

37. Lee C. — M., Sandberg B. E. B., Hanley M. R., Iversen L. L. *Europ. J. Biochem.*, v. 114, 315, 1981.
38. Endo S., Yokosawa H., Ishii S. I. *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, v. 129, 694, 1985.
39. Laufer R., Ewenson A., Gilon Ch., Chorev M., Selinger Z. *Europ. J. Biochem.*, v. 150, 135, 1985.
40. Hanson G. R., Lovenberg W. J. *Neurochem.*, v. 35, 1370, 1980.
41. Couture R., Regoli D. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, v. 59, 621, 1981.

Поступила 9. IX 1986

УДК 612.82.015.13:577.2

ИЗУЧЕНИЕ ЭКЗОПЕПТИДАЗНОЙ АКТИВНОСТИ КАТЕПСИНА В И СПЕЦИФИЧНОСТИ КАТЕПСИНА D И ВЫСОКОМОЛЕКУЛЯРНОЙ АСПАРТИЛЬНОЙ ПРОТЕИНАЗЫ ГОЛОВНОГО МОЗГА С ПОМОЩЬЮ ХРОМОФОРНЫХ И ВАЗОАКТИВНЫХ ПЕПТИДОВ

АЗАРЯН А. В., ГАЛОЯН А. А.

Институт биохимии АН АрмССР, Ереван

Изучено действие катепсина В (КФ 3.4.22.1), катепсина D (КФ 3.4.23.5) и высокомолекулярной аспартильной протеиназы (КФ 3.4.23.—) головного мозга человека и быка на вазоактивные пептиды (ангиотензины I и II, вещество P, ренин субстрат тетрадекапептид) и хромофорные пептиды, содержащие остаток п-нитро-L-фенилаланила: Lys-Pro-Ala-Glu-Phe-Phe(NO₂)-Ala-Leu-OH (I), Gly-Gly-His-Phe(NO₂)-Phe-Ala-Leu-NH₂ (II), Pro-Glu-Ala-Phe(NO₂)-Gly (III). Обе аспартильные протеиназы расщепляли пептидную связь Phe₇-Phe₈ в веществе P, Leu₁₀-Leu₁₁ — в ренин субстрате тетрадекапептиде, Phe-Phe(NO₂) — в субстрате I и Phe(NO₂)-Phe — в субстрате II; катепсин D гидролизует связь Phe-Phe(NO₂) в субстрате I с K_m 0,4 мМ и k_{cat} 18,3 с⁻¹, а субстрат II — по связи Phe(NO₂)-Phe с K_m 0,88 мМ и k_{cat} 0,08 с⁻¹. Сопоставление кинетических констант гидролиза исследованных хромофорных пептидов катепсином D с таковыми для высокомолекулярной аспартильной протеиназы подтверждает наше предположение, что высокомолекулярная аспартильная протеиназа является комплексом катепсина D с эндогенным ингибитором. Изучение расщепления хромофорных пептидов катепсином В и определение кинетических констант ферментативного гидролиза субстратов I, III и Z-Arg-Arg-NNaOMe выявило факторы, способствующие проявлению дипептидилкарбоксипептидазной активности этой цистеиновой протеиназы.

Становится очевидным, что протеолитическая деградация нейропептидов и пептидных гормонов является принципиально важным механизмом, регулирующим активную концентрацию этих соединений и длительность их физиологических эффектов. Осознание роли протеиназ в процессе и инактивации нейропептидов и пептидных гормонов и в генерации олигопептидных фрагментов, обладающих более мощным или специфическим центральным действием, вызвало большой интерес к изучению протеиназ ткани головного мозга.

Ранее были описаны очистка, физико-химические свойства и субстратная специфичность аспартильных и цистеиновых протеиназ головного

мозга человека и быка: катепсина D (КФ 3.4.23.5) [1, 2], высокомолекулярной аспартильной протеиназы (ВАП) (КФ 3.4.23.—) [3—5], катепсина В (КФ 3.4.22.1) [2, 6], катепсина L (КФ 3.4.22.15) и катепсина Н (КФ 3.4.22.16) [7—10]. В настоящем сообщении представлены данные по изучению субстратной специфичности катепсина В, катепсина D и ВАП с помощью регуляторных пептидов вазоактивного ряда и хромоморфных олигопептидов, содержащих остаток *p*-нитро-L-фенилаланила (Nph). Целью настоящего исследования было выявление факторов, способствующих проявлению дипептидилкарбокснипептидазной активности катепсина В, сравнение субстратной специфичности катепсина D и ВАП для ответа на вопрос: является ли ВАП самостоятельным ферментом или комплексом катепсина D с эндогенным ингибитором, и получение информации о возможной физиологической роли этих протеиназ.

Материалы и методы

Катепсины В, D и ВАП выделяли из коры больших полушарий головного мозга человека и быка с помощью многоступенчатой процедуры, включающей биоэфринную хроматографию на пепстатин-, фенил- и конканавалин А-сефарозе, как описано в литературе [1, 3—6]. Активность аспартильных протеиназ определяли флуориметрически при pH 3,2 по гидролизу пиридоксил-гемоглобина [1] и спектрофотометрически при pH 5,0 по гидролизу азоказеина [5]. Активность катепсина В определяли в присутствии 2 мМ дитиотрептола и 2 мМ $\text{Na}_2\text{ЭДТА}$ при pH 6,0 флуориметрически в реакции гидролиза Z-Arg-Arg-NNaOMe и Z-Phe-Arg-NHMeс, а также по гидролизу азоказеина при pH 5,0 [6, 8]. Индивидуальность полученных препаратов фермента доказана диск-электрофорезом в ПААГ и изоэлектрическим фокусированием.

Гидролиз нейрпептидов проводили при 37° при соотношении фермент/субстрат 1:10 или 1:20 в 0,1 М цитратном буфере, pH 3,2 для аспартильных протеиназ и в 0,1 М фосфатном буфере, pH 6,0 в присутствии 2 мМ дитиотрептола и 2 мМ $\text{Na}_2\text{ЭДТА}$ —для катепсина В в течение 3-х ч. Природу расщепляемой пептидной связи определяли дансильрованием [11, 12] и идентификацией продуктов протеолиза тонкослойной хроматографией с использованием аутентичных свидетелей.

Гидролиз пептидов, содержащих Nph, регистрировали по изменению оптической плотности при 308 нм в термостатируемых кюветках при 25° для катепсина В и при 25° и 37° для аспартильных протеиназ на спектрофотометре «Cary-118» (США). Кинетические константы гидролиза хромоморфных пептидов катепсинами головного мозга рассчитывали из начальных скоростей реакции, построенных в координатах Лайнуивера-Берка, используя коэффициент молярной экстинкции $\epsilon_{308} = 1600 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ [13].

Результаты и обсуждение

Гидролиз вазоактивных пептидов аспартильными протеиназами головного мозга. Существование ВАП в ткани головного мозга человека и быка было впервые показано в 1983 г. [3, 4]. Этот фермент был выделен в электрофоретически гомогенном виде из коры больших полушарий головного мозга человека и быка с помощью хроматографии на пепстатин-сефарозе; M_r фермента—90 кД, изоэлектрическая точка—5,6. При электрофорезе в ПААГ в присутствии ДДС-Na и β -меркаптоэтанола обнаружена одна полоса, соответствующая белкам с M_r 46—48 кД [5].

По ряду характеристик ВАП сходна с катепсином D из того же источника: 1) высокая чувствительность к пепстатину— $K_i 10^{-8}$ М; 2) рекомендуемые субстраты—пиридоксил-гемоглобин (оптимум рН гидролиза 3,2) и азосубстраты: азоказени и азогемоглобин (оптимум рН гидролиза 5,0); 3) ВАП расщепляет бычий сывороточный альбумин и γ -глобулин, однако скорость гидролиза этих субстратов составляет 10 и 5% от скорости гидролиза гемоглобина соответственно; 4) добавление в инкубационную среду 3 М мочевины (рН 5,0) повышает величину У. А. ВАП в 3 и 5 раз в реакции гидролиза азогемоглобина и азоказени соответственно. Фракция иммуноглобулина G, полученная из кроличьей моноспецифической антисыворотки к катепсину D головного мозга быка, дает одну линию преципитации как с катепсином D, так и с ВАП (реакция двойной иммунодиффузии по Оухтерлонни), но свидетельствует лишь о частичной иммунологической идентичности катепсина D и ВАП [5]. Обращает на себя внимание тот факт, что величина У. А. ВАП значительно ниже, чем катепсина D: в 10 раз—в случае пиридоксил-гемоглобина и в 7 раз—в случае азоказени [5].

Для сравнения субстратной специфичности катепсина D и ВАП мы применили вещество Р и ренин субстрат тетрадекапептид (РСТП). Выбор именно этих двух вазоактивных пептидов обусловлен следующими соображениями: 1) катепсин D из разных источников, в том числе из головного мозга крыс, гидролизует РСТП, являющийся N-концевым тетрадекапептидом ангиотензиногена, с образованием ангиотензина I [14, 15]; 2) в 1983 г. мы обнаружили [1], что катепсин D головного мозга человека гидролизует вещество Р по связи Phe₇-Phe₈. В настоящей работе показано, что катепсин D головного мозга человека и быка также обладает способностью образовывать ангиотензин I из РСТП. Более того, ВАП также расщепляет связь Leu₁₀-Leu₁₁ в РСТП с образованием ангиотензина I. Обе аспартильные протениазы расщепляют связь Phe₇-Phe₈ в веществе Р. Ни ВАП, ни катепсин D не гидролизуют ангиотензины I и II [2]. Таким образом, приведенные данные свидетельствуют об одинаковой субстратной специфичности катепсина D и ВАП.

Вещество Р—хороший субстрат и для катепсина В ткани мозга: с помощью RIA показано, что 90% пептида подвергается гидролизу при 90 мин инкубации с ферментом: катепсин D головного мозга расщепляет 87% пептида в течение 30 мин, а 4-часовой инкубации каждой из указанных протениаз с этим пептидом достаточно для его полного гидролиза (совместное исследование с д-ром Бергером Х., Ин-т лекарственных средств, Берлин, ГДР). Нам удалось показать, что катепсин В головного мозга первоначально расщепляет связь Gly₉-Leu₁₀ в веществе Р (1-часовая инкубация) с последующим гидролизом Glu₆-Phe₇.

Гидролиз хромофорных пептидов аспартильными протениазами головного мозга. Так как, по данным рентгеноструктурного анализа, полость активного центра внеклеточных аспартильных протениаз вмещает

по меньшей мере 7 аминокислотных остатков [16, 17], были разработаны и синтезированы олигопептидные субстраты, которые были достаточно велики для уникального однозначного заполнения активного центра, содержали остаток Nph, превращение которого в карбоксилатную форму при протеолизе сопровождается изменением оптической плотности при 300—310 нм, и удовлетворяли критериям специфичности той или иной аспартильной протениназы [13, 18]. Для изучения субстратной специфичности катепсина D и ВАП головного мозга использовали 2 хромофорных олигопептида указанного типа Lys-Pro-Ala-Glu-Phe-Nph-Ala-Leu-OH (I) — аналог субстратов пепсина [13, 18] и катионный гистидинсодержащий пептид Gly-Gly-His-Nph-Phe-Ala-Leu-NH₂ (II).

Ранее эти пептиды были апробированы в качестве субстратов для пепсина свиньи и цыпленка [19]. Обе аспартильные протениназы головного мозга расщепляли единственную связь между двумя остатками фенилаланина в субстратах I и II в интервале рН 3,0—6,0 с оптимумом рН гидролиза при 3,2 и вторым небольшим пиком активности при рН 4,0 для катепсина D. Аналогичная бимодальная кривая рН-активности была ранее описана для катепсина D головного мозга человека в реакции гидролиза пиридоксил-гемоглобина [1]. Величина У. А. ВАП оказалась в 10 раз ниже таковой катепсина D в случае обоих субстратов I и II. Определены кинетические параметры гидролиза субстратов I и II катепсином D и ВАП (табл. 1). Установлено, что константы специфичности k_{cat}/K_m для катепсина D существенно выше, чем для ВАП, в случае обоих субстратов. Это обусловлено лучшей каталитической эффективностью катепсина D (k_{cat}), поскольку величины K_m довольно близки (табл. 1).

Учитывая тот факт, что ВАП сходна с катепсином D по ряду свойств, проявляет такую же субстратную специфичность, частично иммунологически идентична катепсину D и, в то же время, величина У. А. ВАП в 7—10 раз ниже таковой катепсина D, полученные кинетические параметры свидетельствуют в пользу предположения, что ВАП является комплексом катепсина D с эндогенным ингибитором.

Изучение экзопептидазной активности катепсина В головного мозга. Катепсин В обладает как эндо-, так и экзопептидазной активностью, отщепляя дипептиды с С-конца полипептидной цепи глюкагона, альдостазы, нейротензина, ангиотензина I [20—22, 2]. Факторы, способствующие проявлению пептидидипептидазной активности катепсина В, не ясны. Однако тот факт, что катепсин В головного мозга не гидролизует связь Phe-His в трипептиде Z-Phe-His-Leu, в то же время катализируя отщепление дипептида His₉-Leu₁₀ от ангиотензина I с образованием ангиотензина II [2], косвенным образом свидетельствует о важности связывания участка S₃ активного центра фермента для проявления его дипептидилкарбоксипептидазной активности. Это предположение было убедительно подтверждено работами Pohl и соавт. [23] для катепсина В селезенки быка с помощью модельных пептидов.

Для дальнейшего изучения дипептидилкарбоксипептидазной актив-

ности катепсина В головного мозга были использованы 3 хромофорных олигопептида, содержащих остаток Nph (рисунок). Как видно на рисунке, катепсин В отщеплял последовательно два дипептида от субстрата I и один—от субстрата III; в субстрате II первоначально гидролизовалась связь Ala-Leu, после чего отщеплялся С-концевой дипептид Phe-Ala. Были определены также кинетические константы гидролиза субстратов I, III и Z-Arg-Arg-NNaOMe катепсином В головного мозга (табл. 2).

Таблица 1
Кинетические параметры гидролиза хромофорных олигопептидов аспартильными протеиназами головного мозга:

I—Lys-Pro-Ala-Glu-Phe-Nph-Ala-Leu-OH,
II—Gly-Gly-His-Nph-Phe-Ala-Leu-NH₂.

Субстрат, мМ	Фермент, мкМ	k_{cat}, c^{-1}	$K_m, мМ$	$k_{cat}/K_m, c^{-1} мМ^{-1}$
I (0,05—1,0)	Катепсин D (0,08)	18,3	0,4	45,7
(0,1—1,0)	ВАП (0,07)	2,8	0,42	6,6
II (0,1—1,0)	Катепсин D (0,06)	0,08	0,88	0,09
(0,1—1,1)	ВАП (0,05)	0,02	0,92	0,022

Примечание. Инкубацию протеиназ с субстратом I проводили в 0,1 М цитратном буфере, pH 3,5 при 37°; с субстратом II—в 0,1 М цитратном буфере, pH 3,0 при 25°.

$E_{280}^{1\%} = 10,5$ для обеих протеиназ; величина M_r катепсина D—50 кД, ВАП—90 кД.

Полученные нами данные свидетельствуют о существовании еще двух факторов, необходимых для проявления дипептидилкарбокисептидазной активности катепсина В головного мозга:

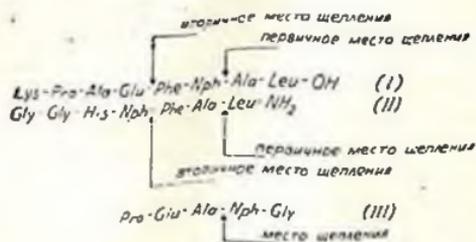


Рис. Гидролиз хромофорных олигопептидов катепсином В головного мозга при pH 5,0

1. Наличие в субстрате свободного С-конца. Так, на рисунке видно, что в гептапептиде с амидированным С-концом (субстрат II) сначала расщеплялась связь Ala-Leu и только после этого отщеплялся С-концевой дипептид Phe-Ala. В октапептиде же со свободным С-концом (суб-

страт 1) катепсин В отщеплял последовательно два дипептида с С-конца; 2. Специфичность взаимодействия отщепляемого дипептида $P'_1-P'_2$ с активным центром фермента. Экспериментальную основу признания важности этого фактора представляет сопоставление величин K_m гидролиза субстрата I (0,025 мМ) и диаргинилового субстрата — Z-Arg-Arg-NNaOMe (0,26 мМ), являющегося, наряду с Z-Phe-Arg-NHMeс, лучшим модельным субстратом катепсина В (табл. 2).

На основе имеющихся литературных данных трудно объяснить структурную основу дипептидилкарбоксипептидазной активности катепсина В: по мнению Takio и соавт. [24], определивших полную первичную

Таблица 2

Кинетические параметры гидролиза модельных пептидов катепсинов В головного мозга

S_6	S_5	S_4	S_3	S_2	S_1	S'_1	S'_2	k_{cat}, c^{-1}	$K_m, мМ$	$k_{cat}/K_m, c^{-1}мМ^{-1}$
Lys-	Pro-	Ala-	Glu-	Phe-Nph-	Ala-Leu			2,75	0,025	110,0
			Pro-	Glu-Ala-Nph-	Gly			1,20	0,18	6,7
				Z-Arg-Arg-	NNa			73,5	0,26	282,7

Примечание: Инкубацию катепсина В с субстратами проводили при 25° в присутствии 2 мМ дитиотрептола и 2 мМ Na_2 ЭДТА при pH 5,0 для Nph субстратов и при pH 6,0 для Z-Arg-Arg-NNaOMe.

структуру катепсина В из печени крыс, наличие остатка Arg-200 вблизи от остатка His-197 активного центра в молекуле фермента может быть существенным для связывания COOH-группы субстрата и проявления дипептидилкарбоксипептидазной активности катепсина В (представленные нами данные, свидетельствующие о важности свободного С-конца в субстрате для проявления экзопептидазной активности катепсина В головного мозга, подтверждают указанное мнение). Остаток Arg-200 обнаружен и в молекуле катепсина В из печени человека [25], тогда как в высокомолекулярных катепсину В молекулах папанна и катепсина Н он замещен на остатки лейцина и аланина соответственно [24]. Селективная модификация остатка Arg-200 с помощью специфических реагентов (1,2-циклогександион, бутандион) позволит уточнить его функциональную значимость.

Наличие в ткани головного мозга двух протеназ, обладающих дипептидилкарбоксипептидазной активностью, представляет несомненный интерес, так как одна из них—катепсин В—активна полностью в присутствии тиолсодержащих соединений и при значениях pH 5,0—6,0, а другая—ангиотензинпревращающий фермент—активна при значениях pH около 8,0, ингибируется SH-соединениями и активируется Cl^- . Возможно, эти протеназы функционируют внутри разных компартментов клетки и дополняют друг друга в процессах, связанных с образованием и инактивацией нейропептидов (хотя катепсин В преимущественно лока-

лизовав в лизосомах, он обнаруживается и в специфических гранулах, а также в связи с мембранной фракцией).

Трудно полностью исключить возможность участия аспартильных протеиназ головного мозга в локальном образовании ангиотензина I, хотя низкая активность катепсина D и ВАП при значениях рН выше 6.0 делает их неподходящими кандидатами для этой роли. Сопоставление ангиотензин I-генерирующей потенции ренина и катепсина D головного мозга представляется целесообразным.

Для детального изучения механизма ферментативных реакций необходимо наличие всесторонне охарактеризованных субстратов. Хотя эндогенные белки являются хорошими субстратами для многих протеиназ, они не пригодны для изучения механизма действия этих ферментов, так как, во-первых, конформация белковых субстратов существенно влияет на скорость протеолиза и, во-вторых, в белковых субстратах гидролизуются, как правило, не одна, а несколько пептидных связей. Для изучения механизма действия аспартильных протеиназ на первых порах использовали ди- и трипептиды. Обнаружение же протяженности полости активного центра внеклеточных аспартильных протеиназ, вмещающей по меньшей мере 7 аминокислотных остатков, свидетельствует о возможности многообразия связывания коротких пептидов в активном центре фермента, что затрудняет интерпретацию кинетических констант их гидролиза, рассчитываемых на основе измерения ферментативной активности. Проведенные нами исследования служат новым наглядным примером полезности и информативности использования специально разработанных хромофорных олигопептидов, уникально и однозначно заполняющих активный центр аспартильных протеиназ. С их помощью удалось не только получить новые данные о природе и механизме действия ВАП головного мозга, но и выявить факторы, способствующие проявлению дипептидилкарбоксипептидазной активности катепсина В из того же источника.

Выражаем благодарность д-ру J. Pohl (Институт органической химии и биохимии, г. Прага) за предоставление синтезированных им хромофорных олигопептидов, д-ру W. Siems за предоставление вещества Р и его фрагментов, синтезированных в Отделе синтеза лекарственных соединений Института лекарственных средств, Берлин, ГДР.

USE OF CHROMOPHORIC AND VASOACTIVE PEPTIDES FOR THE STUDY OF EXOPEPTIDASE ACTIVITY OF CATHEPSIN B AND SPECIFICITY OF CATHEPSIN D AND HIGH M_r ASPARTIC PROTEINASE FROM BRAIN TISSUE

AZARYAN A., GALOYAN A.

Institute of Biochemistry, Arm. SSR Acad. Sci., Yerevan

Substrate specificity of human and bovine brain cortex cathepsin B, cathepsin D and high M_r aspartic proteinases has been examined with angiotensins I & II, substance P, RSTP and model chromophoric oligopeptides containing Phe (NO_2) residue. The aspartic proteinases

exert identical specificity splitting Phe₇-Phe₈ bond in substance P, Leu₁₀-Leu₁₁ in RSTP and Phe-Phe - in chromophoric oligopeptides. Comparison of the kinetic constants k_{cat}/K_m of cathepsin D and high M_r aspartic proteinase-catalyzed hydrolysis of chromophoric oligopeptides supports our suggestion that high M_r aspartic proteinase may be a complex of cathepsin D with endogenous inhibitor. The cleavage pattern and kinetic constants of cathepsin B-catalyzed hydrolysis of regulatory and model peptides point to factors essential for manifestation of dipeptidylcarboxypeptidase activity of this proteinase: a) occupation of S₃ subsite, b) free C-terminus of substrate, c) specific interaction of dipeptide cleaved off with the active center of cathepsin B.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Azaryan A., Akopyan T., Buniatian H. *Biomed. biochim. acta*, v. 42, p. 1237-1246, 1983.
2. Azaryan A., Barkhudaryan N., Galoyan A., Lajtha A. *Neurochem. Res.*, v. 10, p. 1525-1532, 1985.
3. Азарян А., Бархударян Н.—В кн.: Труды IV Всесоюзн. симпозиума медицинской анимологии (ред. С. С. Дебов), с. 10-11, Алма-Ата, 1983.
4. Бархударян Н., Азарян А. *Нейрохимия*, т. 2, с. 280-287, 1983.
5. Azaryan A., Wiederanders B., Barkhudaryan N., Galoyan A. — In: *Aspartic Proteinases and their Inhibitors* (ed. V. Kostka), p. 123-127, Walter de Gruyter, Berlin, 1985.
6. Azaryan A., Barkhudaryan N., Galoyan A. *Neurochem. Res.*, v. 10, p. 1511-1524, 1985.
7. Azaryan A., Galoyan A. — In: *Proceed. 6th Intern. Symp. Intracellular Protein-Catabolism* (eds. H. Kirschke et al.), p. 2-7, Wernigerode, DDR, 1986.
8. Azaryan A., Galoyan A. *Neurochem. Res.*, v. 12, p. 207-214, 1987.
9. Galoyan A., Azaryan A. — In: *Synaptic Transmitters and Receptors* (eds. S. Tucek et al.), p. 123-133, J. Wiley & Sons, 1986.
10. Азарян А., Галоян А.—В кн.: Труды III Всесоюзн. симпозиума «Структура и функции лизосом» (ред. С. С. Дебов), с. 4-6, Москва, 1986.
11. Gros C., Labouesse B. *Eur. J. Biochem.*, v. 7, p. 463-470, 1969.
12. Hartley B. *Biochem. J.*, v. 119, p. 805-822, 1970.
13. Pohl J., Baudys M., Kostka V. *Anal. Biochem.*, v. 133, p. 104-109, 1983.
14. Hackenthal E., Hackenthal R., Hilgenfeldt U. *Biochim. et biophys. acta*, v. 522, p. 574-588, 1978.
15. Poe M., Wu J. K., Lin T.—Y. Hoogsteen K., Bull H., Slater E. *Anal. Biochem.*, v. 140, p. 459-467, 1984.
16. Andreeva N., Zhdanov A., Gustchina A., Fedorov A. *J. Biol. Chem.*, v. 259, p. 11353-11365, 1984.
17. Hallett A., Jones D., Atrash B., Szelke M., Leckie B., Beattie S., Dunn B., Valler M., Rolph C., Kay J., Foundling S., Wood S., Pearl L., Watson F., & Blundell T. — In: *Aspartic Proteinases & their Inhibitors* (ed. V. Kostka), p. 467-478, Walter de Gruyter, Berlin, 1985.
18. Kay J., Dunn B. *Biochem. Soc. Trans.*, v. 13, p. 1041-1043, 1985.
19. Pohl J., Strop P., Pichova J., Blahu J., Kostka V. — In: *Aspartic Proteinases and their Inhibitors* (ed. V. Kostka), p. 245-264, Walter de Gruyter, Berlin 1985.
20. Aronson N., Barrett A. *J. Biochem. J.*, v. 171, p. 759-765, 1978.
21. Bond J., Barrett A. *J. Biochem. J.*, v. 189, p. 17-25, 1980.

22. *Katunuma N., Towatari T., Kominami E., Heshida S., Takio K., Titani K.* Acta biol. med. Germ., v. 40, p. 1419-1425, 1981.
23. *Pohl J., Davinic S., Blaha J., Strop P., Kostka V.* — In: Cysteine Proteinases and their Inhibitors (ed. V. Turk), p. 37-43, Walter de Gruyter, Berlin, 1986.
24. *Takio K., Towatari T., Katunuma N., Teller D., Titani K.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA., v. 80, p. 3666-3671, 1983.
25. *Ritonja A., Popovic T., Turk V., Wiedenmann K., Machleidt W.* FEBS Lett., v. 181, p. 169-172, 1985.

Поступила 9. IX 1986

УДК 577.352.354.46:577.113.3

ВЛИЯНИЕ АНАЛОГОВ NAD НА ЕГО СВЯЗЫВАНИЕ СИНАПТИЧЕСКИМИ МЕМБРАНАМИ КОРЫ БОЛЬШИХ ПОЛУШАРИЙ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС

ХАЛМУРАДОВ А. Г., КУЧМЕРОВСКАЯ Т. М., ПАРХОМЕЦ П. К.,
КЛИМЕНКО А. П., АРУТЮНЯН А. В., *МОВСЕСЯН Н. О.

Институт биохимии им. А. В. Палладина АН УССР, Киев
*Институт биохимии АН АрмССР, Ереван

Было исследовано влияние ряда адениловых (аденозин, аденинтриуклеотиды) и никотинамидных (NADP, NADH, NADPH, дезамино- и дезамидо-NAD, N⁶-карбок- и метил-NAD, никотинамидмононуклеотид и 3'-ацетил-пиридин) аналогов NAD, а также антагонистов аденозина—метилксантинсв на процесс связывания ¹⁴C-NAD синаптическими мембранами мозга крыс. Установлено, что способность связываться с рецепторными участками мембран зависит от пространственной структуры исследуемых соединений. Показано, что в связывании синаптическими мембранами принимают участие как аденозиновый, так и никотинамидный фрагменты молекулы NAD.

При исследовании синаптических мембран коры больших полушарий головного мозга [1, 2], а также гиппокампа [3] крыс ранее была выявлена специфическая система взаимодействия NAD с двумя участками связывания, характеризующимися высокой и низкой степенью сродства к радиоактивному лиганду [1, 2]. Данные о наличии на синаптических мембранах двух NAD-связывающих участков соответствуют представлениям о существовании разных типов пуринорецепторов, отличающихся селективностью в отношении действия агонистов и антагонистов P₁ и P₂, преимущественными лигандами которых являются соответственно аденозин и АТР [4].

Не исключено, что молекула NAD может взаимодействовать как с рецепторами синаптической мембраны обоих типов, так и исключительно с одним из них. С другой стороны, наличие никотинамидного кольца в молекуле NAD указывает на возможность его связывания с бензодиазепиновыми рецепторами, одним из возможных специфических лигандов которых является никотинамид [5].

Целью настоящего исследования явилось выяснение роли аденозинового и никотинамидного фрагмента молекулы NAD в рецепции этого динуклеотида синаптическими мембранами головного мозга.