НЕЙРОХИМИЯ

т. 7, № 4, 1988

УДК 577.152.277:612.8.015

ADP-РИБОЗИЛИРОВАНИЕ В СИНАПТИЧЕСКИХ МЕМБРАНАХ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС

АРУТЮНЯН А. В., МОВСЕСЯН Н. О., БУРНАЗЯН Л. Б., ЕРАНЯН С. С., ГЕВОРКЯН Г. А.

Институт биохимии АН АрмССР, Ереван

Установлено, что интенсивность ADP-рибозилирования белков синаптических мембран (СМ) коры больших полушарий головного мозга крыс возрастает более чем в 15 раз при их хранении в течение 20 ч при комнатной температуре. Показано, что это не связано с включением свободной ADP-рибозы в белки СМ неферментативным путем вследствие усиления NAD-гликогидролазного расщепления NAD в этих условиях.

Ряд данных свидетельствует о наличии в СМ, наряду с моно-ADP-рибозилтрансферазой, поли-(ADP-рибоза)синтетазной активности. При исследовании моно-ADP-рибозилирования белков СМ было обнаружено, что цистеин и гистидин являются более эффективными ингибиторами этого процесса по сравнению с Nω-аргинином. Исходя из этого, можно допустить, что все эти аминокислоты могут выступать в качестве акцепторов [^{14}C]ADP-рибозы в белках СМ.

ADP-рибозилирование, являющееся одним из наиболее распространенных путей посттрансляционной модификации белков, широко представлено в животном организме [1, 2]. В последнее десятилетие появились работы, свидетельствующие о значимости этого процесса в НС [3—6]. По данным ряда авторов, ADP-рибозилированию подвергаются белки СМ головного мозга, при этом при участии специфической моно-ADP-рибозилтрансферазы осуществляется перенос единственного ADP-рибозного фрагмента NAD на гуанидиновые группы акцепторных структур СМ [4, 6]. Наряду с этим, по мнению Mandel, в синаптических митохондриях имеется также поли-(ADP-рибоза)синтетазная активность, обнаруженная ранее в ядрах клеток различных тканей [1, 2], в том числе и нервной [3]

Эти исследования побудили нас более детально изучить и охарактеризовать процесс ADP-рибозилирования в нервных окончаниях.

Материалы и методы

Синаптосомы коры больших полушарий мозга белых крыс выделяли методом Whittaker [7] в градиенте сахарозы 0,32:0,8:1 М. СМ изолировали после осмотического шока синаптосом при 0—4° [8]. Уровень ADP-рибозилирования определяли по включению ADP-рибозного остат-

ка NAD в белки СМ. Инкубационная смесь (0.35 мл) содержала 84 пмоль [аденозин-^{14}C]NAD («Amersham», Англия) с удельной радиоактивностью 287 мКи/ммоль, 50 мМ трис-HCl буфера pH 7.5, 0.5 мМ дитиотреитола и 150 мкг синаптосомного белка. Процесс ADP-рибозилирования исследовали в присутствии 10 мМ тимидина, 0.5 мМ никотинамидмононуклеотида (NMN), 10 мМ никотинамида (NAm), 20 мМ изониазида (INH), 5 мМ ATP, GTP и 20 мМ аминокислот или их производных (лизин, глутамат, цистеин, гистидин и метиловый эфир аргинина). Инкубацию проводили 2 ч при 26°, реакцию останавливали охлажденной 25%-ной ТХУ. Кислотонерастворимый осадок наносили на фильтры «Millipore» (США) с размером пор 0,6 мкм и последовательно промывали 10 мл 25-ной ТХУ и 15 мл этанола. Фильтры помещали в сцинтилляционные сосудики и растворяли в 0,45 мл диметилсульфоксида в течение 1 ч при 37°. Радиоактивность измеряли, используя сцинтиллятор Брея, в сцинтилляционном счетчике SL-4221 («Intertechnique», Франция).

Белок определяли по методу Lowry и соавт. [9], активность NAD-гликогидролазы спектрофотометрически при 327 нм по сбразованию NAD-CN комплекса [10].

Результаты исследования

В табл. 1 приведены данные о включении ADP-рибозного остатка [аденозин-^{14}C]NAD в белки СМ при использовании их различных препаратов. Этот процесс не протекает в интактных синаптосомах и наблюдается лишь при их разрушении и выделении СМ. Включение метки возрастает более чем в 15 раз при хранении СМ при комнатной температуре в течение 20 ч, причем независимо от присутствия ингибитора протеолиза 2 мМ фенилметилсульфонилфторида (PMSF). Это указывает на то, что повышение интенсивности ADP-рибозилирования не связано с протеолитическим распадом белков СМ при их хранении. Уровень ADP-рибозилирования заметно снижается при наличии в среде тимидина, ингибирующего активность поли- (ADP-рибоза) синтетазы в ядерной фракции мозга [3] и других органов [1, 11]. При этом отмечается примерно такое же соотношение между включением метки в белки интактных и хранившихся СМ как в опытах без добавления тимидина.

Как видно из данных, приведенных на рис. 1, *а*, *б*, оптимальным условием для ADP-рибозилирования СМ мозга оказалась 2-часовая инкубация в диапазоне pH 7,0—8,0, что особенно четко проявлялось при инкубации в отсутствие тимидина. Исходя из этого, последующие эксперименты проводили при 2-часовой инкубации при pH 7.5 СМ, предварительно выдержанных 20 ч при комнатной температуре.

Как показали наши исследования, в указанной фракции СМ обнаруживается значительная активность NAD-гликогидролазы (распад NAD под влиянием этого фермента составляет 19,4 нмоль/мг белка вместо 7,02 в СМ, хранившихся при 0°), вследствие чего нельзя исключить, что при инкубации СМ с меченым NAD сбразуется ADP-рибоза, которая в после-

дующем может неферментативным путем конъюгировать с белками СМ, как это описано в отношении митохондрий печени и сердечной мышцы [12]. С целью проверки этого предположения было исследовано ADP-рибозилирование СМ в присутствии ингибиторов NAD-гликогидролазы INH [13], NAm, ATP [14, 15] и GTP [15], а также NMN [16]. Полученные резуль-

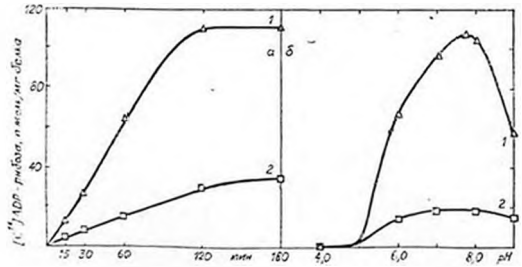

Рис. 1. Зависимость ADP-рибозилирования синаптических мембран коры больших полушарий мозга от времени инкубации при pH 7,5 *(а)* и величины pH при 2-часовой инкубации *(б)*. *1*—в отсутствие тимидина; *2*—в присутствии тимидина

Таблица 1

ADP-рибозилирование синаптических мембран мозга при различных условиях их хранения (в пмоль [^{14}C]ADP-рибозы/мг белка), n=6

Методы хранения	Условия эксперимента	
	без тимидина	с тимидином
Синаптосомы	0	0
Синаптические мембраны, хранившиеся при 0	7,48	1,78
Синаптические мембраны, хранившиеся 20 ч при 25	112,74	32,10
Синаптические мембраны, хранившиеся с PMSF 20 ч при 25	105,60	31,75

таты указывают на то, что, независимо от наличия тимидина в среде инкубации, NAm и INH ингибируют процесс ADP-рибозилирования в среднем на 40—50%, ATP и GTP полностью подавляют включение меченой ADP-рибозы из [^{14}C]NAD в белки СМ, а NMN оказывает незначительное влияние на этот процесс (рис. 2).

В следующей серии экспериментов исследовалось влияние некоторых аминокислот, служащих акцепторами ADP-рибозы при модификации белков путем ADP-рибозилирования, на этот процесс в СМ при их кратковременной или продолжительной инкубации с тимидином и без него. Как видно из данных, приведенных в табл. 2, наиболее эффективными ингиби-

торами ADP-рибозилирования в отсутствие тимидина являлись цистеин и гистидин, затем аргинин и глутамат. При наличии тимидина в среде инкубации ингибирующее действие цистеина было еще более заметно и значительно превосходило эффект гистидина. Наряду с этим, ингибирование под влиянием аргинина было более выражено при непродолжительной инкубации СМ с меченым NAD, а глутамат был вовсе не эффективен. Ли-

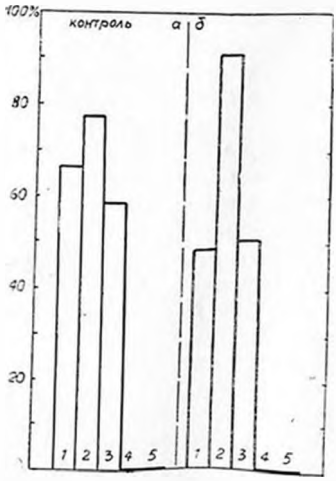

Рис. 2. Ингибирование ADP-рибозилирования синаптических мембран коры больших полушарий мозга под влиянием ингибиторов NAD-гликогидролазы (в %). *1*—NAm, *2*—NMN, *3*—INH, *4*—ATP, *5*—GTP. *а*—в присутствии тимидина, *б*—в отсутствии тимидина

зин не оказывал действия на ADP-рибозилирование белков СМ, независимо от наличия тимидина в среде инкубации.

Таблица 2

Ингибирование ADP-рибозилирования белков синаптических мембран (в %) под влиянием аминокислот (n=6)

Аминокислоты (10 мм) / Время инкубации (мин)	Условия опыта			
	без тимидина		с тимидином	
	30	120	30	120
Met-аргинин	49	40	33	15
Гистидин	71	53	57	56
Цистеин	72	77	83	97
Лизин	0	0	0	0
Глутамат	20	41	0	0

Обсуждение результатов

Lester и соавт. в экспериментах, проведенных на лизированных синаптосомах электрического органа *Torpedo*, впервые описали ADP-рибозилирование мембранных синаптосомных белков [4]. Впоследствии ис-

следованиями Фоменко и соавт. [6] было установлено, что аналогичный процесс осуществляется в СМ головного мозга крыс. Было показано, что уровень включения меченой ADP-рибозы в СМ был при этом невысок и составлял не более 2% от используемой метки, и весь процесс практически завершался в течение 40 мин инкубации [6]. Авторы склонны объяснять это недостаточной доступностью мембранных акцепторов ADP-рибозы и наличием в экстрактах СМ ингибитора процесса ADP-рибозилирования, по аналогии с результатами, полученными на мембранах щитовидной железы [17].

В наших опытах с СМ, выдержанными в течение 20 ч при комнатной температуре, наблюдался значительно более высокий уровень ADP-рибозилирования: процесс завершался лишь через 120 мин инкубации и при этом расходовалось около 12% от используемого [^{14}C]NAD. Предварительные данные, полученные нами с применением радиоавтографии, свидетельствуют о том, что степень включения меченой ADP-рибозы в белки СМ увеличивается при их хранении. Это может быть связано с тем, что вызванная хранением при комнатной температуре деструкция СМ приводит к высвобождению из них акцепторных белков, а также соответствующих мембраносвязанных ADP-рибозилтрансфераз. Нельзя также исключить наличие в интактных СМ ингибитора ADP-рибозилирования [6, 17], подвергающегося инактивации в процессе их хранения при комнатной температуре.

Значительный интерес представляют данные, полученные нами в отношении действия тимидина на процесс ADP-рибозилирования СМ головного мозга крыс. Следует указать, что поли-(ADP-рибоза)синтетазная активность связана исключительно с фракцией ядер в головном мозгу [3] и других органах [1, 11]. Поэтому многие исследователи при изучении ADP-рибозилирования в других субклеточных фракциях обычно не принимают во внимание активность этого фермента. Тем не менее, полученные нами данные об ингибировании ADP-рибозилирования тимидином указывают на возможность наличия поли-(ADP-рибоза)синтетазы в синаптосомной фракции мозга крыс. Это предположение подтверждается тем, что в отсутствие тимидина процесс ADP-рибозилирования несколько ингибируется глутаматом, являющимся, наряду с лизином, акцептирующей аминокислотой при образовании O-гликозидных конъюгатов с поли-(ADP- рибозой) [1]. Однако для окончательного суждения необходимы дополнительные исследования, поскольку, исходя из полученных данных, нельзя полностью исключить ингибирующее влияние тимидина на процессы моно-ADP-рибозилирования, так как ингибиторы поли-(ADP-рибоза)синтетазы, к которым, наряду с тимидином, относятся также бензамид, 3′-аминобензамид и NAm, не являются строго специфическими [2].

Интенсивность ADP-рибозилирования в различных органах тесно связана с уровнем внутриклеточного NAD [15, 18], поэтому мы использовали ряд ингибиторов NAD-гликогидролазы, для того чтобы предотвратить его распад в СМ. Вопреки нашим ожиданиям, почти все исполь-

зуемые соединения одновременно с подавлением активности NAD-гликогидролазы (неопубликованные данные) ингибировали включение меченой ADP-рибозы в белки СМ (рис. 2). Исходя из полученных данных, можно было предположить, что в СМ функционирует система неферментативного ADP-рибозилирования, обнаруженная ранее в митохондриях печени и сердечной мышцы [12]. Образующаяся в данном случае под влиянием NAD-гликогидролазы ADP-рибоза переносится неферментативным путем на акцепторные белки с образованием устойчивых к NH_2OH конъюгатов [12, 19], причем этот процесс, в отличие от ферментативного ADP-рибозилирования, имеет два выраженных оптимума pH при 4,0 и 9,0 [12]. Как показали наши исследования, в СМ ADP-рибозилирование не осуществляется при pH 4,0, имеет максимум при pH 7,5 (рис. 1, *б*) и является крайне нестабильным по отношению к NH_2OH. Кроме того, уровень ADP-рибозилирования почти не претерпевает изменений в присутствии NMN, который в применяемой нами концентрации ($5 \cdot 10^{-4}$ M) полностью предотвращает, согласно данным Snell и соавт., синаптосомный распад NAD [16]. Все эти доводы свидетельствуют о ферментативном характере исследуемого нами процесса ADP-рибозилирования.

Полученные результаты позволяют полагать, что исследуемые нами ингибиторы NAD-гликогидролазы, за исключением NMN, подавляют также процесс ADP-рибозилирования в СМ, что ранее было доказано в отношении NAm, являющегося универсальным ингибитором ADP-рибозилтрансфераз различного происхождения [1, 2]. Особый интерес представляют в этом аспекте ингибирование ADP-рибозилирования под влиянием ATP и GTP, описанное ранее в исследованиях, проведенных на мембранах щитовидной железы [17]. По данным Honma и Mande! [15], ATP и GTP являются достаточно эффективными ингибиторами NAD-гликогидролазы в плазматических мембранах нейронов и глиоцитов [15], однако в отличие от всех остальных ингибиторов этого фермента, указанные нуклеозидтрифосфаты вызывают полное подавление процесса ADP-рибозилирования в СМ (рис. 2). Аналогичные результаты были получены также другими исследователями в отношении ATP [6], которые склонны были объяснять это явление присутствием в СМ ATP-активируемого фермента, ответственного за удаление ADP-рибозы из рибозилированных белков, а также снижением степени их ADP-рибозилирования за счет усиления фосфорилирования под влиянием мембраносвязанных протеинкиназ.

По мнению Халмурадова и соавт. [6], ADP-рибозилирование СМ осуществляется моно-ADP-рибозилтрансферазой, строго специфичной по отношению к гуанидиновым группам остатков аргинина. Это подтверждается исследованиями Lester и соавт. относительно ADP-рибозилирования синаптосомных белков в присутствии холерного токсина, обладающего активностью аргининспецифичной ADP-рибозилтрансферазы [4]. В наших экспериментах, в отличие от данных, полученных Халмурадовым и соавт. [6], происходило лишь частичное ингибирование процесса ADP-рибозилирования под влиянием Mel-аргинина (табл. 2), что указывает на суще-

ствование других, кроме аргинина, акцепторных аминокислот в белках СМ. В этой связи интересно отметить, что при исследовании эндогенного ADP-рибозилирования и ADP-рибозилирования, индуцируемого холерным токсином, в лизированных синаптосомах электрического органа Torpedo обнаруживается различный набор акцепторных белков [4], что свидетельствует о возможности существования, помимо аргинина, других аминокислотных остатков, к которым присоединяется ADP-рибозный фрагмент NAD. Полученные нами данные об ингибировании процесса ADP-рибозилирования в СМ под влиянием гистидина и цистеина (табл. 2) подтверждают правомочность этого предположения. Наряду с широко распространенной моно-ADP-рибозилтрансферазой, катализирующей модификацию остатков аргинина в белках [20—22], в животном организме обнаружен фермент, осуществляющий моно-ADP-рибозилирование модифицированного гистидина, так называемого дифтамида, фактора элонгации EF-2 [23, 24]. Установлено также, что коклюшный токсин катализирует реакцию ADP-рибозилирования за счет образования N-гликозидной связи между ADP-рибозой и остатками цистеина в трансдуцине, выделенном из наружных сегментов сетчатки быка [25]. На основании полученных нами результатов нельзя исключить, что в мозгу крыс также имеется активность ADP-рибозилтрансфераз, специфичных к гистидину и цистеину.

Резюмируя вышеизложенное, можно заключить, что ADP-рибозилирование в СМ является сложным многообразным процессом, в который, возможно, вовлекаются различные аминокислоты в акцепторных белках. Можно представить, что модификация определенных аминокислот, вызывая конформационные сдвиги в белке, отражается на способности других аминокислотных остатков акцептировать ADP-рибозу. Этим может быть обусловлено почти полное ингибирование процесса ADP-рибозилирования в СМ под влиянием цистеина. Снижение степени ингибирования включения меченой ADP-рибозы в белки СМ, наблюдаемое в отдельных случаях при их длительной инкубации с Met-аргинином (в присутствии тимидина) или гистидином (в отсутствие тимидина), вероятно, связано с тем, что при этом ADP-рибозилированию подвергается большее количество аминокислотных остатков. Наряду с этим, данные противоположного характера, проявляющиеся в экспериментах с цистеином в присутствии тимидина или глутаматом, добавленным без тимидина, указывают на то, что в условиях продолжительной инкубации конъюгаты этих аминокислот могут деградировать под влиянием ADP-рибозил-белок-лиазы.

ADP-рибозилирование, как уже отмечалось, протекает лишь при нарушении целостности синаптосом, поэтому вопрос о физиологической значимости этого процесса в нервных окончаниях приобретает ограниченный характер.

ADP-RIBOSYLATION IN SYNAPTIC MEMBRANES OF RAT BRAIN

A. V. HAROUTUNIAN, N. O. MOVSESYAN, L. B. BURNASYAN, S. S. ERANYAN, and G. A. GEVORKYAN

Instituse of Biochemistry, Academy of Sciences of Armenian SSR, Yerevan

The rate of ADP-ribosylation of proteins of synaptic membranes (SM) from rat cerebral cortex increases more than 15-fold when SM are stored for 20 hours at room temperature. The effect is not associated with any non-enzymatic incorporation of free ADP-ribose (that may be generated by NAD cleavage) in SM proteins. There is some evidence that SM contain alonside with mono-ADP-ribosyltransferase also poly(ADP-ribose) synthetase activity. In studies of monoADP-ribosylation of SM proteins we found that cysteine and histidine were more effective inhibitors of this process as compared with methyl-arginine. Correspondingly, we propose that all these amino acids may act as acceptors of [^{14}C]ADP-ribose in SM proteins.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Ueda K., Hayashi O.*—In: ADP-ribosylation reactions. Biology and Medicine (eds. O. Hayashi, K. Ueda). p. 551—572, Acad. Press, L—N. Y., 1982.
2. *Gaal J. C., Pearson C. K.* TIBS, v. 11, p. 171—175, 1986.
3. *Заалишвили Т. М., Маршани Д. О., Тамразян А. С.* Сообщ. АН ГССР, т. 101, № 3, с. 685—688, 1981.
4. *Lester H., Steer M. L., Michaelson D. M.* J. Neurochem., v. 38, № 4, p. 1080—1086, 1982.
5. *Mandel P.*—In: ADP-ribosylation of proteins (eds. F. R. Althaus, H. Hilz S. Shall), p. 2—9. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, N. Y.—Tokyo, 1985.
6. *Фоменко А. Н., Халмурадов А. Г., Степаненко С. П., Пожарун С. В.* Биол. мембраны, т. 3, № 2, с. 124—130, 1986.
7. *Whittaker V. P.* Biochem. J., v. 106, p. 412—417, 1968.
8. *Abita J. P., Chicheportiche R., Schweitz H., Lazdunski M.* Biochemistry, v. 16, № 9, p. 1838—1864, 1977.
9. *Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr R. L., Randall R. J.* J. Biol. Chem., v. 193, p. 265—275, 1951.
10. *Shuber F., Travo P.* Eur. J. Biochem., v. 65, p. 247—255, 1976.
11. *Gill J. C., Meren R.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, v. 75, p. 3050—3054, 1978.
12. *Hilz H., Koch R., Fantck W., Klapproth K., Adametz P.* Proc. Nat. Acad. Sci., USA, v. 81, p. 3929—3933, 1984.
13. *Roemer V., Lambrecht J., Kittler M., Hilz H., Hoppe-Seiler's Z.* Physiol. Chem., v. 349, p. 109—112, 1968.
14. *Richter C., Winterhalter K. H., Baumhuter S., Lotscher H. R., Moser B.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, v. 80, p. 3188—3192, 1983.
15. *Honma H., Mandel P.* J. Neurochem., v. 47, № 3, p. 972—975, 1986.
16. *Snell C. R., Snell P. H., Richards C. D.* J. Neurochem., v. 43, № 6, p. 1610—1615, 1984.
17. *De Wolf M. J. S., Vitty P., Ambesi-Impiombato F. S., Kohn L. D.* J. Biol. Chem., v. 256, № 23, p. 12287—12296, 1981.
18. *Мулянко Н. А., Халмурадов А. Г.* Биохимия, т. 49, вып. 10, с. 1623—1627, 1984.

19. *Lidner C., Hilz H.* Biochem. J., v. 206, № 1, p. 61–65, 1982.
20. *West R. E., Moss J.* Biochemistry, v. 25, № 24, p. 8057–8062, 1986.
21. *Tanigawa Y., Tsuchiya M., Imai Y., Shimoyama M.* J. Biol. Chem., v. 259, № 3, p. 2022–2029, 1984.
22. *Soman G., Mickelson J. R., Louis C. F., Grewes D. J.* Biochem. Biophys. Res. Commun., v. 120, p. 973–980, 1984.
23. *Lee H., Iglewski W. J.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, v. 81, p. 2703–2707, 1984.
24. *Iglewski W. J., Lee H., Muller P.* FEBS Lett., v. 173, № 1, p. 113–118, 1984.
25. *West R. E., Moss J., Vaughan M., Liu T., Liu T.-Y.* J. Biol. Chem., v. 260, № 27, p. 14428–14430, 1985.

Поступила 3 VI 1988

Серотонинергическая система, питание и регуляция веса тела. Под ред. S. Nicolaïdis, Изд. Academic Press, Лондон, Англия, 1987 г., 178с.

Serotonergic System, Feeding and Body Weight Regulation. Ed. by S. Nicolaïdis, Academic Press, London, England, 1987, 178p.

В сборник включен ряд статей относительно серотонинергической системы, в том числе: «Нейрохимический механизм действия лекарств, модифицирующих питание через серотонинергическую систему», «Изменения в уровне серотонина и структура поведения человека», «Гастромоторные механизмы фенфлюраминовой анорексии», «Серотонинергические механизмы питания человека—фармакологические доказательства». В представленных статьях уделено внимание периферическим и центральным механизмам действия серотонинергических препаратов, регулирующих аппетит, эффекту дексфенфлюрамина на вес тела животных, механизму аноректического и лептогенного эффектов фенфлюрамина, являющегося агонистом серотонина. Предназначен для нейрохимиков, диетологов, специалистов по поведенческим реакциям.