НЕЙРОХИМИЯ

т. 3, № 2, 1984

УДК 612.015.8

ВЛИЯНИЕ ЛИПИДОВ НА АКТИВНОСТЬ НЕЙРАМИНИДАЗЫ ГОЛОВНОГО МОЗГА

ТУМАНОВА С. Ю., КЛЯНЧ К., БЕСПАЛОВА М. А., МУХИНА А. П., ГОВОРОВА Е. Е.

Физиологический институт им. А. А. Ухтомского, ЛГУ им. А. А. Жданова, Ленинград

В головном мозгу крысы на долю растворимой нейраминидазы приходится 26,7, а на долю мембраносвязанной—73,3% от общей нейраминидазной активности мозга. Оба фермента являются липидзависимыми, причем смесь фосфолипидов с холестерином и сульфатиды активируют их особенно сильно. По-видимому, растворимая и мембраносвязанная нейраминидазы имеют различную метаболическую роль и могут быть независимым объектом контроля.

Интегративная деятельность головного мозга сопровождается постоянными структурными перестройками синаптических мембран. Пластичность последних в значительной степени определяется структурным многообразием, организацией и конформационной изменчивостью ганглиозидов. Не случайно ганглиозиды рассматриваются как сигнальные, информативные молекулы синаптических мембран [1]. Существенно их значение в определении мембранного потенциала синаптических образований; подсчитано, что на грамм мозга приходится не менее $1{,}3 \cdot 10^{18}$ анионных групп ганглиозидов [2]. Изменение их электрогенности является одним из важнейших процессов модификации нейрональных мембран и главная роль в этом принадлежит нейраминидазе головного мозга [3].

Несколько лет тому назад была высказана гипотеза о том, что ганглиозиды и нейраминидаза физиологически связаны и обуславливают специфические функции мозга [4]. Это подтверждается тем, что нейраминидаза локализована в синаптических мембранах [5—9], исключительно обогащенных ганглиозидами [10—13]. Установлено, что синаптическая передача нарушается после введения нейраминидазы в пресинаптическую область [14, 15] и в онтогенезе синаптические контакты функционально формируются только после включения нейраминовой кислоты в молекулы поверхности нейрональных мембран [16].

Нейраминидаза (сиалидаза, мукополисахарид N-ацетилнейраминилгидролаза (КФ 3.2.1. 18) представлена в головном мозгу двумя ос-

новыми формами: растворимой [17—19] и мембраносвязанной, расщепляющей, главным образом, но не специфически, полисиалогангли-озиды [5, 20—23]. В настоящее время отсутствуют данные о связи этих двух ферментов в головном мозгу. Очевидно, что на взаимодействие ганглиозидов с нейраминидазой в мембранах существенное влияние должны оказывать липиды бислоя.

Целью данной работы явилось изучение влияния липидов на активность растворимой и связанной нейраминидаз головного мозга крыс в норме и при введении аминазина и хлоралгидрата.

Материалы и методы

Растворимую и мембраносвязанную нейраминидазы выделяли из коры головного мозга крысы по методу Gatt, Leibovitz [24], в модификации Ohman и соавт. [18] и Tettamanti и соавт. [23]. Кору мозга гомогенизировали в сильно охлажденном 0,156 М KCl (1 : 6). Гомогенат центрифугировали при 105000 g в течение 1 ч. Супернатант являлся источником растворимой нейраминидазы. Инкубационная среда для определения активности растворимой нейраминидазы содержала 0,1 мл 1 М ацетатного буфера, pH 5,8, белок супернатанта—2,5—3,0 мг, 100 мкг субстрата.

Субстратом служили общие ганглиозиды головного мозга крысы, выделенные по методу Svennerholm [27]. Они представляли собой смесь индивидуальных ганглиозидов, около 90% которой составляли основные три-, ди- и моносиалогангли-озиды (G_{T1}, G_{D1a}, G_{D1b}, G_{M1}). Окончательный объем реакционной смеси не превышал 0,65 мл. Один контроль не содержал субстрата, другой—фермента. Инкубацию осуществляли при периодическом встряхивании при 37°, 1 ч, затем реакцию прекращали добавлением 0,1 мл 0,2 М периодата натрия.

Полученный после центрифугирования осадок являлся источником мембраносвязанной нейраминидазы. Связанная нейраминидаза представляет собой комплекс с эндогенными сиалилсодержащими субстратами липидной и нелипидной природы [18], от которых освобождались преинкубацией фермента в стандартных условиях без добавления субстрата и детергента. Для этого осадок гомогенизировали в 0,5 М ацетатном буфере pH 4,4 (8 : 1) и инкубировали 45 мин при 37°. За это время происходило полное отщепление N-ацетилнейраминовой кислоты (NeuAc) от эндогенных субстратов и при этом сохранялась мембраносвязанная природа фермента и его энзиматическая активность, которая оставалась линейной в течение 90 мин к экзогенному субстрату [17]. Было установлено, что низкие концентрации NeuAc, G_{M1} и G_{M2} не проявляют ингибирующего эффекта [18]. После завершения преинкубации забуференный фермент переносили в ледяную баню.

Определение активности связанной нейраминидазы, лишенной эндогенных субстратов, проводили следующим образом: 100 мкг субстрата в хлороформ-метаноловом растворе (2 : 1) переносили в пробирку и туда же добавляли раствор в хлороформ-метаноле тритона X-100 (до

окончательной концентрации 0,15%), поскольку установлено, что в низких концентрациях он активирует связанную нейраминидазу [18]. Растворитель осторожно и тщательно выпаривали под вакуумом на водяной бане при 40°, а осадок смешивали с 0,5 М ацетатным буфером для перевода ганглиозидов и детергента в водную фазу. Пробы переносили на лед и добавляли в них прединкубированный фермент (1,0—1,5 мг белка). Окончательный объем смеси не должен превышать 0,65 мл. Контрольные пробы не содержали либо субстрата, либо фермента. Инкубацию осуществляли 1 ч при 37° и реакцию прекращали, как и в случае растворимой нейраминидазы, добавлением 0,1 мл 0,2 М перйодата натрия. Далее все процедуры для определения количества освободившейся NeuAc проводили тиобарбитуровым методом [25]. Активность растворимой и связанной нейраминидаз рассчитывали в мкг NeuAc/г мозга/ч. Белок определяли по методу Lowry и соавт. [26]. В качестве стандарта использовали бычий сывороточный альбумин.

Исследовали влияние общих фосфолипидов, холестерина, гликолипидов головного мозга человека на нейраминидазную активность. Общие липиды головного мозга человека выделяли по методу Folch и соавт. [28]. Методом ТСХ на силикагеле КСК в системе гексан—диэтиловый эфир—ледяная уксусная кислота (70 : 30 : 2) из общих липидов изолировали общие фосфолипиды и холестерин. Гликолипиды (цереброзиды и сульфатиды) выделяли из мозга человека по методу Uzman [29] и перекристаллизовывали из горячего ацетона. После перекристаллизации они содержали 19,3% сульфатидов и 80,7% цереброзидов. Методом ТСХ на силикагеле КСК в системе растворителей хлороформ—метанол—конц. аммиак (80 : 20 : 0,4) получали отдельные фракции цереброзидов и сульфатидов.

Полученные липиды использовали совместно с общими ганглиозидами в качестве субстратов для определения нейраминидазной активности мозга крысы в следующих весовых соотношениях—ганглиозиды: фосфолипиды (1 : 9); ганглиозиды: фосфолипиды: холестерин (1 : 7 : 2); ганглиозиды: цереброзиды (1 : 9); ганглиозиды: сульфатиды (1 : 9); ганглиозиды: сульфатиды: цереброзиды (1 : 1,8 : 7,2); ганглиозиды: фосфолипиды : холестерин : цереброзиды : сульфатиды (1 : 3,5 : 1 : 3,6 : 0,9).

Аминазин и хлоралгидрат вводили крысам подкожно за 1 ч до декапитации из расчета 3 мг и 50 мг/100 г массы соответственно.

Результаты и обсуждение

Активность цитозольной и мембраносвязанной нейраминидаз головного мозга крысы в норме и при введении аминазина и хлоралгидрата представлена в табл. 1 и 2. На долю растворимого фермента приходится 26,7, мембраносвязанного—73,3% от общей нейраминидазной активности мозга.

Ганглиозиды в водных растворах могут находиться либо в виде мономеров при концентрациях ниже критической концентрации мицеллообразования (ККМ), либо в виде мицелл. Поскольку ККМ для ганглио-

зидов очень низка—10^{-6} М [30] или 10^{-8}—10^{-9}М [31, 32], то они спонтанно образуют мицеллы. Пока неизвестны факторы, определяющие переход мономер—мицелла ганглиозидов в микроокружении нейрональных мембран, но в модельных исследованиях определены условия немедленного образования мицелл. Показано, что упаривание ганглиозидов из неполярных растворителей и последующее растворение их в воде приводит к возникновению высокостабильных мицелл с низкой скоростью обмена ганглиозидных компонентов между мицеллами [33]. Все это дает основание считать, что при использованных концентрациях ганглиозидов мы работаем с гетерогенной мицеллой, полученной из общих ганглиозидов, и со смешанными ганглиозид-липидными мицеллами.

Таблица 1

Активность растворимой нейраминидазы головного мозга в норме и при введении аминазина и хлоралгидрата (мкг/NeuAc/г мозга/ч)

Субстрат	Норма	Аминазин	Хлоралгидрат
Общие ганглиозиды	20±3 (14)	12±3 (13) p_0 0,039	10±2 (13) p_0=0,009
Ганглиозиды-Фосфолипиды	41±1 (4) p_c <0,001	39,0±0,1 (3) p_0>0.05 p_c <0,001	38±9 (3) p_0>0,05 p_c 0,029
Ганглиозиды-Цереброзиды-	38±1 (4) p_c 0,003	46,0±0,1(3) p_0<0,001 p_c <0,001	41±7 (3) p_c =0,012 p_0>0.05
Ганглиозиды Сульфатиды	42±2 (4) p_c <0,001	40±2 (3) p_0 > 0,05 p_c <0,001	39±3 (3) p_c <0,001 p_0 0,05
Ганглиозиды-Фосфолипиды-Холестерин	47±6 (4) p_c 0,008	37±7 (4) p_0>0,05 p_c =0,015	16±5 (4) p_c >0,05 p_0 0,009
Ганглиозиды-Цереброзиды-Сульфатиды	40±8 (4) p_c <0,05	25±3 (4) p_0>0,05 p_c =0,02	19±4 (4) p_c >0,05 p_0 0,042
Ганглиозиды-Фосфолипиды-Холестерин-Цереброзиды-Сульфатиды	36±3 (4) p_c <0,05	23,0±0,1 (3) p_0=0,012 p_c =0,017	20±3 (3) p_c =0,047 p_0 =0,017

Примечание. В скобках—количество опытов; p_c—отражает влияние субстрата; p_0—влияние аминазина или хлоралгидрата.

Установлено, что нейраминидаза моментально модифицирует свою активность в зависимости от физического состояния субстрата [34]. С субстратом в мономерной форме нейраминидаза взаимодействует аллостерически, гомогенная мицелла ганглиозидов ингибирует фермент, а смешанная мицелла многократно увеличивает нейраминидазную активность [35]. Возможно, что в нейраминидазе имеется два активных центра—один для связывания субстрата в мономерной форме, другой—в агрегированном состоянии.

Полученные нами данные свидетельствуют о том, что липидное окружение, а точнее, состав смешанных ганглиозид-липидных мицелл, сказывается на активности отщепления нейраминовой кислоты как раствори-

мой, так и мембраносвязанной нейрамминидазами. Оба фермента слабо гидролизовали мицеллы, состоящие только из ганглиозидов. Видимо, ориентация и конфигурация олигосахаридных цепочек в такой мицелле делает субстрат мало доступным ферменту. Возможно, что взаимодействие олигосахаридных цепочек ганглиозидов через перекрестные водородные связи маскирует гидролизуемую нейрамминидазой связь. В смешанных мицеллах оно может быть уменьшено или сведено на нет и при определенной природе и соотношении окружающих липидов могут создаваться оптимальные условия для гидролиза нейраминовой кислоты.

Таблица 2

Активность мембраносвязанной нейрамминидазы головного мозга в норме и при введении амиазина и хлоралгидрата (мкг NeuAc/г мозга/ч)

Субстрат	Норма	Амиазин	Хлоралгидрат
Общие ганглиозиды	55±5 (18)	42±9 (12) $p_0 > 0,05$	56±5 (12) $p_0 > 0,05$
Ганглиозиды-Фосфолипиды	118±10 (4) $p_c = 0,003$	97±3 (3) $p_c = 0,005$ $p_0 > 0,05$	81±1 (3) $p_c = 0,008$ $p_0 = 0,017$
Ганглиозиды-Цереброзиды	129±9 (4) $p_c < 0,001$	107±5 (3) $p_c < 0,001$ $p_0 > 0,05$	112±3 (3) $p_c < 0,001$ $p_0 > 0,05$
Ганглиозиды-Сульфатиды	156±21 (4) $p_c = 0,005$	109±10 (3) $p_c = 0,008$ $p_0 > 0,05$	123±12 (3) $p_c = 0,007$ $p_0 > 0,05$
Ганглиозиды-Фосфолипиды-Холестерин	166±11 (4) $p_c < 0,001$	232±10 (3) $p_c < 0,001$ $p_0 = 0,011$	137±3 (2) $p_c < 0,001$ $p_0 > 0,05$
Ганглиозиды-Цереброзиды-Сульфатиды	120±11 (4) $p_c = 0,006$	208±1 (3) $p_c < 0,001$ $p_0 < 0,001$	103±4 (3) $p_c = 0,001$ $p_0 > 0,05$
Ганглиозиды-Фосфолипиды-Холестерин-Цереброзиды-Сульфатиды	134±12 (4) $p_c = 0,002$	157±3 (3) $p_c < 0,001$ $p_0 > 0,05$	139±3 (2) $p_c < 0,001$ $p_0 > 0,05$

Примечание. Обозначения те же, что и в табл. 1.

Нами установлено, что все исследуемые липиды усиливали гидролиз ганглиозидов растворимой нейрамминидазой. Этот эффект был особенно значимым в присутствии фосфолипидов с холестерином, сульфатидов и смеси сульфатидов с цереброзидами. Цереброзиды и смесь всех исследуемых липидов в меньшей степени способствовали гидролизу ганглиозидов (на 20—35% слабее, чем фосфолипиды с холестерином).

Мембраносвязанная нейрамминидаза активнее гидролизовала субстрат в окружении фосфолипидов с холестерином, сульфатидов и в мицелле, содержащей все исследуемые липиды (табл. 2). Мембраносвязанный фермент был менее чувствителен к присутствию в мицелле фосфолипидов, цереброзидов и смеси сульфатидов с цереброзидами. Таким образом, растворимая и связанная нейрамминидазы сильнее активируются смесью фосфолипидов с холестерином и сульфатидами. Вероят-

но, включение этих липидов в мицеллу обеспечивает большее число молекул субстрата, доступных ферменту. Не исключена также возможность, что в активных центрах обоих ферментов или соседних участках есть гидрофобные области с различным липофильным сродством. По всей вероятности, оба фермента могут действовать на ганглиозиды только в бислойной структуре, обеспечивающей определенную ориентацию субстрата. Отсутствие точных сведений о строении активного центра ферментов не позволяет сказать, являются ли липиды кофакторами, устраняют ли они ингибирование стерических препятствий на границе раздела фаз или облегчают образование субстрат-ферментного комплекса, придавая определенную ориентацию субстрату, либо активируя его.

Взаимодействие с субстратами растворимого и мембраносвязанного ферментов, выделенных из мозга крыс, которым вводили аминазин и хлоралгидрат, изменялось. Активность растворимой нейраминидазы при работе с ганглиозидными мицеллами подавлялась почти на 50% при введении аминазина и хлоралгидрата, тогда как активность мембраносвязанного фермента по отношению к этим мицеллам не изменялась.

В смешанных ганглиозид-липидных мицеллах аминазин делал растворимую нейраминидазу более чувствительной к присутствию цереброзидов, сульфатидов, почти не изменяя ее отношение к фосфолипидам и уменьшал влияние фосфолипидов с холестерином и гликолипидов. После действия аминазина мембраносвязанная нейраминидаза сильнее активировалась более гетерогенной смесью липидов, чем отдельными представителями липидов.

Хлоралгидрат снижал потребность растворимой нейраминидазы в липидах, активность фермента, характерная для нормы, сохранялась только с фосфолипидами, цереброзидами, сульфатидами, взятыми отдельно. Хлоралгидрат также уменьшал влияние липидов на активность мембраносвязанного фермента.

Обнаруженное нами неоднозначное изменение активности двух ферментов при введении аминазина и хлоралгидрата свидетельствует о наличии в организме множественных факторов регуляции их активности. Вероятнее всего, в случае растворимой нейраминидазы регуляция этими агентами может касаться изменения активного центра фермента и облегчения образования субстрат-ферментного комплекса. В случае же мембраносвязанного фермента, кроме того, может иметь место его солюбилизация в нативной мембране и большая экспонированность из липидно-белкового каркаса мембраны. Можно утверждать, что аминазин и хлоралгидрат по-разному изменяли конформацию обоих ферментов, поскольку отличалось их взаимодействие с одинаковыми субстратами. Значит, растворимая и мембраносвязанная нейраминидазы могут иметь различную метаболическую роль, и каждая из них может быть независимым объектом контроля [19].

Можно предположить, что растворимая нейраминидаза корректирует структуру ганглиозидов, переносимых аксональным током к месту функционирования [36]. Мембраносвязанный фермент ответствен за

наличие и плотность распределения заряда на поверхности синаптической мембраны. Следовательно, размещение ганглиозидов среди липидного окружения мембраны будет определять стабильность или лабильность отрицательного заряда и тем самым способствовать протеканию тех или иных процессов. При этом необходимо подчеркнуть, что устранение нейраминовой кислоты нельзя рассматривать как деструктивный процесс, скорее, это процесс, запускающий и модулирующий многие рецепторные, адгезивные, антигенные и другие важнейшие функции мембраны [37].

EFFECT OF LIPIDS ON BRAIN NEURAMINIDASE ACTIVITY

TUMANOVA S. Yu KLJAICH K., BESPALOVA M. A., MUKHINA A. P., GOVOROVA E. E.

A. A. Ukhtomsky Institute of Physiology, A. A. Zhdanov State University, Leningrad

The cytosol neuraminidase accounts for 26,7% and the particulate neuraminidase for 73,3% of the total rat brain neuraminidase activity. Both enzymes are lipid dependent and are stimulated more significantly by phospholipids containing cholesterol and by sulfatides. Most probably, the soluble and particulate neuraminidases have a different metabolic role and are regulated independently.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Крепс Е. М., Ашмарин И. П.* Нейрохимия, *1*, 1, 11—19, 1982.
2. *Прохорова М. И.* Успехи нейрохимии, Л., Наука, с. 61—73, 1974.
3. *Yohe H. C., Rosenberg A.* Proc. Intern. Soc. Neurochem. Copenhagen. Abstracts 6, p. 238, 1977.
4. *Tettamanti G., Preti A., Lombardo A., Bonali F., Zambotti V.* Biochim. et biophys. acta, *306*, 3, 466—477, 1973.
5. *Tettamanti G., Preti A., DiDonato S. E., Marconi M.* Rend. Ist. Lomb. Sc. Lett (B), *102*, 292—320, 1968.
6. *Schengrund C. L., Rosenberg A.* J. Biol. Chem., *245*, 6196—6200, 1970.
7. *Roukema P. A., Heijlman J.* J. Neurochem., *17*, 6, 773—780, 1970.
8. *Ohman R.* J. Neurochem., *18*, 1, 89—95, 1971.
9. *Ohman R., Svennerholm L.* J. Neurochem., *18*, 1, 79—87, 1971.
10. *Avrova N. F., Chenykaeva E. Yu., Obukhova E. L.* J. Neurochem., *20*, 4, 997—1004, 1973.
11. *Tettamanti G., Morgan I. G., Gombos G., Vincendon G., Mandel P.* Brain Res., *47*, 2, 515—518, 1972.
12. *Rosenberg A.* Adv. Expt. Med. Biol., *101*, 439—446, 1978.
13. *Leskawa K. C., Rosenberg A.* Adv. Expt. Med. Biol., *125*, 125—135, 1980.
14. *Tauc L., Hinzen D. H.* Brain Res., *80*, 2, 340—344, 1974.
15. *Simonneau M., Baux G., Tauc L.* J. physiol. (France), *76*, 5, 427—433, 1980.
16. *Rahman H., Rösner H., Breer H.* J. Theor. Biol., *57*, 231—237, 1976.
17. *Tettamanti G., Zambotti V.* Enzymologia, *35*, 61—74, 1968.
18. *Ohman R., Rosenberg A., Svennerholm L.* Biochemistry, *9*, 3774—3782, 1970.
19. *Carubelli R., Tulsiani D. R. P.* Biochim. et biophys. acta, *237*, 1, 78—87, 1971.
20. *Leibowitz Z., Gait S.* Biochim. et biophys. acta, *152*, 136—143, 1968.
21. *Preti A., Lombardo A., Tettamanti G.* Ital. J. Biochem., *19*, 371—385, 1970.
22. *Lombardo A., Preti A., Tettamanti G.* Ital. J. Biochem., *19*, 386—396, 1970.

23. *Tettamanti G., Preti A., Lombardo A., Gaspartni M., Zambotti V.* Biochim. et biophys. acta, *258*, 1, 228—237, 1972.
24. *Gatt S., Leibovitz Z.*—In: Methods in Enzymol., *14*, p. 149—152, N. Y.—L., Acad. Press, 1969.
25. *Warren L.* J. Biol. Chem., *234*, 8, 1971—1975, p. 1959.
26. *Lowry O. H., Rosenbrough N. J., Farr A. L., Randall R. J.* J. Biol. Chem., *193*, 265—275, 1951.
27. *Svennerholm L.*—In: Methods in Carbohydrate Chemistry, 6, 454—474. N. Y.—L., 1972.
28. *Folch Pi-J., Lees M., Sloane-Stanley G. A.* J. Biol. Chem., *226*, 1, 497—506, 1957.
29. *Uzman L. L.* Arch. Biochem. and Biophys., *45*, 1, 149—155, 1953.
30. *Corti M., Degiergio V., Ghidoni R., Sonnino S., Tettamanti G.* Chem. Phys. Lipids, *25*, 225—233, 1980.
31. *Formisano S., Johnson M. L., Lee G., Aloj S. M., Edelhodi M.* Biochemistry, *18*, 1119—1124, 1979.
32. *Barenzolz Y., Cestaro B., Lichtenberg D., Freize E., Thompson T. E., Gatt S.* Adv. Expt. Med. Biol., *125*, 105—123, 1980.
33. *Heuser E., Lipp K., Wiegandt H.* Anal. Biochem., *60*, 2, 382—388, 1974.
34. *Tettamanti G., Venerando B., Cestaro B., Preti A.*—In: Ganglioside function. Biochemical and Pharmacological Implications (Eds. Porcelatti G., Ceccarelli B., Tettamanti G.), 65—82, N. Y.—L., Plenum Press, 1976.
35. *Curatolo W., Small D. M., Shipley G. G.* Biochim. et biophys. acta, *468*, 11—20, 1977.
36. *Venerando B., Preti A., Lombardo A., Cestaro B., Tettamanti G.* Biochim. et biophys. acta, *527*, 17—30, 1978.
37. *Schauer R.* Adv. Carbohydr. Chem. Biochem., *40*, 131—234, 1982.

Поступила 6. II 1983