



УДК 577.152:611.018.8

## ВЛИЯНИЕ АКТОМИОЗИНОПОДОБНОГО БЕЛКА НА ДЕЗАМИНИРОВАНИЕ АМР В ТКАНИ МОЗГА

НЕРСИСЯН Ц. М., КОЧАРЯН М. Г., АРУТЮНЯН А. В.

Институт биохимии АН АрмССР, Ереван

Среди работ, посвященных изучению актомиозиноподобных белков (АМПБ) немышечных тканей, особое место занимает исследование сократительных белков нервной ткани и мозгового вещества надпочечников, выполняющих ряд аналогичных функций, одной из которых является возможное их участие в секреторных процессах.

Гипотеза о контрактильной природе секреции нейромедиаторов и гормонов была сформулирована после открытия системы сократительных белков в нервных окончаниях и хромоаффинных клетках [1, 2].

Выделенный из синапсом АМПБ является  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ -стимулируемой АТРазой, для которой характерна реакция суперпреципитации в присутствии АТР и  $Mg^{2+}$  и высокая вискозиметрическая чувствительность по отношению к АТР [1—3].

Имеются сведения, указывающие на то, что препараты АМПБ мозга обладают также активностью АХЭ [4] и АМР-деаминазы—фермента, представленного в синапсомах и, по-видимому, регулирующего фонд адениннуклеотидов в этой фракции [5].

Присутствие АМР-деаминазной, также как ацетилхолинэстеразной активности в препаратах АМПБ, по мнению авторов, может быть обусловлено образованием комплекса между ними и соответствующими ферментами [4, 5]. Не исключена возможность ассоциации указанных ферментов с АМПБ в ходе их очистки [6].

Работами Suelter и соавт. [7, 8] показано, что АМР-деаминазная активность препаратов мышечного актомиозина объясняется комплексобразованием между актомиозином и АМР-деаминазой. Эти авторы при применении ИОХ на фосфоцеллюлозе и ДЕАЕ-целлюлозе получили препараты актомиозина, не обладающие АМР-деаминазной активностью.

В настоящем исследовании была предпринята попытка выделить из ткани мозга препараты АМПБ, не обладающие активностью АМР-деаминазы. С этой целью был использован разработанный Adelstein и

соавт. метод выделения немышечных сократительных белков [9], модифицированный Barridge и Gray для ткани мозга куриного эмбриона [10].

30 г мозга крыс гомогенизировали в 3-х объемах буфера, содержащего 0,6 М КСl, 15 мМ трис-НСl, рН 7,4, 1 мМ дитиотрептола. Гомогенат центрифугировали при 40000g в течение 15 мин. В надосадочную жидкость добавляли  $Mg^{2+}$ -АТР до конечной концентрации 5 мМ и центрифугировали 1 ч при 100000g.

Полученный супернатант фракционировали сульфатом аммония (30—55%), и образующийся осадок ресуспензировали в минимальном объеме исходного буфера, содержащего 1 мМ  $Mg^{2+}$ -РРi. Затем добавляли АТР до конечной концентрации 5 мМ и центрифугировали 15 мин для осветления раствора. Надосадочную жидкость в объеме 5 мл, содержащую 165 мг белка (фракция I), наносили на колонку с сефарозой-4В, уравновешенную исходным буфером, в который добавляли 1 мМ  $Mg^{2+}$ -РРi и элюировали тем же буфером со скоростью 15 мл/ч, поддерживая ее гидростатическим давлением. Фракции, обладающие АТРазной активностью (50 мл), концентрировали вакуумным диализом до 5 мл (40 мг белка) и использовали в качестве препарата АМПБ (фракция II).

АТРазную активность определяли по методу Marsh [11], модифицированному Berg и соавт. [12]. Пробы в объеме 1 мл (содержащие 3,3 мг и 0,8 мг АМПБ из I и II фракций соответственно) инкубировали при 37° в среде, состоящей из 0,03 М имидазол-НСl буфера, рН 6,8; 0,06 М КСl; 5 мМ АТР и по 5 мМ  $MgCl_2$ ,  $CaCl_2$  и 2,5 мМ ЭДТА. Реакцию останавливали через 30 мин добавлением 0,5 мл 20%-ной трихлоруксусной кислоты.

В качестве источника АМР-деаминазы использовали растворимую фракцию (РФ), полученную при центрифугировании 30 мин при 16000 об/мин гомогената мозга крыс, приготовленного на 0,2 М трис-НСl буфере, рН 7,4. АМР-деаминазную активность определяли по приросту аммиака при 30-минутной инкубации при 37°. Инкубационная среда содержала: 0,5 мл РФ (2—2,5 мг белка), 5 мМ АМР, 50 мМ трис-НСl, буфера, рН 7,4, 3,3 мг и 0,8 мг белка из I и II фракций соответственно. Аммиак определяли микродиффузионным способом [13].

Из данных, представленных в таблице, видно, что обогащенная АМПБ фракция I обладала  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ -стимулируемой АТРазной активностью. Под влиянием ЭДТА наблюдалось статистически достоверное ингибирование фермента.

Во фракции II, полученной после гель-фильтрации на сефарозе 4 В, значительно возрастала У. А. АТРазы выделенного белка, при этом эффект ЭДТА сохранялся. Активирующее действие  $Mg^{2+}$  на АТРазу полученного белка несколько превышало эффект  $Ca^{2+}$ . Одновременное добавление  $Mg^{2+}$  и  $Ca^{2+}$  не приводило к увеличению степени активирования АТРазы, что характерно для АМПБ [1—3].

Выделенный нами белок коагулировал в среде, содержащей 0,1 М

KCl, 5 мМ MgCl<sub>2</sub> и 5 мМ АТР, что свидетельствует о реакции супер-преципитации.

Отсутствие ингибирующего влияния Mg<sup>2+</sup>, наряду с подавлением АТРазной активности под влиянием ЭДТА, указывает на то, что в приведенных экспериментальных условиях не происходит диссоциации АМПБ с образованием миозина мозга, для которого характерна Mg<sup>2+</sup>-ингибируемая, K<sup>+</sup>, ЭДТА-зависимая активность фермента [6].

Таблица

Активность АТРазы (мкмоль Р /мг белка АМПБ/мин) препаратов АМПБ, выделенных из ткани мозга крыс (n=6)

Условия опыта	АМПБ	
	Фракция I	Фракция II
Контроль (АТР)	0,20±0,07	0,50±0,06
Ca <sup>2+</sup>	0,30±0,03*	0,70±0,06*
Mg <sup>2+</sup>	0,40±0,04**	0,90±0,08*
ЭДТА	0,12±0,01	0,30±0,04*
Ca <sup>2+</sup> + Mg <sup>2+</sup>	0,42±0,03**	0,93±0,07**

Примечание. \* p<0,05; \*\* p<0,001

В совокупности с данными об эффекте Mg<sup>2+</sup> и Ca<sup>2+</sup> на АТРазу выделенного препарата полученные результаты позволяют полагать, что изолированный нами белок обладает свойствами АМПБ.

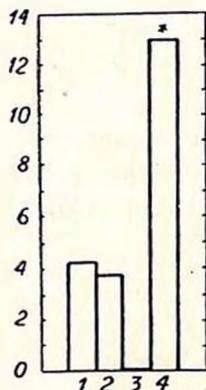


Рис. Влияние препаратов АМПБ на АМР-дезаминазную активность растворимой фракции мозга. По оси ординат—активность АМР-дезаминазы (мкмоль NH<sub>3</sub>/мг белка). 1—растворимая фракция (РФ); 2—фракция I; 3—фракция II; 4—РФ+фракция II; \*p<0,001

Характерно, что У. А. АМР-дезаминазы препаратов АМПБ из целого мозга значительно уступает активности соответствующего препарата, полученного ранее из синапсом [5]. Следует отметить, что Mg<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>-зависимая активность АМПБ, выделенного из синапсом, почти в 2—5 раз выше активности АТРазы, изолированной из гомогената мозга [14], из чего можно заключить, что АТРазная активность АМПБ нейронов выше, чем глии.

Полученный при очистке фракции, обогащенной АМПБ, на сефарозе 4В препарат АМПБ (фракция II) был полностью лишен АМР-дез-

аминазой активности. Однако добавление его к растворимой фракции мозга, где преимущественно локализована АМР-деаминаза [15, 16], приводило к 3-кратному увеличению АМР-деаминазной активности: У. А. АМР-деаминазы возрастала с  $4,3 \pm 0,4$  до  $13,0 \pm 0,5$  мкмоль  $\text{NH}_3/\text{мг}$  белка/ч (рисунок).

Полученные данные свидетельствуют о том, что по мере дальнейшей очистки АМПБ его можно отделить от АМР-деаминазы, то есть АМПБ ткани мозга не отличается в этом отношении от актомиозина скелетных мышц [7, 8].

Стимулирование АМР-деаминазной активности растворимой фракции мозга при добавлении к ней препаратов выделенного АМПБ (фракция II) является подтверждением ранее полученных в нашей лаборатории данных об образовании комплекса между АМПБ и АМР-деаминазой [5].

Дальнейшие исследования помогут выяснить, происходит ли это взаимодействие за счет миозиноподобного компонента АМПБ, как это доказано для мышечной ткани [17], или обусловлено наличием в составе АМПБ  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимых регуляторных белков тропонин-тропомиозиновой системы, обычно сопутствующих АМПБ при очистке [2].

## ACTION OF ACTOMYOSIN-LIKE PROTEIN ON AMP DEAMINATION IN RAT BRAIN

NERSISYAN Ts. M., KOCHARYAN M. G., HAROUTYUNYAN A. V.

Institute of Biochemistry, Armenian SSR Academy of Sciences, Yerevan

Actomyosin-like Protein (AMLPL) devoid of AMP-deaminating activity has been purified from rat brain using Sepharose 4B. Addition of AMLPL to the brain soluble fraction, where AMP-deaminase is predominantly detected, results in a 3-fold increase in enzyme activity. Data obtained point to a possible complex formation between AMP-deaminase and AMLPL in brain.

### Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Berl S., Puszkin S., Nicklas W. *Science*, 179, 441—446, 1973.
2. Trifaro J. M. *Neuroscience*, 3, 1—24, 1978.
3. Puszkin S., Nicklas W., Berl S. J. *Neurochem.*, 19, 1319—1333, 1972.
4. Крыжановский Г., Глебов Р., Дмитриева Н., Федоров Н. *Бюл. эксперим. биол. и мед.*, 3, 280—286, 1972.
5. Ниазян Р. М., Арутюнян А. В. *Вопросы биохимии мозга*, 14, 121—126, 1980.
6. Глебов Р. Н.—В кн.: *Итоги науки и техники, серия Биологическая химия*, 17, 158, ВИНТИ, М., 1982.
7. Byrnes E., Suelter C. H. *Biochim. et biophys. acta*, 20, 422—427, 1965.
8. Harris M., Suelter C. H. *Biochim. et biophys. acta*, 133, 393—398, 1966.
9. Adelstein R., Conti M., Johnson G., Paster J. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 69, 3693—3697, 1972.
10. Barridge K., Bray D. J. *Mol. Biol.*, 99, 1—14, 1975.

11. *Marsh B. B.* Biochim. et biophys. acta, 32, 375—383, 1957.
12. *Puszkín S., Berl S., Puszkín E., Clarke D.* Science. 161, 170—171, 1968.
13. *Силакова А., Труш Г., Являкова А.* Вопр. мед. химии, 5, 538—545, 1968.
14. *Berl S., Puszkín S.* Biochemistry, 9, 2058—2066, 1970.
15. *Малышева М. К., Полякова Н. М.* Укр. біохім. журн. 37, 3, 360—367, 1965.
16. *Smith L., Kyzer D.* Federat. Proc., 27, 3241, 1968.
17. *Shiraki H., Ogawa H., Matsuda Y., Nakagawa H.* Biochim. et biophys. acta, 556, 335—352, 1979.

Поступила 29. III 1984

## В ИЗДАТЕЛЬСТВЕ «МИР» ГОТОВИТСЯ К ВЫПУСКУ В 1985 ГОДУ:

СКОУПС Р. Методы очистки белков (пер. с англ.). М., Мир, 1985 (III кв.)—22 л. Тираж 6000 экз. Цена 3 р. 50 к.

В книге изложены принципы и методы основных способов выделения и очистки белков, определения их концентрации и ферментативной активности.

Для биохимиков, иммунологов, химиков и других специалистов, занимающихся выделением и очисткой белков.

ЯКУБКЕ Х. Д., ЕШКАЙТ Х. Аминокислоты, пептиды, белки (пер. с нем.). М., Мир, 1985 (II кв.)—30 л. Тираж 3000 экз. Цена 4 р. 80 к.

Книга содержит основной материал по химии природных соединений, новейшие данные по синтезу ряда важных пептидных гормонов, их биологической роли; в ней рассматриваются также структурные вопросы химии пептидов и белков.

Для специалистов в области химии белка.