. Полученные данные указывают на то, что в начальные сроки инкубации (до 20-й мин) наряду со снижением содержания NAD обнаруживается пик (А), элюируемый с колонки значительно раньше, чем

Таблица

Образование аммиака и неорганического фосфора (в имоль/1 мкмоль NAD) при инкубации митохондриальной фракции мозга кроликов с NAD (n=10)

Время инкубации (мин)	NH ₃	P _i
0	—	—
5	124,20±4,35	—
10	161,10±2,74	—
15	216,8±3,1	—
20	264,70±2,27	—
30	299,80±3,15	73,40±3,24
45	370,30±1,66	167,10±2,77
60	423,30±2,99	326,70±2,81

NAD. Величина этого пика возрастает вплоть до 20-й мин инкубации, что сопровождается почти полным исчезновением NAD и появлением не большого пика (В), элюируемого с колонки непосредственно перед N_A. К 30-й мин инкубации содержание пика А уменьшается, а площадь пика В несколько возрастает. На 60-й мин инкубации наблюдается значительная деградация пика А одновременно с еще большим увеличением площади пика В и появлением несимметричного пика (С), который элюируется с колонки позднее, чем это было характерно для пика А (рис. 2).

Пики В и С были идентифицированы нами как инозин и никотинамидмононуклеотид, так как добавление этих соединений в концентрациях, эквивалентных исходной концентрации NAD (10⁻⁴ М), к ТХУ-экстракту митохондриальной фракции перед нанесением на колонку приводило к возрастанию площади соответствующих пиков (совпадение пика В и инозина, пика С и никотинамидмононуклеотида).

Элюаты пика А, собранные на 15-й—20-й мин инкубации, концентрировали до 5 мл и наносили на колонку с сефадексом G-10, на которой происходило его разделение на два соединения (I и II) (рис. 3, а). Методом микродиффузионной перегонки [8] в присутствии насыщенных растворов K₂CO₃ и КОН было обнаружено, что одно из них (I) в отличие от другого (II) не содержит амидной группы. ИК-спектры этих соединений указывают на то, что оба они являются динуклеотидами, так как имеют характерную для пирофосфатной связи частоту 940—970 см⁻¹. Наряду с этим в ИК-спектре соединения I отсутствует характерная для амидной группы полоса поглощения при 675 см⁻¹, тогда как в спектре соединения II она содержится.

Изучение УФ-спектров указанных соединений показало, что соединение I имеет при pH 7,0 максимум поглощения при 263 нм (рис. 4), что напоминает УФ-спектры NAD, ADP-рибозы и других адениннуклеотидов, в то время как соединение II поглощает преимущественно в области 250—259 нм, что совпадает со спектрами поглощения деаминоформ аденинмононуклеотидов.

Для идентификации I и II соединений их наносили на колонку с сефадексом G-10 совместно с ADP-рибозой и NAD (рис. 3, б, в). Оказалось, что объемы выхода соединения I и указанных нуклеотидов не совпадают, но близки между собой.

Обнаружено также различие в R_f указанных соединений при тонкослойной хроматографии: NAD—0,55, ADP-рибозы—0,88, I—0,82, II—0,73.

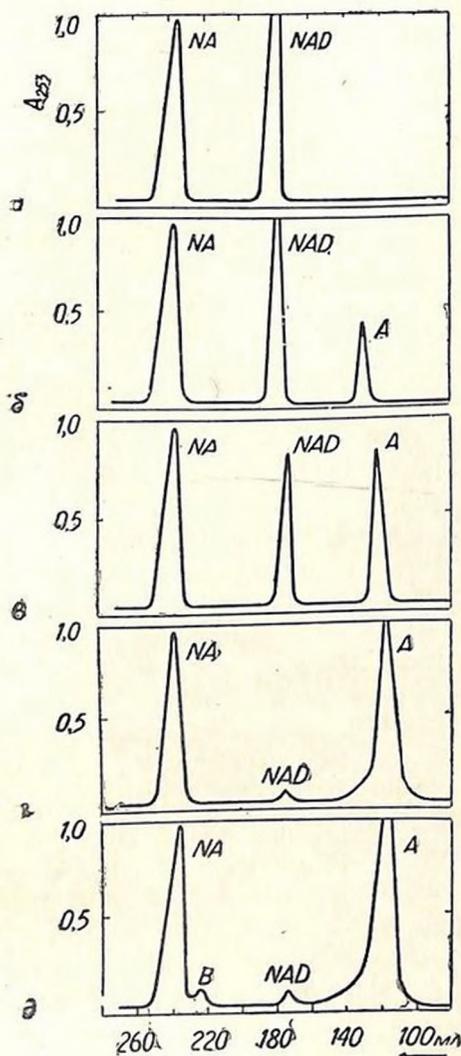


Рис. 1. Гель-фильтрация на сефадексе G-25 безбелкового экстракта митохондриальной фракции мозга, инкубированной с NAD в течение 20 мин в присутствии NA. Время инкубации: а—0 мин; б—5 мин; в—10 мин; г—15 мин; д—20 мин. Стрелкой указано направление элюции

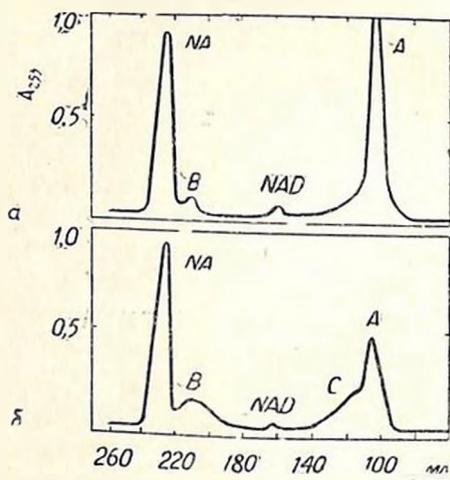


Рис. 2. Гель-фильтрация на сефадексе G-25 безбелкового экстракта митохондриальной фракции мозга, инкубированной с NAD в присутствии NA в течение 30 (а) и 60 (б) мин. Стрелкой указано направление элюции

На основании полученных результатов можно прийти к заключению, что одно из выделенных нами соединений (II) следует классифицировать, как описанный ранее Мовсесяном и соавт. дезамин-NAD [3, 4, 11]. На это указывают прежде всего ИК- и УФ-спектры этого соединения, свидетельствующие о его динуклеотидной природе. Соединение I, по нашим данным, также является динуклеотидом, но в отличие от II не содержит амидного азота, что позволяет идентифицировать его как дезамидо-NAD.

Проведенные исследования показали, что дезамидо-NAD не обладает коферментной активностью в алкогольдегидрогеназной и лактатдегидрогеназной реакциях.

Дезамидо-NAD в тканях животных образуется в ядерной фракции в процессе синтеза NAD в реакции, катализируемой NAD-пирофосфорилазой и NAD-синтазой [12, 13].

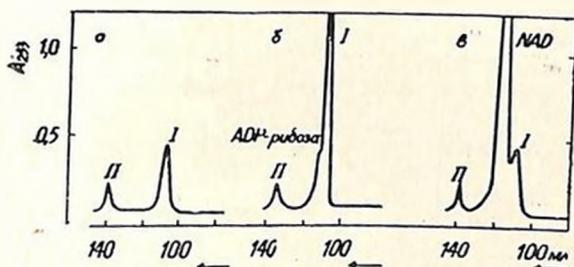


Рис. 3. Гель-фильтрация на сефадексе G-10 элюата пика А, взятого в отдельности (а) и в присутствии ADP-рибозы (б) и NAD (в). Стрелками указано направление элюции.

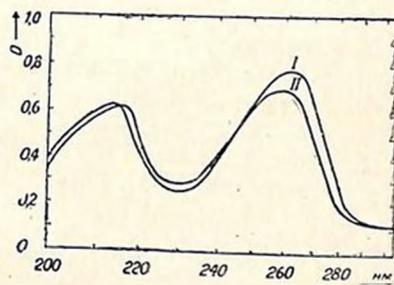


Рис. 4. Ультрафиолетовые спектры соединений I и II, полученных при гель-фильтрации элюата пика А на сефадексе G-10

Полученные данные свидетельствуют о возможности образования дезамидо-NAD в митохондриальной фракции мозга путем прямого дезамидирования NAD.

Авторы выражают искреннюю благодарность зав. лабораторией физической химии ИТОХ АН АрмССР им. А. Л. Миджояна Л. В. Хажакяну за проведение экспериментов по ИК-спектрофотометрии нуклеотидов.

FORMATION OF DEAMIDO-NAD IN BRAIN MITOCHONDRIAL FRACTION

HAROUTUNYAN A. V., MOVSESSYAN N. O., URGANDJYAN M. G., BURNAZYAN L. B.

Institute of Biochemistry, Armenian SSR Academy of Sciences, Yerevan

By means of gel-filtration on Sephadex G-25 superfine and G-10, tlc on "Sylufol" plates, UV and IR spectra it was established that on short-term incubation of brain mitochondrial fraction with NAD a dinucleotide is formed that proved to be deamido-NAD.

ЛИТЕРАТУРА

1. Браунштейн А. Е., Азарх Р. М. Биохимия, 9, 6, 337—359, 1944.
2. Mintz J. A. J. Biol. Chem., 201, 1, 221—235, 1953.
3. Бунятыян Г. Х., Мовсесян С. Г., Арутюнян А. В.—В кн.: Пятая Всесоюз. конф. по нейрохимии, Тбилиси, с. 161—178, 1970.
4. Бунятыян Г. Х. Вопросы биохимии мозга, Ереван, Издво АН АрмССР, 8, 5—14, 1973.
5. Kaplan N. O., Sarma R. H.—In: Pyridine Nucleotide Dependent Dehydrogenases Ed. by U., N. Y., Sund, Spring Verlag, p. 39, 1970.

6. Мальцев Н. И., Воронцов Е. А., Шорс Е. И., Рубчинская Ю. М., Мищенко В. В., Яковлев В. А. Молекуляр. биология, 7, 2, 269—277, 1973.
7. Бунятян Г. Х., Мовсесян С. Г. Вопросы биохимии мозга, Ереван. Изд-во АН АрмССР, 2, 5—22, 1966.
8. Силакова А. И., Труни Г. П., Являкова А. Вопросы мед. химии, 8, 5, 538—546, 1962.
9. Taussky H. U., Shore E. J. Biol. Chem., 202, 675—685, 1953.
10. Кочетов Г. А.—В кн.: Практическое руководство по энзимологии (под ред. С. Е. Се-
11. Мовсесян С. Г., Бунятян Г. Х., Манасян Р. Ф. Вопросы биохимии мозга, Ереван. верина), М., Высшая школа, 1980. Изд-во АН АрмССР, 4, 5—27, 1968.
12. Дэйли С., Никольсон Д.—В кн.: Метаболические пути (под ред. И. С. Кулаева), М., Мир, 1973.
13. White A., Handler P., Smith E.—In: Principles of Biochemistry, McGraw Hill Book Co., N. Y., 1973.

Поступила 3. II 1983