

УДК 577.152

БИОХИМИЯ

А. А. Вартамян, Г. В. Априкян

**О взаимосвязи метилирования мембранных белков
нервных окончаний мозга белых крыс с системой цАМФ**

(Представлено академиком АН Армянской ССР А. А. Галояном 24/VI 1988)

Функциональная роль метилирования белков и пептидов остается малонизученной. Хотя и идентифицирован ряд белков, ковалентно связывающих метильные группы (¹⁻⁵), единственно известным белком, метилирование которого непосредственно связывается с некоторыми функциональными изменениями в нервных клетках, является основным белок миелина (⁶). Чрезвычайно низкие количества метилированных белков (порядка 10^{-10} моль/мг белка), которые оказывают влияние на метаболическую активность, позволяют предполагать, что метилирование белков находится в тесной связи с ее регуляторными системами. Среди таких систем в последние годы все большее внимание исследователей привлекает система цАМФ, широкий спектр биологического действия которой не вызывает сомнений. Экспериментальная проверка указанной гипотезы и составляет основное содержание данной работы.

Синапсомы мозга белых крыс получали по методу Хайош (⁷). Лизис синапсомом мозга проводили 0,5%-ным NP—40 в 10 мМ Трис. HCl, pH 7,2. Мембраны синапсомом мозга выделяли из лизата центрифугированием 20 000 g в течение 30 мин. Синапсомальные мембраны были очищены промывкой 100-кратным объемом буфера Трис.HCl (50 мМ), pH 7,2 с дальнейшим центрифугированием при 25 000 g в течение 30 мин.

Синапсомы, мембраны которых становились проницаемыми для S-аденозил-L-метил-метионина (SAM), получали по модифицированной нами методике (⁸). Метилтрансферазную активность определяли по ранее описанной методике (⁹).

Задача, стоявшая перед нами первоначально, заключалась в поиске мембранно-связанного фермента синапсомом мозга. На рис. 1 показаны результаты исследований зависимости включения [³H]-метильных групп в ТХУ-нерастворимые белки интактных синапсомом мозга белых крыс. В первую очередь привлекает внимание тот факт, что образование ковалентной связи метильной группы с белком (мы исследовали тотальное метилирование, т. е. пришивку метильной группы как к азоту аргинина и лизина, так и образование сложноэфирной связи) все же имеет место в выбранных нами условиях. Это говорит о том, что либо имеется мембранно-связанный фермент, локализованный на внешней стороне мембраны, либо SAM может захватываться нервными окончаниями мозга. Второе предположение показалось нам более заманчивым.

вым, так как SAM, как и любое другое соединение нуклеотидной природы, не проникает через плазматическую мембрану. Но после некоторых контрольных экспериментов мы отказались от этой идеи. Поглощение SAM хотя и при 37°C было несколько выше, чем при ком-

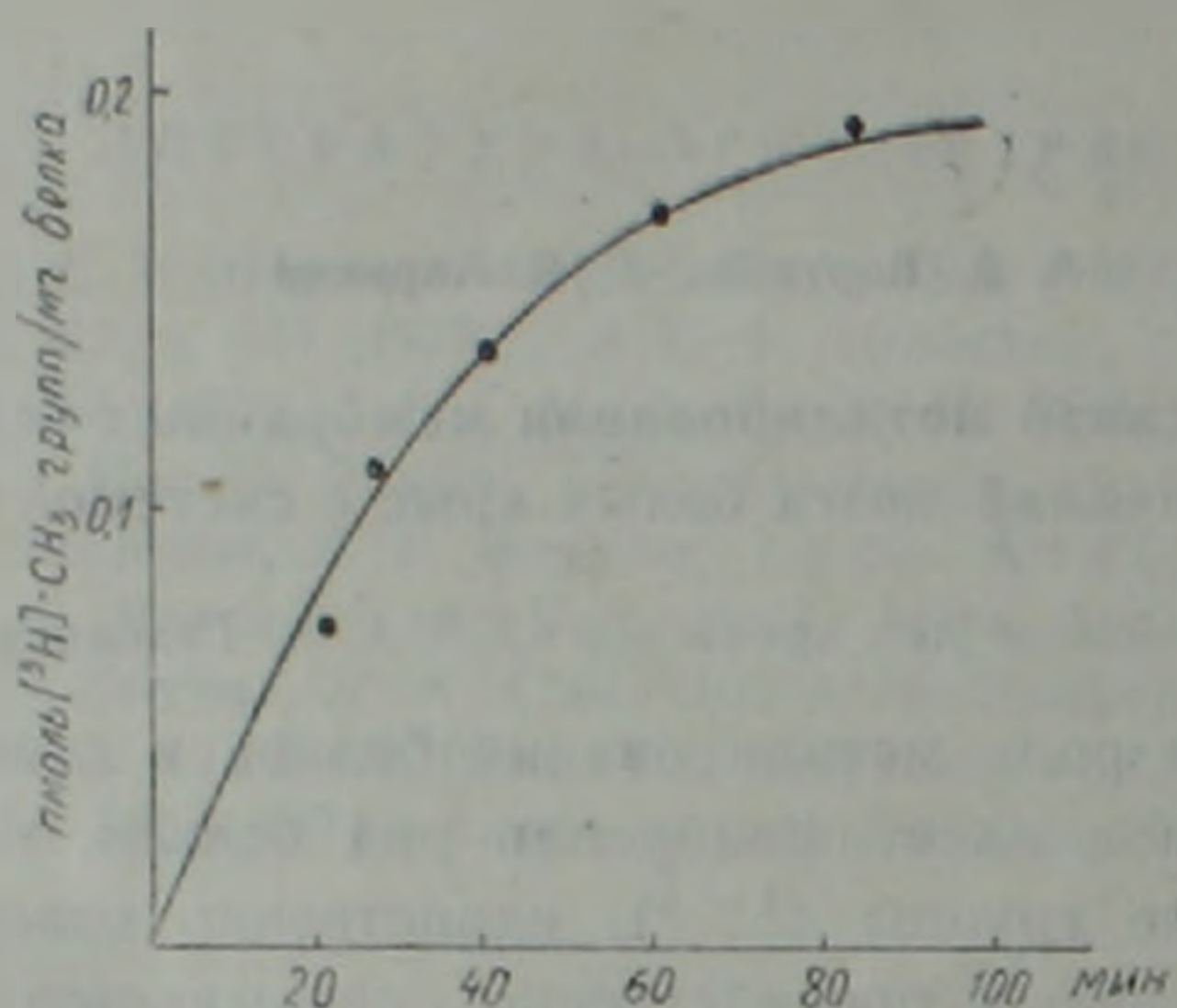


Рис. 1. Зависимость включения $[^3\text{H}]$ -метильных групп в ТХУ-нерастворимые белки интактных синапсом мозга белых крыс от времени. Инкубационная смесь содержала в 100 мкл 0,25М Na_2 -фосфатного буфера, pH 7,23, 0,5 мкКюри $[^3\text{H}]$ -SAM и 100 мкг белка

натной температуре, тем не менее оно оставалось незначительным. И тогда приняв за основу широко освещенный в литературе метод получения пермеабелизованных клеток (⁸), мы попытались получить синапсомы, мембраны которых становились проницаемыми для SAM. Понятно, что в данном случае вопрос о том, существует ли в нервных окончаниях мозга мембранно-связанный фермент или цитозольный фермент метилирует мембранные белки, терял свою актуальность, так как инструмент исследований, выбранный нами, позволил приблизиться к реальным условиям клетки. Экспериментальная модель, которая позволила бы выявить связь между метилированием мембранных белков и повышением уровня цАМФ, включала проникновение SAM в синапсомы с сохранением их интактности, повышение уровня цАМФ его индукторами и изменение метилирования белков вследствие возрастания концентрации цАМФ. Первые же эксперименты поставили перед нами ряд новых проблем. Известно, что SAM является донором метильных групп и при метилировании фосфолипидов. Поскольку исследуемая система сама по себе недостаточно простая, усложнять ее введением в пермеабелизирующий буфер ингибиторов этой реакции мы сочли нецелесообразным и попытались решить эту задачу удалением из буфера ионов магния—активаторов фосфотидилэтаноламин-N-метилтрансферазы (¹⁰). Но отсутствие ионов магния в пермеабелизирующем буфере ингибировало также практически полностью и проникновение SAM через синаптическую мембрану. Замена Mg^{2+} на Ca^{2+} или Na^+ существенно не меняла картину. Задачу удалось решить варьированием концентрации тиоловых реагентов. В процессе исследования были выбра-

ны оптимальные условия: концентрация SAM во внесинаптосомальной среде, равной 2 мМ, время выдержки синапсом мозга на холоду («cold shock») — 30 мин. На рис. 2 представлены результаты изменения метилирования мембранных белков синапсом мозга при 37°C в зависимости от времени. Можно видеть, что к 30-й мин инкубации метилирование мембранных белков нервных окончаний достигает своего максимума. Несколько непонятной остается вторая половина кривой. Изменяется ли со временем активность одной из трех метилтранс-

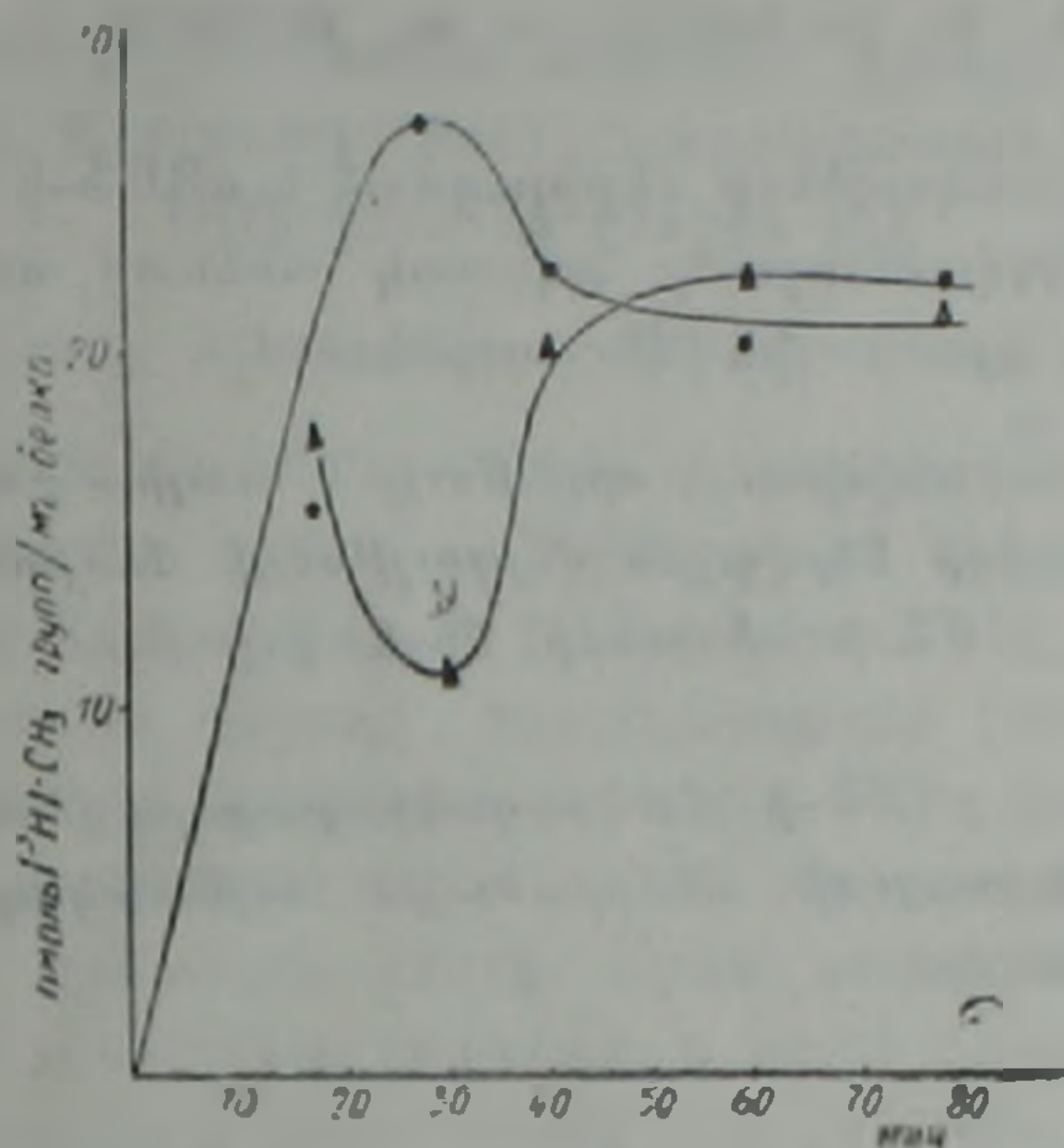


Рис. 2. Зависимость включения [^3H]-метильных групп в ТХУ-нерастворимые мембранные белки интактных синапсом мозга белых крыс от времени. 1—контроль, 2—синапсомы мозга, предварительно инкубированные с 10^{-4} М оубаина в течение 20 мин при комнатной температуре

фераз или все три несколько снижают способность ковалентно присоединять к белкам метильную группу? Не исключается также и то, что со временем активируется ферментативная система деградации метильных производных белков.

В качестве индуктора цАМФ мы использовали оубаин. Известно, что через час после связывания его со своим рецептором в синапсоммах мозга концентрация цАМФ достигает своего максимума, далее уровень этот начинает падать и приближается к норме ко второму часу. Для выявления изменений в метилировании мембранных белков нервных окончаний вследствие возрастания в них концентрации цАМФ эксперимент планировали по следующей схеме: синапсомы оставляли при комнатной температуре в течение 20 мин с 10^{-4} М оубаина для связывания с рецептором, затем выдерживали в условиях «cold shock» 30 мин и далее инкубировали в течение указанного на рис. 2 времени. Можно видеть, что метилирование мембранных белков к моменту достижения максимума уровня цАМФ снижастся. Полученные данные в некоторой степени согласуются с литературными (¹¹), где отмечается снижение на 33% активности метилтрансферазы II при воздействии на синапсомы полосатого тела мозга белых крыс 60 мМ KCl, который,

как и любой агент, вызывающий деполяризацию мембраны, способствует повышению уровня цАМФ. Таким образом, установлено, что метилирование мембранных белков нервных окончаний мозга белых крыс может явиться одним из ответов клетки на изменение уровня цАМФ.

Институт биохимии
Академии наук Армянской ССР

Ա. Ա. ՎԱՐԴԱՆՅԱՆ, Գ. Վ. ԱՊՐԻԿՅԱՆ

Մեմբրանային սպիտակուցների մեթիլացման և ցԱՄՖ-ի համակարգի
փոխկապակցվածությունը սպիտակ առնետի ուղեղի
նյարդային վերջույթներում

Մշակված է փորձնական մոդել, որը թույլ է տալիս բացահայտել սպիտակ առնետների գլխուղեղի ներվային վերջույթների մեմբրանային սպիտակուցի մեթիլացման և ցԱՄՖ-ի սինտեզի միջև գոյություն ունեցող փոխադարձ կապը:

Ցույց է տրված, որ ցԱՄՖ-ի մակարդակի բարձրացումը ուղեկցվում է սպիտակ առնետների գլխուղեղի մեմբրանային սպիտակուցների մեթիլացման պրոցեսի թուլացմամբ:

ЛИТЕРАТУРА—ԳՐԱԿԱՆՈՒԹՅՈՒՆ

- ¹ A. Sitamura, L. S. Wright, J. of Biol. Chem., v. 255, p. 8894—8901 (1980).
² Y. Kloog, D. Flynn et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., v. 97, p. 1474—1480 (1980). ³ M. N. Scanlon, I. M. Natsonkas et al. Life Science, v. 34, p. 317—322 (1984). ⁴ C. Lonstaff, R. R. Rander, Biochemistry, v. 24, p. 8137—8145 (1985). ⁵ A. D. Donato, F. Galetty et al., Biochemistry, v. 25, p. 8361—8368 (1986). ⁶ M. O. Aspilaga, I. R. McDermoff, J. of Neurochem., v. 28, p. 1247—1249 (1977). ⁷ F. Hajos, Brain Res., v. 93, p. 485—489 (1975). ⁸ N. S. Berger, G. Weber et al., Biochem. Biophys. Acta, v. 519, p. 87—101 (1977). ⁹ G. Park, W. K. Chanderkar et al., Biochem. Biophys. Acta, v. 784, p. 30—36 (1984). ¹⁰ P. Fonlupt, C. Ray et al., J. of Neurochem., v. 38, p. 1615—1620 (1982). ¹¹ M. Billingley, R. H. Roth, J. of Pharmacol and Exp. Ter., v. 283, p. 681—688 (1982).