

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ГАНГЛИОЗИДОВ С ФЕРМЕНТАМИ ГОЛОВНОГО МОЗГА НА ПРИМЕРЕ ЦИТОЗОЛЬНОЙ СИАЛИДАЗЫ

ТЕТТАМАНГИ Г., ФИОРИЛЛИ А., ВЕНЕРАНДО Б.

Кафедра медицинской химии и биохимии медицинского факультета
Миланского университета, Италия

Показано, что цитозольная сиалидаза головного мозга свиньи взаимодействует с мицеллярными ганглиозидами (например, с GTIb) с образованием до двух стабильных белок-ганглиозидных комплексов с разной величиной M_r . Низкомолекулярный комплекс является комбинацией одной ганглиозидной мицеллы с двумя молекулами ферментного белка. Комплекс с большой молекулярной массой, по-видимому, представляет собой димер. Связанный в комплексе фермент каталитически неактивен. Обработка низкомолекулярного комплекса такими детергентами, как тритон X-100 и лизолецитин вызывает существенные модификации структуры комплекса с высвобождением части фермента в активной форме и с реорганизацией оставшегося комплекса, приобретающего некоторую ферментативную активность. Способность к образованию комплексов с ферментом с его последующей инактивацией проявляют только гомогенные мицеллы ганглиозида; в случае смешанных мицелл (третон X-100-ганглиозид с высоким содержанием детергента) комплексы с ферментом не образуются, а мицеллы ведут себя как хорошие ферментные субстраты. Обратимая инактивация белков при взаимодействии с мицеллами ганглиозидов рассматривается как возможный модуляторный механизм, способствующий образованию и распаду ганглиозидных кластеров в плазматических мембранах.

Ганглиозиды, содержащие остатки сиаловой кислоты (гликосфинголипиды), обладая сильно выраженными амфифильными свойствами, ассоциируются в водных растворах с образованием мицелл с большой величиной M_r [1]. Они являются нормальной составной частью плазматической мембраны клеток позвоночных и располагаются асимметрично в ее наружном слое, образуя в нем различные специфические рецепторные участки. Было показано [2, 3], что как в искусственных, так и в естественных мембранах ганглиозиды отделяются по латеральной фазе с образованием скоплений, внутри которых межмолекулярная организация ганглиозидов подобна внутримицеллярной.

Концентрация ганглиозидов—один из факторов, способствующий образованию кластеров, поэтому в мембранах клеток нервной ткани, в которых содержание ганглиозидов весьма велико [1], можно предвидеть не только само образование богатых ганглиозидами микродоменов, но и их потенциальную функциональную значимость. В самом деле, если образование кластеров имеет место вблизи активных белков (ферментов, рецепторов, носителей, каналов), то ганглиозиды могут вызывать конформационные функциональные изменения в этих белках. Это может служить частью молекулярной основы постулируемой «трансдукторной» роли ганглиозидов [4]. Для подтверждения этой гипотезы необходимо прямое изучение взаимодействий ганглиозидов с белками в мембранах, что в настоящее время является трудной задачей. Поэтому простые модели

взаимодействий белков с мицеллярными ганглиозидами представляются исключительно полезными.

В данной работе представлены результаты исследований взаимодействий между растворимой цитозольной синапсидазой головного мозга свиньи и мицеллами ганглиозида GT1b, являющегося потенциальным субстратом синапсидазы. Получены доказательства образования комплекса фермента с мицеллами GT1b, в котором фермент неактивен, но из которого он может быть переведен в полностью активную форму.

Материалы и методы

В работе использовали следующие реактивы: N-ацетилсераминовая кислота (NeuAc), кристаллический бычий сывороточный альбумин, холат и ДОХ-Na, тауро-холесевая кислота, (3-коламино-пропандиметилламино) 1-пропансульфонат (КПДМАПС), октил- β -глюкопиранозид („Sigma“, США); 4-метилумбеллиферил- α -D-N-ацетилсераминовая кислота (MU-NeuAc) и метилумбеллиферон (МУ) фирмы „Koch Light“, Англия; ультрагель AcA-34 („LKB“, Швеция); тритон X-100 („Rohm. Haas“, США); сульфобетани („Serva“, ФРГ); аннелецитин (DL- γ -пальмитоил- α -аннелецитин) фирмы „Fluka“, Швейцария. Головной мозг свиней получали на бойню сразу после забоя животных и обрабатывали, как указано ранее [5].

Получение ганглиозидов. Ганглиозиды GT1a, GD1a, GD1b, GM1 (согласно классификации Svennerholm [6]) были получены по методу Venerando и соавт. [7] со степенью чистоты более 90%. Средняя величина M_r мицелл GT1b, определенная по методу Corti и соавт. [8], составляла 350 ± 35 кД. Ганглиозид GD1a, меченный 3H , получали по методу Ghidoni и соавт. [9]; радиохимическая чистота—более 99%, удельная радиоактивность—0,96 Ки/ммоль.

Получение и определение активности цитозольной синапсидазы из головного мозга (изофермент А). Фермент экстрагировали и выделяли из головного мозга свиньи по методу Venerando и соавт. [5, 7] с очисткой в 2000 раз. Очищенный фермент элюировался с колонки с ультрагелем AcA-34 одним пиком с величиной M_r 420 кД. Его активность определяли колориметрически, используя в качестве субстрата GT1b (по измерению высвобождающейся NeuAc) или флуориметрически с использованием MU-NeuAc (по высвобождению МУ) по методу, описанному Venerando и соавт. [7], при оптимальных условиях реакции, предложенных теми же авторами. Активность выражали в международных единицах—в микромолях высвобождающегося МУ или NeuAc в мин при 37°.

Образование и разделение комплексов синапсидазы с мицеллярным GT1b проводили согласно описанной процедуре [7]; комплексы получали инкубацией 0,80 мкг/мл препарата фермента с 0,5 мМ GT1b в течение 30 мин при 37° [7].

Другие аналитические методы. Количество NeuAc, связанной с ганглиозидами, определяли по методу Svennerholm [10], используя в качестве стандарта чистую NeuAc; содержание белка определяли по методу Lowry и соавт. [11], используя в качестве стандарта бычий сывороточный альбумин. Величины M_r определяли как описано ранее, используя набор маркерных белков [7]; измерения радиоактивности проводили с помощью жидкостного сцинтилляционного счетчика [7].

Результаты и обсуждение

Ранее нами было показано [7], что цитозольная синапсидаза головного мозга свиньи способна высвобождать синаповую кислоту из низкомолекулярных синаподериватов (в том числе из MU-NeuAc); при этом кривая зависимости скорости реакции от концентрации субстрата представляла

классическую гиперболу. Фермент атаковал также такие ганглиозиды, как GT1b, GD1b и GD1a, однако зависимость скорости реакции от величины концентрации субстрата и ферментного белка в этом случае имела двуфазную и сигмоидную форму (рис. 1). В частности, при определенном соотношении фермент/ганглиозид ферментативная активность практически была равна нулю. Необходимо учесть, что при использованных условиях определения ганглиозиды находили в виде мицелл. Причиной таких кинетических аномалий может быть образование одного или двух комплексов

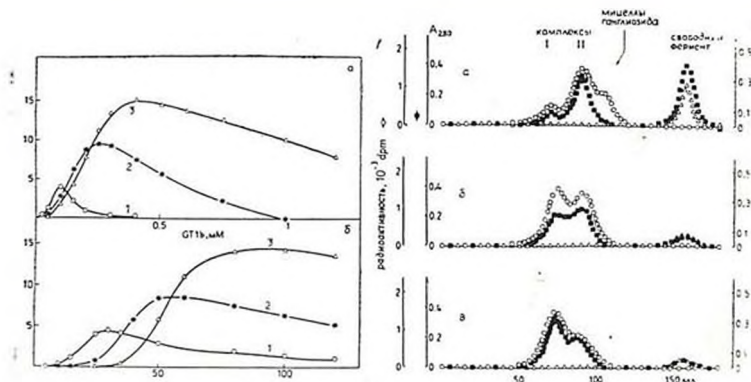


Рис. 1. Кажущаяся кинетика взаимодействия цитозольной сиалидазы головного мозга синьки с ганглиозидом GT1b в мицеллярной форме. Изучали зависимость скорости реакции (V) от концентрации субстрата при различной концентрации фермента; зависимость скорости реакции (V) от концентрации фермента изучали при различной концентрации ганглиозидов.

Рис. 2. Образование комплексов сиалидаза-GT1b в условиях, применяемых при определениях активности фермента. Эффект хранения при 37° на образование комплексов I и II (А—15 мин; В—45 мин; С—90 мин). Хроматографию на колесике с ультрагелем АсА-34 проводили, как описано в разделе «Материалы и методы»; фермент—0,25 мг/мл; GT1b (с добавлением $0,15 K_2 H_2 P O_4$ 3H-GD1a)—0,1 мМ. За элюцией ганглиозидов следили, измеряя радиоактивность; за элюцией белка—по прохождению УФ-поглощения при 280 нм. Активность сиалидазы определяли флуориметрически

фермент-ганглиозид (рис. 2) [7]. Выделение и частичная характеристика таких комплексов показали [7], что они не обладали сиалидазной активностью в отношении использованных субстратов. Были подобраны условия, при которых после взаимодействия с GT1b не оставалось свободного белка ферментного препарата и, следовательно, в образовании комплексов с ганглиозидом участвовал весь белок. Таким образом, в образовании таких комплексов включается сам ферментный белок независимо от степени гомогенности препаратов фермента. Так как были использованы водные растворы GT1b с его концентрацией всегда выше 10^{-3} М, этот ганглиозид находился в них и взаимодействовал с ферментом в виде ми-

целл. С другой стороны, подобные комплексы не образовывались с углеводной, олигосахаридной частью GT1b, которая не образует мицеллы и не ингибирует фермент. Более того, цитозольная сналидаза образовывала комплексы (и инактивировалась) не только с ганглиозидами GD1a и GD1b, являющимися ее потенциальными субстратами, но также и с GM1, не гидролизующимся ферментом. Таким образом, комплексы представляют собой сочетание фермента с мицеллами ганглиозида, что ведет к полной инактивации фермента.

Величина M_r комплекса II, меньшего из двух комплексов сналидаза-GT1b, составляла около 420 кД, а комплекса I—порядка 1000 кД. Соотношение ганглиозид/белок (по массе) составляло 4:1 и 3,6:1 для комплексов II и I соответственно. Полученные данные подтверждают гипотезу о том, что комплекс II образуется при ассоциации одной мицеллы ганглиозида с двумя молекулами ферментного белка, а в комплексе I—при ассоциации двух комплексов II (по аналогии с комплексами, которые образует с ганглиозидом GM1 бычий сывороточный альбумин) [12]. Эти комплексы легко атакуются свободной цитозольной сналидазой с освобождением NeuAc, что указывает на то, что олигосахаридная часть GT1b вполне доступна и расположена на поверхности комплекса. Длительное хранение препаратов комплексов или их обработка мицеллами ганглиозидов не приводило к отделению или к замене стартовых компонентов. Поэтому такие комплексы можно рассматривать как стабильные смешанные ганглиозид-белковые мицеллы, в которых белковая часть по большей части расположена во внутреннем гидрофобном ядре, а каталитический участок или стерически экранирован, или не выходит на поверхность.

Были сделаны попытки вызвать диссоциацию комплекса сналидаза-GT1b с помощью детергентов для восстановления фермента в активной форме. Предварительные исследования показали, что из различных использованных детергентов (тритон X-100, лизолецитин, КПДМАПС, октил- β -пиранозид, холат и ДОХ-Na, таурохолевая кислота, сульфобетанин) только тритон X-100 и лизолецитин полностью восстанавливали активность цитозольной сналидазы и не влияли на нее независимо от их концентрации. Поэтому эти детергенты и использовали в дальнейших опытах.

Фермент преникубировали с GT1b в условиях, ведущих к образованию комплекса II, до полной инактивации (рис. 3). Добавление возрастающих концентраций тритона X-100 или лизолецитина в возрастающей концентрации (до 20 мМ $\approx$ 1,5%) при 2-часовой инкубации приводило к восстановлению активности фермента приблизительно на 50%, свидетельствуя об обратимом характере инактивации фермента при образовании комплекса. На основании этих данных был получен и выделен комплекс II с последующей инкубацией его с 1,5%-ным тритоном X-100 (37°, 2 ч). Как видно из рис. 4, при последующей хроматографии на колонке с ультрагелем AcA-34 белок комплекса элюировался двумя пиками, один из которых представлял свободный белок, а другой—комплекс белка с ганглиозидом; эти пики содержали соответственно 35 и 65% белка. От общего

количества белка весь ганглиозид комплекса элюировался в пике, содержащем комплекс белков без следов мицеллярного GT1b. Пик, содержащий свободный белок, по свойствам соответствовал свободной цитозольной сиапидазе, активность его составляла 45% от исходной. Пик, содержащий белок и ганглиозид, также проявлял хотя и малую, но измеримую ферментативную активность (около 5% от исходной). Все это означает, что обработка детергентом сильно действовала на комплекс II с высвобождением части захваченного фермента и образованием из ос-

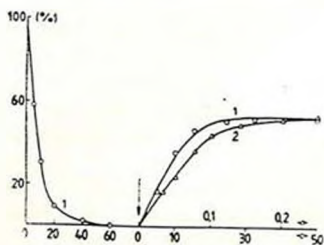


Рис. 3

Рис. 3. Обработка каталитически неактивного комплекса сиапидазы-GT1b тритоном X-100 и лизолецитином: восстановление активной формы фермента как функция концентрации детергента. Активность сиапидазы определяли флуориметрически и выражали в % от исходной (примененной для формирования комплекса)

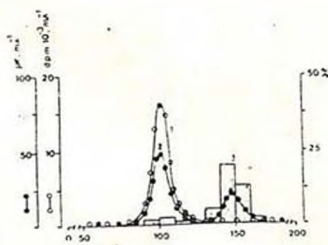


Рис. 4

Рис. 4. Эффект тритона X-100 на комплексе сиапидазы-GT1b II: получение высвобожденного и активного фермента с помощью хроматографии на колонке с ультрагелем AcA-34. Активность сиапидазы определяли флуориметрически и выражали в % от исходной активности, использованной для образования комплекса II. За элюцией ганглиозидов и белка следили, как описано в подписи к рис. 2

тавшегося белка и ганглиозидов нового комплекса, в котором активный участок фермента, по крайней мере частично, оказывался на поверхности и поэтому становился способным связывать субстрат.

Для выявления механизма образования комплексов сиапидазы-GT1b и их перестройки под влиянием детергентов, цитозольную сиапидазу преинкубировали (1 ч, 37°) со смесью GT1b и тритона X-100 в различных молярных соотношениях (смешанные мицеллы ганглиозид-детергент) и затем определяли количество МУ-NeuAc и GT1b. Как видно из рис. 5, активность фермента оказалась зависимой от состава смешанных мицелл: она не была обнаружена в случае мицелл с препапированием ганглиозидов (соотношение 0,2—0,3); мицеллы же, богатые детергентом (соотношение выше 15) проявляли полную активность. Это свидетельствует о том, что способность образовывать неактивные комплексы свойственна мицеллам ганглиозидов. Если в мицеллах, содержащих много детергента, присутствует также ганглиозид, то последний ведет себя уже не как

ингибитор, а как прекрасный субстрат для фермента. Можно предположить [13], что размер смешанных детергент-ганглиозидных мицелл уменьшается с увеличением доли детергента в них, что затрудняет связывание ими фермента с образованием комплексов. С другой стороны, в смешанных мицеллах (ганглиозид-детергент) с высоким содержанием детергента молекулы ганглиозида располагаются менее компактно, что создает более благоприятные условия для функционирования их в ка-

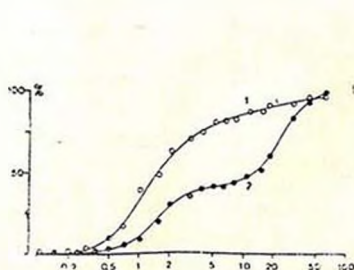


Рис. 5.

Рис. 5. Эффект 1-часовой преинкубации при 37° со смешанными тритон X-100-GT1b мицеллами (при различных молярных соотношениях) на активность цитозольной сиалидазы. Активность фермента определяли флуориметрически и колориметрически при постоянной концентрации GT1b



Рис. 6

Рис. 6. Кинетика действия цитозольной сиалидазы на гомогенные мицеллы GT1b и смешанные мицеллы тритон X-100-GT1b с различным молярным соотношением. Высвобождение NeuAc регистрировали колориметрически

честве субстрата для фермента, как это было показано на примере сиалидазы холерного вибриона [14].

На рис. 6 представлены кривые скорость/субстрат активности цитозольной сиалидазы мозга на гомогенных мицеллах GT1b и на мицеллах комплекса тритона X-100-GT1b при высоком молярном отношении. В случае мицелл, богатых детергентом (соотношение—15) взаимодействие подчинялось кинетике Михаэлиса-Ментен (классическая гипербола) в противоположность бифазной сигмоидной кривой, полученной в случае гомогенных мицелл GT1b. Более того, кажущиеся значения V_{max} в случае мицелл, богатых тритоном X-100, были значительно выше, чем в случае гомогенных мицелл GT1b. Эти данные в добавление к наблюдению [7], что связанный в комплексе GT1b может служить в качестве субстрата для свободной цитозольной сиалидазы, объясняют аномальности кинетики действия этого фермента на мицеллярный GT1b. В самом деле, при инкубации фермент образовывал комплексы GT1b-неактивные формы фермента. В то же время оставшийся несвязанным фермент мог отщеплять NeuAc из образовавшегося комплекса GT1b-фермент. Поэтому высвобождение NeuAc не зависело ни от количества фермента, ни от исходной концентрации ганглиозида, а только от количества «свобод-

ного» фермента и образовавшегося комплекса GT1b-фермент. В случае смешанных мицелл с преобладающим содержанием детергента выявляется лишь взаимодействие с активным участком фермента, и образование фермент-субстратного комплекса протекает по классической кинетике Михаэлиса-Ментен. Таким образом, проведенные исследования иллюстрируют новый аспект связывающих свойств ганглиозидов—инактивирование фермента (цитозольной салидазы мозга) после связывания ганглиозидных мицелл. Диссоциация или перестройка таких мицелл приводит к полному восстановлению активности фермента. Важность этого феномена для оценки вклада ганглиозидов в функции плазматических мембран становится очевидной при рассмотрении образования ганглиозидных кластеров в мембране как обратимого и регулируемого явления. Условия, способствующие образованию кластера, могут вызывать сопутствующий захват белка в мицеллоподобном микродомене кластера, и наоборот, при диссоциации кластера «демаскируется» захваченный белок. Захват и высвобождение белка в богатом ганглиозидами окружении может приводить к обратимым изменениям в конформации белка, что, по-видимому, служит потенциальным обратимым механизмом активации-инактивации белка. Исследования в этом направлении уже ведутся.

ENZYME—GANGLIOSIDE INTERACTIONS IN THE BRAIN: THE EXAMPLE OF CYTOSOLIC SIALIDASE

TETTAMANTI G., FIORILLI A., VENERANDO B.

Department of Medical Chemistry and Biochemistry, The Medical School,
University of Milan, Milan, Italy

Cytosolic sialidase from pig brain interacts with micellar gangliosides (for instance GT1b) giving rise to two stable protein-ganglioside complexes of different molecular weight. The complex of lower molecular weight is a combination of one ganglioside micelle and two enzyme molecules; the complex of higher molecular weight is likely a dimer of the former complex. The complexlinked enzyme is catalytically inactive. Treatment of the low molecular weight complex with detergents, like Triton X-100 and lysolecithin causes dramatic modifications of the complex structure, resulting in liberation of part of the enzyme in a fully active form, and in rearrangement of the remainder complex, which acquires some enzymatic activity. The ability to form complexes with resulting enzyme inactivation is possessed by homogeneous micelles of ganglioside; mixed Triton X-100—ganglioside micelles, with a high detergent content, do not form complexes with the enzyme and behave as excellent substrates for the enzyme. Reversible inactivation of protein by interaction with ganglioside micelles is discussed as a potential modulatory mechanism of membrane-bound active proteins concomitantly to the formation or dissolution of ganglioside clusters at the plasma membrane level.

1. *Wiegandt H.* — In: *New Comprehensive Biochemistry* (eds. A. Neuburger, L. L. M. Van Deenen), v. 10, p. 199—260, Elsevier, Amsterdam, 1985.
2. *Sharom F. J., Grant C. W. M.* *Biochim. et. biophys. acta*, v. 507, p. 280—293, 1978.
3. *Masserini M., Freire E.* *Biochemistry*, v. 25, p. 1043—1049, 1986.
4. *Brady R. O., Fishman P. H.* *Adv. Enzymol.*, v. 50, p. 303—323, 1979.
5. *Venerando B., Tettamanti G., Cestaro B., Zambotti V.* *Biochim. et biophys. acta*, v. 493, p. 461—472, 1975.
6. *Svennerholm L.* — In: *Handbook of Neurochemistry* (ed. A. Lajtha.), v. 111, p. 425—452, Plenum Press, N. Y. 1970.
7. *Venerando B., Fiorilli A., Masserini M., Giuliani A., Tettamanti G.* *Biochim. et. biophys. acta*, v. 833, p. 82—92, 1985.
8. *Corti M., Degiorgio V., Ghidoni R., Sonnino S., Tettamanti G.* *Chem. Phys. Lipids*, v. 26, p. 225—238, 1980.
9. *Ghidoni R., Sonnino S., Masserini M., Orlando P., Tettamanti G.* *J. Lipid Res.*, v. 22, p. 1286—1295, 1981.
10. *Svennerholm L.* *Biochim. et. biophys. acta*, v. 24, p. 604—611, 1957.
11. *Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J.* *J. Biol. Chem.*, v. 193, p. 265—275, 1951.
12. *Tomas M., Roda L. G., Ausiello C., D'Agno G., Venerando B., Ghidoni R., Sonnino S., Tettamanti G.* *Eur. J. Biochem.*, v. 111, p. 315—324, 1980.
13. *Corti M., Degiorgio V., Sonnino S., Ghidoni R., Masserini M., Tettamanti G.* *Chem. Phys. Lipids*, v. 28, p. 197—214, 1981.
14. *Venerando B., Cestaro B., Fiorilli A., Ghidoni R., Preti A., Tettamanti G.* *Biochem. J.*, v. 203, p. 735—742, 1982.

Поступила 9. IX 1986

УДК 577.112

СПЕЦИФИЧЕСКИЕ ГЛИКОПРОТЕИНЫ ГИПОТАЛАМУСА

СРАПИОНИЯН Р. М.

Институт биохимии АН АрмССР, Ереван

Из гипоталамической области мозга получены в электрофоретически гомогенном виде четыре гликопротеина. Три из них (M_r 39, 24 и 20 кД) являются носителями ранее обнаруженных кардиотропных нейрогормонов «К», «Г», «С», образуя с ними соответственно нековалентно связанные комплексы. Исследование основных физико-химических свойств и некоторых структурно-функциональных особенностей указанных гликопротеинов позволяет заключить о существовании новых специфических для нервной ткани гликопротеинов, а использование метода радиационно-иммунологического анализа — однозначно утверждать о наличии в мозгу группы кардиактивных белок-гормональных комплексов.

В последнее десятилетие в нейробиологии наблюдается тенденция рассматривать сложные интегративные функции НС с помощью системного подхода, включающего в себя основные положения молекулярной