



УДК 577.115.7.

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ГАНГЛИОЗИДОВ С МЕДЬЮ

ТУМАШОВА С. Ю., НАЛБАНДЯН Р. М.

Физиологический институт им. А. А. Ухтомского ЛГУ им. А. А. Жданова, Ленинград
Институт биохимии АН АрмССР, Ереван

Ганглиозиды из мозга свиньи и больного с диагнозом «болезнь Тея-Сакса» имеют два центра связывания меди, которые различаются по сродству. Методом ЭПР показано, что наблюдаются существенные изменения в сродстве к меди одного из этих центров в случае ганглиозидов из патологического мозга.

Значение меди для НС не исчерпывается ее важной ролью в функционировании окислительно-восстановительных ферментов, таких как цитохромоксидаза, супероксиддисмутаза, дофамин- β -гидроксилаза. В последнее десятилетие из нервной ткани были выделены новые медьсодержащие белки (альбокупренин, нейрокупренин), роль которых пока не выяснена [1]. Эти белки не обнаружены в других животных тканях. Наличие специфических медьсодержащих белков дает основание предположить, что обмен меди в нервной ткани имеет свои особенности, для выяснения которых представляется необходимым изучение взаимодействия ионов меди с различными компонентами нервной ткани.

Как известно, гликолипиды, и в частности ганглиозиды, являются теми компонентами нервной ткани, которые во многом определяют поверхностные свойства клеток [2]. Поэтому изучение взаимодействия ионов меди с гликолипидами может представлять интерес для выяснения механизма транспорта меди между клетками. Кроме того, многие медьсодержащие белки и ферменты являются гликопротеидами. Значение их углеводной компоненты в связывании меди является проблематичным, и взаимодействие меди с различными углеводсодержащими компонентами клеток заслуживает также более подробного исследования. В данном сообщении мы приводим результаты изучения взаимодействия ионов меди с ганглиозидами.

Материалы и методы

В работе использованы ганглиозиды, полученные из мозга свиньи и больного подростка с диагнозом «болезнь Тея-Сакса» [3]. Содержание индивидуальных ганглиозидов в препаратах из этих источников сравнено в табл. 1.

Ганглиозиды растворяли в деионизированной воде в концентрации 20—25 мг/мл, и эти растворы титровали 10^{-2} М Cu^{+2} . После добавления аликвотов меди смесь инкубировали в течение 5—10 мин при комнатной температуре. Затем регистрировали сигналы ЭПР смесей, содержащих различные концентрации меди. Запись сигналов ЭПР проводили на приборе Е-4 («Varian», США) в кварцевых трубках с внутренним диаметром 4 мм. Условия регистрации сигналов были подобраны таким образом, чтобы избежать эффектов, связанных с насыщением образцов и «перемодуляцией» (мощность—10 мВт, амплитуда модуляции—6,3 гс). Частота микроволнового излучения составляла 9,37 ГГц, постоянная времени—0,3 с, температура—160°.

Оптические спектры растворов ганглиозидов и их комплексов с медью регистрировали на спектрофотометре М-26 («Bechman», Австрия) в кварцевых кюветках с длиной оптического пути 1 см. Спектры получены при комнатной температуре. Добавление меди к растворам ганглиозидов не приводило к появлению заметного помутнения.

Результаты исследования

В отличие от гидратированной меди (раствор хлорида меди в воде), медь в присутствии ганглиозидов обнаруживает сигнал ЭПР аксиальной формы с выраженной сверхтонкой структурой в параллельной области спектра (низкие поля). Сигналы ЭПР гидратированной меди и меди в присутствии ганглиозидов сравнены на рис. 1. Уже непосредственно из сравнения форм наблюдающихся сигналов можно заключить, что ионы меди взаимодействуют с ганглиозидами, то есть образуют комплексы типа двухвалентная медь—ганглиозид, о чем свидетельствуют также оптические спектры. В присутствии ганглиозидов в оптическом спектре появляется широкая асимметричная полоса с максимумом вблизи 620—660 нм.

При более подробном рассмотрении спектров ЭПР смесей ганглиозиды—медь было выявлено, что число компонент сверхтонкой структуры в параллельной области спектров превышает 4. Если бы в этих смесях обнаруживался один тип комплексов меди с ганглиозидами, то наблюдалось бы только 4 линии, поскольку ядерный спин меди равен $3/2$. Как видно из низкочастотной части спектра, показанной на рис. 2, отчетливо наблюдаются 6—7 компоненты сверхтонкой структуры. Это означает, что в смесях медь—ганглиозиды образуются по меньшей мере 2 типа комплексов, различающихся по параметрам сигналов ЭПР (g-факторы, величины сверхтонких расщеплений, ширины линий). Характерно, что для ганглиозидов из мозга свиньи была получена аналогичная картина, свидетельствующая об образовании двух типов комплексов с медью.

Мы попытались определить стехиометрию образовавшихся комплексов, титруя растворы ганглиозидов медью и регистрируя изменения формы сигнала ЭПР, в частности в низкочастотной (параллельной) области. На рис. 3 приведены наблюдающиеся изменения формы линии крайней компоненты при увеличении концентрации меди в смеси. Эта компонента содержит два максимума, соотношение интенсивностей между которыми значительно изменяется с изменением концентрации меди. В исследованном диапазоне концентраций меди (от 10^{-4} до

10^{-3} М) соотношение между интенсивностями этих двух максимумов изменяется примерно в 3 раза, причем увеличивается интенсивность, главным образом, левого из этих двух максимумов, тогда как интенсивность правого практически не возрастает. Таким образом, правый максимум принадлежит комплексу меди с ганглиозидами, характеризующемуся более высоким сродством к меди, а левый максимум — комплексу со сравнительно низким сродством.

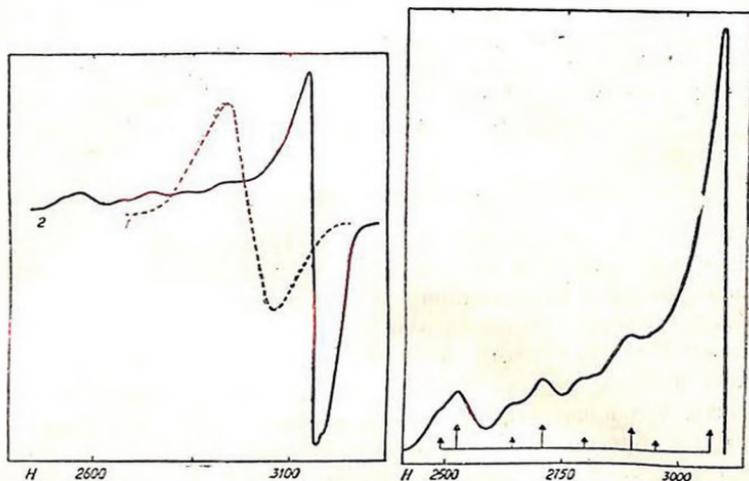


Рис. 1. Сравнение форм сигналов ЭПР гидратированной меди (1) и комплекса меди с ганглиозидами свиньи (2). Содержание меди $2 \cdot 10^{-4}$ М

Рис. 2. Низкопольная область спектра ЭПР комплекса меди с ганглиозидами свиньи. Стрелки одинаковых размеров указывают на компоненты, принадлежащие одному и тому же типу комплекса меди

Для комплекса с высоким сродством к меди удалось определить его стехиометрию. Если среднюю величину M_r ганглиозида принять за 1500, то этот комплекс соответствует примерно стехиометрии 1:1, то есть один атом меди связан с каждой молекулой ганглиозида. Увеличение концентрации меди не изменяет концентрации этого комплекса, однако способствует ее взаимодействию с другими медьсвязывающими участками в ганглиозидах. Таким образом, при более высоких концентрациях меди возникают также комплексы со стехиометрией медь/ганглиозид больше 1,0. Последние характеризуются меньшей величиной константы сверхтонкого расщепления ($A_{II} = 150$ э), тогда как комплексы с высоким сродством (правый максимум) имеют большую величину константы сверхтонкого расщепления ($A_{II} = 180$ э). При добавлении к ганглиозидам мозга свиньи меди в крайне высоких концентрациях (10^{-2} М и выше) помимо двух рассмотренных сигналов в спектре ЭПР появляется широкая одиночная линия, соответствующая свободным (не связанным с ганглиозидами) ионам меди. Следовательно, указанные два центра связывания, по-видимому, исчерпывают возможности взаимодействия меди с ганглиозидами.

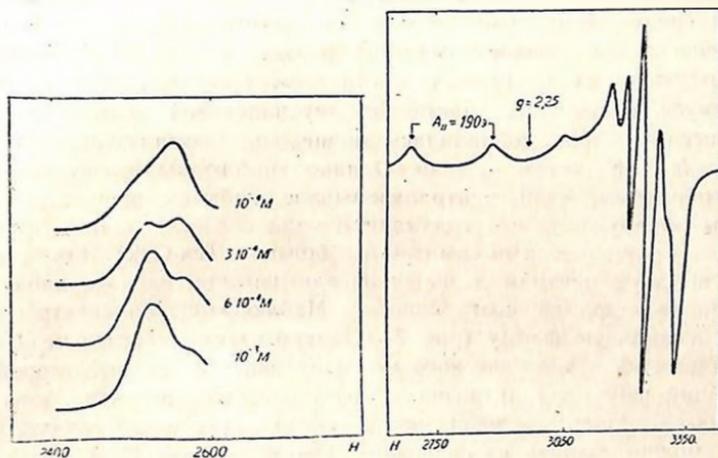


Рис. 3. Изменение формы крайней низкочастотной компоненты сигнала ЭПР в присутствии различных концентраций меди. Ганглиозиды из мозга свиньи

Рис. 4. Сигнал ЭПР, наблюдающийся при щелочной обработке комплексов меди с ганглиозидами свиньи

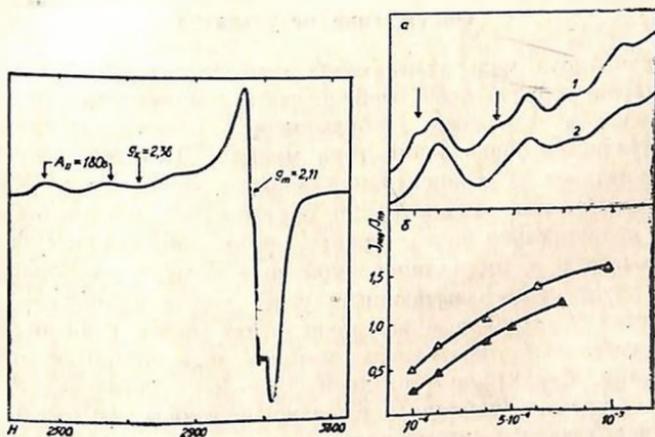


Рис. 5. Спектр ЭПР комплекса меди с патологическим набором ганглиозидов. Содержание меди $10^{-4} M$

Рис. 6. Сравнение формы низкочастотной части сигналов ЭПР комплексов меди с патологическими ганглиозидами (2) и ганглиозидами свиньи (1) при одной и той же концентрации меди ($2 \cdot 10^{-4} M$) (а) и кривых титрования медью ганглиозидов свиньи ($-\Delta-$) и ганглиозидов мозга больного $-\blacktriangle-$, прослеженное по изменению отношения интенсивностей левого и правого максимума крайней низкочастотной компоненты (б)

Комплексы меди с ганглиозидами были устойчивы лишь в слабых кислых средах. В щелочной среде они быстро разрушались, о чем свидетельствовало резкое изменение формы сигнала ЭПР. Возникающий при этом сигнал (рис. 4) соответствует сигналу, обычно наблюдающемуся в щелочных растворах двухвалентной меди. Его форма не зависела от того, добавлялась ли щелочь к комплексам с высоким или низким сродством к меди. Однако наблюдающиеся изменения были обратны, если нейтрализовывали избыток щелочи.

Мы обнаружили, что связывание меди с ганглиозидами из мозга больного с клиническими симптомами болезни Тея-Сакса также происходит по двум центрам в молекуле ганглиозида, как это характерно для ганглиозидов из мозга свиньи. Наблюдающийся спектр также имеет аксиальную форму (рис. 5). Однако взаимодействие меди с ганглиозидами из патологического мозга отличается тем, что второй связывающий центр в ганглиозидах мозга больного, вероятно, имеет более низкое сродство к меди, чем в ганглиозидах мозга свиньи. Такой вывод можно сделать из сравнения формы низкочастотной компоненты сверхтонкой структуры спектров ЭПР изученных ганглиозидов и зависимости отношения интенсивностей двух максимумов низкочастотной компоненты (рис. 6). Как видно, при одной и той же концентрации меди ганглиозиды мозга больного слабее связывают медь по второму центру.

Обсуждение результатов

Наличие двух медьсвязывающих центров в растворах ганглиозидов, вероятно, обусловлено особенностями молекулярного строения ганглиозидов, а не связано с образованием в растворах ганглиозидов надмолекулярных образований типа мицелл. Действительно, хотя величины критических концентраций мицеллообразования (ККМ) для ганглиозидов весьма низки [4] и образование мицелл наблюдается уже при сравнительно низких ионных силах, однако описанные опыты были проведены в дистиллированной воде в отсутствие солей. По-видимому, двумя медьсвязывающими участками в молекуле ганглиозида являются углеводная и жирнокислотная части. Способность углеводов связывать многие тяжелые металлы и, в частности медь, хорошо известна. Структурные различия между ганглиозидами мозга свиньи и больного (таблица), вероятно, способны объяснить наблюдавшиеся различия в связывании ионов меди ганглиозидами нормального и патологического мозга. Однако в настоящее время трудно выдвинуть какие-либо конкретные предположения о структуре этих комплексов об участии тех или иных групп ганглиозидов в связывании меди. Тем не менее, представление о вовлеченности в комплексобразование ацетилнейраминавой кислоты представляется очевидным. В частности, участие карбоксильных групп ацетилнейраминавой кислоты в связывании Ca^{2+} было четко показано [5]. Изучение электрических

свойств пленок ганглиозидов из нормального и патологического мозга также выявило определенные различия этих ганглиозидов в связывании Ca^{2+} [6]. На основании имеющихся данных [7, 8] можно утверждать, что комплексообразование с медью у ганглиозидов, содержащих N-ацетилгалактозамин, будет отличаться от ганглиозидов, не имеющих его в своем составе.

Сравнительно высокое сродство ганглиозидов к меди позволяет предполагать, что они могут принимать участие в связывании меди *in vivo*. В пользу такой возможности косвенно свидетельствует также тот факт, что все выделенные ганглиозиды содержали медь, которую можно определить методом ЭПР, а также атомно-абсорбционной спектроскопией. Однако содержание меди в препаратах ганглиозидов было в 10—20 раз ниже насыщающих концентраций. Таким образом, проведенные опыты подтверждают возможность того, что ганглиози-

Таблица

Состав индивидуальных ганглиозидов головного мозга исследуемых объектов

Ганглиозиды	Мозг больного	Мозг свиньи
Тетрасиалоганглиозид G_Q	9,8	—
Трисиалоганглиозид G_{T_1}	23,7	16,3
Дисиалоганглиозид G_{D_1b}	20,7	18,1
Дисиалоганглиозид G_{D_1a}	13,6	37,4
Дисиалоганглиозид G_{D_2}	5,9	—
Дисиалоганглиозид G_{D_3}	5,1	—
Моносиалоганглиозид G_{M_1}	12,1	21,7
Моносиалоганглиозид G_{M_2}	5,8	0,9
Моносиалоганглиозид G_{M_3}	3,3	—

ды могут принимать участие в транспорте ионов меди между клетками. У ганглиозидов из патологического мозга способность к связыванию меди оказывается, по крайней мере частично, измененной. Последствия этого факта для организма трудно оценить в полной мере, однако очевидно, что нарушения обмена меди вовлекаются в общую картину развития патологического процесса при ганглиозидозах, приводящего к летальному исходу.

Полученные данные ясно показывают, что медьсвязывающие центры мозга не ограничены белками. Как установлено, гликолипиды также могут принимать участие в связывании меди. Исходя из этого, следует иметь в виду возможные влияния ганглиозидов на обмен меди. В частности, заслуживает подробного изучения взаимодействие ганглиозидов с медьсодержащими белками и ферментами мозга.

INTERACTION OF GANGLIOSIDES WITH COPPER

TUMANOVA S. Y., NALBANDYAN R. M.

Institute of Biochemistry, Arm. SSR Academy of Sciences, Yerevan

Two copper-binding sites differing substantially in their affinity for copper ions have been detected in gangliosides isolated from both porcine brain and the brain of Tay-Sachs patients. EPR data point out that in pathology the affinity for copper in one of these copper-binding sites is changed drastically.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. *Nalbandyan R. M.* Neurochem. Res., v. 8, № 10, p. 1211—1232, 1983.
2. *Туманова С. Ю.* Биохимия, т. 43, № 3, с. 387—398, 1978.
3. *O'Brien J. S.* Adv. Human Genetics, v. 3, p. 39—98, 1972.
4. *Formisano S., Johnson M. L., Lee G., Aloj G. M., Edelhodt H.* Biochemistry, v. 18, p. 1119—1124, 1979.
5. *Gatt S., Gazit B., Cestaro B., Barenholz J.* Adv. Exp. Med. Biol., v. 125, p. 135—146, 1980.
6. *Tumanova S. Yu., Badjinian S. A., Nalbandyan R. M.* Biochem. and Biophys. Res. Commun., v. 84, p. 520—526, 1978.
7. *Harris P. L., Thornton E. R. J.* Amer. Chem. Soc., v. 100, p. 6738—6745, 1978.
8. *Schauer R., Veh R. W., Sander M., Gorfteld A. P., Wiegandt H.* Adv. Exp. Med. Biol., v. 125, p. 283—294, 1980.

Поступила 3. IX 1985.