



УДК 577.352.354.46:577.113.3

О ПРИРОДЕ УЧАСТКОВ СИНАПТИЧЕСКИХ МЕМБРАН КОРЫ ГОЛОВНОГО МОЗГА, СВЯЗЫВАЮЩИХ НИКОТИНАМИДАДЕНИНДИНУКЛЕОТИД

КУЧМЕРОВСКАЯ Т. М., ПАРХОМЕЦ П. К., ЧИЧКОВСКАЯ Г. В.,
ХАЛМУРАДОВ А. Г., РОЖАНСКАЯ О. П.

Институт биохимии им. А. В. Палладина АН УССР, Киев

Изучали природу участков синаптических мембран коры головного мозга крыс, специфически связывающих NAD^+ . Использование ряда методических приемов (протеолитическая, липолитическая, нейраминидазная, температурная обработка синаптических мембран, химическая модификация белковой структуры) позволило установить, что рецепторные участки, локализованные на синаптических мембранах, связывающие NAD^+ , представляют собой протеолипиды, окруженные олигосахаридной частью ганглиозидов. В процессе связывания NAD^+ участвуют свободные SH-группы рецепторных участков синаптических мембран.

Ранее нами было показано, что синтезирующийся в клетках мозга из ограниченно проникающих через ГЭБ никотиновой кислоты и никотинамида [1] никотинамидадениндинуклеотид (NAD^+), являющийся естественным компонентом синаптосом коры [2], специфически связывается синаптическими мембранами. Связывание NAD^+ как насыщаемый и обратимый процесс осуществляется двумя рецепторными участками синаптических мембран, характеризующимися согласно данным графика Скэтчарда высоким и низким сродством к лиганду [3].

Целью настоящего исследования было изучение некоторых вопросов, связанных с природой рецептора NAD^+ , локализованного в синаптической мембране коры головного мозга крыс.

Материалы и методы

Синаптические мембраны получали из коры головного мозга крыс-самцов массой 150–180 г по методу Abita и соавт. [4], а их чистоту и нативность контролировали электронномикроскопически и по активности ферментов—маркеров субклеточных оргanelл (лактаатдегидрогеназы, сукцинатдегидрогеназы, глюкозо-6-фосфатазы, кислой фосфатазы, Na^+ , K^+ -АТФазы).

Во всех экспериментах по связыванию в качестве меченого лиганда использовали никотинамид [$\text{U}-14\text{C}$]адениндинуклеотид («Amersham», Англия) с удельной радиоактивностью 269 мКи/ммоль. Состав инкубационной среды, условия инкубации, а

также приемы расчета общего, неспецифического и специфического связывания NAD⁺ синаптическими мембранами были такими, как и в предыдущей нашей работе [3].

При обработке синаптических мембран трипсином («Srofa», СССР), химотрипсином той же фирмы и проназой («Serva», ФРГ), пробы подвергали преинкубации на протяжении 1 ч при 37°, добавляя в среду по 100 мкг протеолитического фермента на 1 мл инкубационной среды.

В исследованиях были также использованы фосфолипаза A₂, выделенная из яда пчелы (10–7 М), С—из *Bacillus cereus* (180 мкг на 1 мг белка) и D—из *Streptomyces cinnamomeus* (270 мкг на 1 мг белка). В этих случаях преинкубацию синаптических мембран в присутствии фосфолипаз проводили в течение 30 мин при 37°.

При обработке синаптических мембран нейраминидазой («Worthington», США) пробы преинкубировали на протяжении 20 мин при 37°, добавляя в инкубационную среду 50 мкг фермента на 1 мг белка мембран.

Исследования по химической модификации рецептора NAD⁺, локализованного на синаптической мембране коры головного мозга крыс проводили с помощью диэтиотрептола (преинкубация 1 мг мембранного белка в присутствии 3 мг диэтиотрептола на протяжении 30 мин) и нодацетамида (преинкубация в те же сроки, с добавлением 2 мг препарата в расчете на 1 мг белка мембран).

Результаты и обсуждение

Как видно из рис. 1, специфическое связывание никотинамид [¹⁴C]аденидинуклеотида ([¹⁴C]NAD⁺) синаптическими мембранами пропорционально концентрации мембранного белка, вносимого в среду инкубации. Кроме того, процесс этот является температурозависимым (рис. 2). Связывание, достигая плато при 24°, снижается после 45° и полностью прекращается при использовании прокипяченных проб.

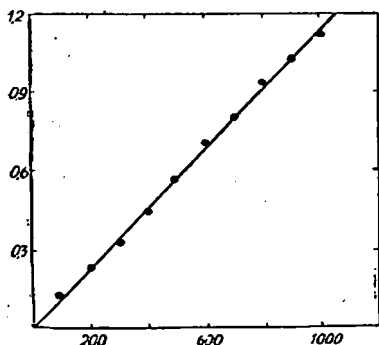


Рис. 1. Зависимость связывания [¹⁴C]NAD⁺ синаптическими мембранами от концентрации белка. По оси абсцисс—белок, мкг; по оси ординат—связанный [¹⁴C]NAD⁺, имп. 10³/мин

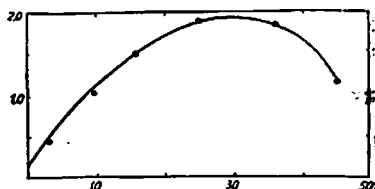


Рис. 2. Температурный оптимум связывания [¹⁴C]NAD⁺ синаптическими мембранами. По оси абсцисс—температура, по оси ординат—связанный [¹⁴C]NAD⁺, имп. 10³/мин/мг белка

Приведенные данные свидетельствуют о том, что связывающие NAD⁺ участки синаптической мембраны коры головного мозга крыс имеют белковую природу. В последующих экспериментах синаптические

ские мембраны предварительно подвергали действию протеолитических ферментов (трипсина, проназы, химотрипсина) и, инкубируя далее в присутствии $[^{14}\text{C}] \text{NAD}^+$, измеряли интенсивность специфического связывания радиоактивного лиганда с мембраной. Как видно из табл., обработка синаптических мембран тремя различными представителями протеолитических ферментов, различающихся по характеру своего действия, вызывает примерно в одинаковой степени снижение способности их связывать $[^{14}\text{C}] \text{NAD}^+$. Так, трипсин, химотрипсин и проназа вызывают снижение эффективности связывания $[^{14}\text{C}] \text{NAD}^+$ соответственно на 80, 75 и 70%. Эти результаты позволяют сделать важный вывод о том, что по своей природе связывающий NAD^+ компонент синаптической мембраны действительно является белком, локализованным, вероятно, на внешней поверхности синаптических мембран, поскольку обработка мембран протеолитическими ферментами приводит, как известно, к гидролизу только поверхностных белков [5].

В литературе накоплено достаточно сведений о том, что рецепторы многих гормонов, нейромедиаторов, нейропептидов по своей природе являются сложными, генетически детерминированными макромолекулами, состоящими из комплексов белков с липидами и углеводами [6]. Если считать, что рецептор NAD^+ является белком действительно синаптической мембраны, можно допустить наличие в его составе и липидов. Обычно подобную вероятность проверяют, используя в большинстве весьма специфичные методы ферментативного гидролиза липидов мембран.

Результаты наших исследований указывают на то, что специфическое связывание $[^{14}\text{C}] \text{NAD}^+$ синаптическими мембранами после их предварительной обработки фосфолипазой A_2 , отщепляющей жирнокислотные остатки в β -положении фосфолипидов, снижается на 61% (табл.). Фосфолипаза D , отщепляющая азотистое основание от полярной головки фосфолипида, также уменьшает специфическое связывание NAD^+ на 60%. Отрицательное действие фосфолипазы D на лиганд-рецепторное взаимодействие можно объяснить тем, что специфические места связывания находятся, вероятно, на поверхности липидного бислоя и закорены в мембране с помощью связи с полярной головкой фосфолипида. С нарушением полярности фосфолипидной головки фосфолипазой D изменяется пространственная конформация участков уздавания рецепторов, что и отражается в наблюдаемом нами уменьшении связывания NAD^+ мембранами. Если это суждение справедливо, тогда отщепление полярной головки (то есть азотистого основания и остатка фосфорной кислоты) с помощью фосфолипазы C должно еще в большей степени уменьшать связывание NAD^+ . Действительно, как выяснилось из проведенных исследований, после обработки фосфолипазой C синаптических мембран, специфическое связывание NAD^+ синаптическими мембранами снижается на 89%. Интересен тот факт, что несмотря на различия в механизме расщепления фосфолипидов мембран фосфолипазами A_2 , C и D , все они, как следует из таблицы,

приводят к торможению специфического связывания радиолиганда, что свидетельствует о важной роли фосфолипидов в поддержании структуры активного центра рецептора NAD^+ или же его доступности для лиганда.

Таблица

Влияние ферментативной и химической модификации рецепторных участков синаптических мембран на специфическое связывание $[^{14}\text{C}]\text{NAD}^+$, имп/мин на 1 мг белка ($n=7$)

Воздействие	Специфическое связывание $[^{14}\text{C}]\text{NAD}^+$		
	контроль	опыт	% изменения
Протеолитические ферменты			
Трипсин	1895 ± 132	$385 \pm 31^*$	-80
Химотрипсин	.	$472 \pm 40^*$	-75
Проназа	.	$573 \pm 54^*$	-70
Липолитические ферменты			
Фосфолипаза A_2	2030 ± 185	$790 \pm 46^*$	-61
D	.	$812 \pm 64^*$	-60
C	.	$210 \pm 20^*$	-89
Нейраминидаза	.	$3943 \pm 205^*$	+95
Алкилирование SH-групп			
Иодацетамид	2865 ± 201	$632 \pm 51^*$	-78
Восстановление S-S-связей			
Дитиотреитол	.	$2175 \pm 187^*$	-24

* $p < 0,05$

Существенная роль липидного микроокружения в функционировании рецепторов показана на примере связывания ряда гормонов. Так, обработка жировых клеток и мембран печени фосфолипазами A_2 и C приводила к 3—6-кратному увеличению связывания инсулина, что позволило выявить новые связывающие места [7], в то время как для фолликулостимулирующего гормона и для тиреолиберина наблюдали уменьшение связывания после обработки фосфолипазами [8]. Все это позволило предположить, что липиды входят в состав рецептора NAD^+ , а их полярная часть способствует рецепции $[^{14}\text{C}]\text{NAD}^+$.

Нельзя исключить роль углеводов мембран в рецепции $[^{14}\text{C}]\text{NAD}^+$ специфическим рецептором. Согласно современным взглядам, нейраминидаза—фермент, отщепляющий сialовые кислоты от полисиалоганглиозидов, а также расщепляющий ганглиозиды, находящиеся в комплексе с белками мембран, является наиболее специфическим ферментом для идентификации углеводов [9]. В наших исследованиях при обработке синаптических мембран нейраминидазой было обнаружено значительное увеличение (на 95%) их способности связывать $[^{14}\text{C}]\text{NAD}^+$ (таблица).

Приведенные выше результаты не позволяют однозначно ответить на вопрос, являются ли углеводы компонентами рецептора $[^{14}\text{C}]\text{NAD}^+$. Однако с известной долей осторожности можно предположить, что олигосахаридная часть ганглиозидов, находящаяся на внешней стороне постсинаптических мембран и ориентированная в синаптическую

щель, «маскирует» рецепторные участки, связывающие $[^{14}\text{C}]\text{NAD}^+$, поскольку удаление сialовых кислот с помощью нейраминидазы повышает доступность к ним $[^{14}\text{C}]\text{NAD}^+$.

Для более полного изучения их природы мы провели анализ структуры активных участков рецептора NAD^+ с помощью метода химической модификации [10]. При обработке мембран дитиотрептолом — агентом, избирательно восстанавливающим дисульфидные связи белков, специфическое связывание радиоактивного лиганда тормозится всего лишь на 24%, в то время как подацетамид, алкилирующий SH-группы белков, оказывает более выраженное действие на рецепцию NAD^+ , вызывая торможение связывания на 78% (таблица).

На основании вышеизложенных данных (таблица) можно предположить, что свободные SH-группы молекулы рецепторного белка синаптических мембран играют важную роль в процессе образования комплекса с NAD^+ .

Таким образом, полученные в настоящей работе данные свидетельствуют о том, что рецепторные участки синаптических мембран коры головного мозга крыс, связывающие NAD^+ , представляют собой протеолипиды, окруженные олигосахаридной частью ганглиозидов, в структуру которых входят SH-группы, взаимодействующие с $[^{14}\text{C}]\text{NAD}^+$.

NATURE OF NAD -BINDING SITES IN BRAIN CORTEX SYNAPTIC MEMBRANES

KUCHMEROVSKAYA T. M., PARKHOMETS P. K., CHICHKOVSKAYA G. V.,
KHALMURADOV A. G., ROZHANSKAYA O. P.

A. V. Palladin Institute of Biochemistry, Ukrainian SSR Academy of Sciences, Kiev

Nature of specific ($\text{U-}^{14}\text{C}$) NAD binding sites has been investigated in rat brain cortex synaptic membranes. Application of various methodological approaches (protease, lipase, neuraminidase and temperature treatment of synaptic membranes and chemical modification of protein) makes it possible to conclude that NAD -binding receptor sites in synaptic membranes are composed from proteolipids, surrounded by oligosaccharide moiety of gangliosides. Free SH-groups of the receptor sites in synaptic membranes are involved in NAD binding.

ЛИТЕРАТУРА

1. Spector R. J. *Neurochem.*, v. 33, p. 895—904, 1979.
2. Кучмеровская Т. М., Чичковская Г. В., Пархомец П. К., Халмуратов А. Г., Докл. АН УССР, серия Б, № 3, с. 71—74, 1984.
3. Халмуратов А. Г., Пархомец П. К., Кучмеровская Т. М., Чичковская Г. В. *Биохимия*, т. 48, № 8, с. 1287—1292, 1983.
4. Abita J., Chicheportiche R., Schwetz H., Lazduiski M. *Biochemistry*, v. 16, № 9 p. 1838—1864, 1977.

5. Snow C., Allen A. Biochem. J., v. 119, № 4, p. 707—714, 1970.
6. De Robertis E.—In: Reviews of Physiology, biochemistry and pharmacology, p. 9—38, 1975.
7. Cuatrecas P. J. Biol. Chem., v. 246, № 21, p. 6532—6542, 1971.
8. Cuatrecasas P. Annu. Rev. Biochem., v. 43, p. 169—173, 1974.
9. Ziegler D., Keilich G., Brossmer R., Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., v. 363, № 9, p. 1040—1041, 1982.
10. Silman H. I., Karlin A. Proc. Nat. Acad. Sci., USA, v. 58, № 4, p. 1664—1668, 1967.

Поступила 15. IV 85

НОВЫЕ КНИГИ

Redulation of Transmitter Function: Basic and Clinical Aspects
(ed. by E. S. Vizi and K. Magyar), Elsevier Science Publishers, Amsterdam—New York, 1984.

Сборник составлен по материалам 5-й конференции Европейского нейрохимического общества (Будапешт, 21—26 августа 1984 г.). В нем широко представлены нейрохимические исследования при таких заболеваниях нервной системы, как болезнь Альцгеймера, паркинсонизм, шизофрения и рассеянный склероз. Большинство статей посвящено вопросам изучения процессов высвобождения нейротрансмиттеров и модуляции, взаимодействия нейротрансмиттеров с рецепторами, влияния нейротоксина на систему нейротрансмиттеров и иммуноцитохимию их специфических маркеров при указанных патологиях. Обсуждается широкий диапазон нейротрансмиттеров и нейромодуляторов от ацетилхолина до недавно обнаруженных нейропептидов.

Книга представляет интерес для нейрохимиков, нейрофармакологов и клиницистов, интересующихся нейрохимическими основами нейробиологических и психиатрических заболеваний.