

## Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Авижян А. Б. Физиология растений, 33, 1, 23, 1986.
2. Алевин Е. П., Федулов Ю. П., Доржиева Т. Н. и др. Докл. ВАСХНИЛ, 12, 6, 1983.
3. Андреева Т. Ф. В сб.: Физиология фотосинтеза, 89, М., 1982.
4. Водяник А. С., Водяник Т. М. Сельскохозяйственная биология, 10, 12, 1984.
5. Григорьев Ю. С., Моргул В. П., Гольц В. М. и др. Биофизика, 27, 6, 973, 1982.
6. Измайлов С. Ф., Котлярова Т. П., Смирнова А. М. Изв. АН СССР, сер. биол., 3, 366, 1983.
7. Журбицкий Э. И. Физиологические и агрономические основы применения удобрений, М., 1963.
8. Картофель. Под ред. П. С. Бацанова М., 1970.
9. Курянов А. Л. Транспорт асемяятой в растениях, М., 1976.
10. Маторин Д. Н., Венедиктов П. С., Тимофеев К. Н., Рубин А. Б. Биологические науки, 2, 35, 1978.
11. Ниловакая Н. Г., Мовсеев А. Д. Тез. докл. Всесоюз. конф.: Устойчивость к неблагоприятным факторам среды и продуктивность растений, 89, Иркутск, 1984.
12. Петербургский А. В., Асиров Х. К., Плешков Б. П. и др. Агрохимия, М., 1964.
13. Прошкин А. В. Биологические науки, 4, 90, 1973.
14. Тарчевский Н. А. В сб.: Физиология фотосинтеза, 118, М., 1982.
15. Davidian J. C., Salsac L. *Physiol. veget.*, 17, 2, 371, 1979.
16. Lavorel J., Lavergne J., Etienne A. L. *Photochem. and Photobiol.*, 3, 4-5, 287, 1982.
17. Nakatani H. Y., Farber J., Minski M. J. *Biochim. Biophys. Acta*, 541, 1, 2, 1979.
18. Volkenburch E., Boyer J. S. *Plant Physiol.*, 77, 1, 190, 1981.

Поступило 3 II 1987 г.

Биол. ж. Армении, т. 41, № 5, 1988

УДК 574.578.574.963.3.547.965

### ВЛИЯНИЕ ПРОЦЕССОВ АДФ-РИБОЗИЛИРОВАНИЯ МЕМБРАННЫХ БЕЛКОВ НА ЗАХВАТ НЕЙРОТРАНСМИТТЕРА СИНАПТОСОМАМИ МОЗГА БЕЛЫХ КРЫС

А. А. ВАРТАНЯН, Г. В. АПРИКЯН

Институт биохимии АН АрмССР, Ереван

Разработана экспериментальная модель, позволяющая выявить влияние процессов АДФ-рибозилирования мембранных белков нервных клеток на захват нейромедиаторных аминокислот. Обнаружено, что захват <sup>14</sup>C-АК, <sup>14</sup>C-ГК, <sup>14</sup>C-ГАМК нервыми окончаниями мозга ингибируется вследствие модификации некоторых мембранных белков синапсомы АДФРТ. Показано также, что в процессе АДФ-рибозилирования не вовлекаются белки, ответственные за систему транспорта ГАМК.

*Մշակվել է փորձնական մոդել, որը թույլ է տալիս հայտնաբերել նյարդային բջիչների մեմբրանային սպիտակուցների ԱԵՑ-ռիբոզիլացման պրոցեսների ազդեցությունը միջնորդանյութ ամինաթթուների կլանման վրա: Հայտնաբերվել է, որ գլխուղեղի նյարդային վերջույթների սինապտիկ մեմբրանի որոշ սպիտակուցների ԱԵՑՏ մոդիֆիկացիայի արդյունքում ճնշվում է <sup>14</sup>C-ԱԲ, <sup>14</sup>C-ԳԿ և <sup>14</sup>C-ԳԱԿԲ-ի կլանումը: Պարզվել է նաև, որ ԱԵՑ-ռիբոզիլացման պրոցեսի մեջ չեն ներգրավվում ԳԱԿՑ տրանսպորտային սիստեմի սպիտակուցները:*

Сокращения: АДФРТ—(АДФ-рибозо)трансфераза, ГАМК—γ-аминомасляная кислота, АК—аспарагиновая кислота, ГК—глутаминовая кислота, ДАМК—2,4-диаминомасляная кислота

An experimental model is worked out, which lets us to make clear the influence of the processes of ADP-ribosylation of nerve cells membrane proteins on the uptake of neuromediator amino acids. The inhibition of the uptake of  $^{14}C$ -AA,  $^{14}C$ -GA,  $^{14}C$ -GABA by brain nerve endings as a result of modification of some synaptosomal membrane proteins by ADPRT is revealed. The proteins responsible for the system of GABA transport are not involved in the process of ADP-ribosylation.

*Синапсосомы мозга—АДФРТ—γ-аминомасляная кислота—2,4-диаминомасляная кислота.*

Понимание физиологической роли модификации ключевых белков метаболизма клетки АДФРТ несколько упростилось после получения моноклональных антител к поли- и моно-АДФР, что делало возможным их качественное и количественное определение [12, 13]. Выявились очень интересные закономерности этого процесса [10]. И если первые работы в этой области были связаны с получением фермента функциональной гомогенности, изучением его физико-химических свойств, то в последние годы все больше появляется публикаций о влиянии АДФ-рибозилирования белков на различные метаболические процессы клетки [16]. На сегодняшний день, пожалуй, единственно доказанной точкой приложения АДФРТ является репарация ДНК [6, 8], хотя высказываются вполне обоснованные предположения, что АДФ-рибозилирование некоторых ядерных белков может служить запуском пролиферации и дифференцировки клеток [3, 4, 11, 17], активацией транскрипции ДНК [15]. И совершенно открытым остается вопрос о функциональной значимости АДФРТ из плазматических мембран. Ранее [2] и нами в мембранах синапсом мозга белых крыс была показана АДФРТ-активность, было обнаружено также, что активность эта возрастает в ряду: головной мозг, мозжечок, ствол мозга [1]. В предыдущих исследованиях лаборатории отмечалось снижение уровня захвата нейромедиаторных аминокислот нервными окончаниями мозга белых крыс в том же ряду (данные не опубликованы). Было вполне естественно предположить, что процесс АДФ-рибозилирования мембранных белков синапсом мозга может служить одним из звеньев в механизме ингибирования захвата нейромедиатора нервными окончаниями мозга.

В настоящей работе впервые приводятся данные о связи между модификацией мембранных белков АДФРТ и захватом нейротрансмиттера синапсосомами мозга белых крыс.

*Материал и методика.* Работа выполнена в Институте биохимии АН АрмССР, 1986—1987 гг. Активность АДФРТ определяли по ранее описанной методике [14] с незначительными изменениями. Синапсосомы, мембраны которых становились приемлемыми для НАД<sup>+</sup>, получали по несколько модифицированной методике [5]. Синапсосомы получали по Хайош [7]. Захват нейромедиаторных аминокислот синапсосомами мозга белых крыс изучали по методу Хен [9].

*Результаты и обсуждение.* Экспериментальная модель, позволяющая исследовать влияние процессов АДФ-рибозилирования мембранных белков на захват нейромедиаторных аминокислот синапсосомами мозга белых крыс, состояла из трех комплементарных участков: проникновение НАД<sup>+</sup> в синапсосомы с сохранением их интактности, модифи-

зация мембранных белков АДФРТ, изменение захвата нейротрансмиттера вследствие этой модификации. На начальном этапе была проведена серия контрольных экспериментов по выявлению оптимальных условий для проникновения  $\text{НАД}^-$  через синаптическую мембрану (зависимость от времени выдержки на холоду «cold shock», зависимость от концентрации  $\text{НАД}^+$  во внесинаптической среде, от концентрации некоторых компонентов пермеабилizующего буфера; данные не приводятся). В ходе исследований выявились оптимальные условия для этого процесса: 30 мин выдержки на холоду синапсом в пермеабилizующем буфере при концентрации  $\text{НАД}^-$  в инкубационной среде 3 мМ вполне достаточно для получения желаемого эффекта.

Из рис. 1 следует, что модель, предложенная нами, позволяет решить задачу изучения влияния процессов АДФ-рибозилирования мембранных белков на захват нейромедиаторных аминокислот синапсом мозга белых крыс.

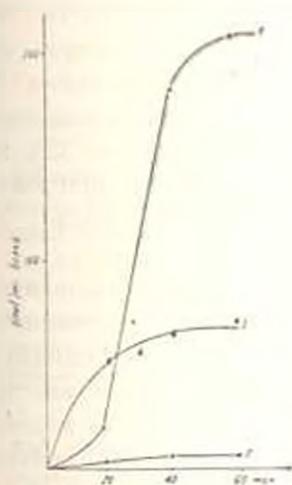


Рис. 1.

Рис. 1. Зависимость включения  $[^{14}\text{C}]$ -аланина  $\text{НАД}^-$  (1) и  $^{14}\text{C}$ -карбонил  $\text{НАД}^+$  (2) в ТХУ-нерастворимые белки синапсом мозга белых крыс. Инкубационная смесь содержала в 100 мкл 0,1 мкКю  $[^{14}\text{C}]$ - $\text{НАД}^-$ , 100 мкл свежеприготовленного синапсом мозга, 5 мМ  $\text{НАД}^+$  в буфере, описанном в «материале и методике» (3) — проникновение  $\text{НАД}^-$  в синапсомы мозга (концентрация  $\text{НАД}^-$  равнялась 0,4 мМ, остальное как в подписи к (1)).  
Рис. 2. Ингибирование захвата нейромедиаторных аминокислот АДФ-рибозилированием мембранных белков синапсом мозга белых крыс в зависимости от времени. 1 — аспарагиновая кислота, 2 — глутаминовая кислота, 3 —  $\gamma$ -аминомасляная кислота.

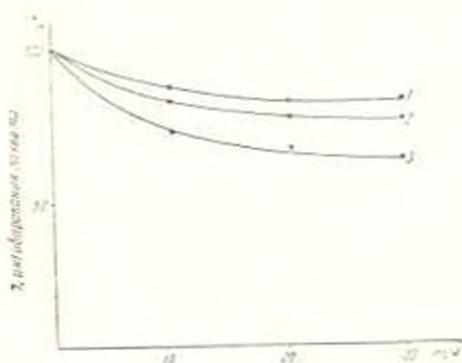


Рис. 2.

Основываясь на имеющихся в литературе данных о том, что при инкубации меченых аминокислот с синапсомы мозга при  $37^\circ$  уже к 10-й минуте достигается равновесие в процессе захвата медиатора [9], мы выбрали три интервала времени 10, 20 и 30 минут. Исследование кинетики изменения захвата нейромедиаторных аминокислот вследствие модификации мембранных белков АДФРТ показало, что через 30 мин наступает полное равновесие между этими двумя процессами (рис. 2). И если захват  $^{14}\text{C}$ -АК и  $^{14}\text{C}$ -ГК синапсомы мозга сина-

жается приблизительно на 20%, то захват  $^{14}\text{C}$ -ГАМК ингибируется более чем на 30%. Интересным оказался тот факт, что во всех трех случаях это ингибирование не превышает 30%. Это может свидетельствовать либо о существовании достаточно эффективных механизмов обратной регуляции активности АДФРТ плазматических мембран нервных клеток, либо о том, что АДФ-рибозилируемые белки, непосредственно не вовлекающиеся в систему транспорта нейромедиаторных аминокислот через синаптическую мембрану.

На следующем этапе работы мы попытались получить экспериментальное подтверждение высказанной гипотезы. Понятно, что если какой-либо конкурентный ингибитор снижает захват нейромедиаторных аминокислот до и после модификации мембранных белков АДФРТ на одну и ту же величину, то АДФ-рибозилирование не затрагивает белок-переносчик. На рис. 2 представлены результаты изучения влияния АДФ-рибозилирования белков на захват  $^{14}\text{C}$ -ГАМК синапсосомами мозга белых крыс в присутствии конкурентного ингибитора ГАМК. Видно, что при четырех выбранных концентрациях ингибитора захват  $^{14}\text{C}$ -ГАМК с модифицированными мембранами и контрольных экспериментах не меняется. Таким образом, снижение захвата синапсосомами мозга белых крыс на 20% в случае с  $^{14}\text{C}$ -АК и  $^{14}\text{C}$ -ГК и на 32% в случае с  $^{14}\text{C}$ -ГАМК лишь опосредовано влиянием АДФ-рибозилированных белков на систему транспорта нейромедиаторных аминокислот через синаптическую мембрану.

Полученные нами данные указывают на новый путь включения АДФ-рибозилированных белков в метаболизм клетки. Изучение механизмов, регулирующих захват нейротрансмиттера синапсосомами мозга с модифицированными мембранами, выявит новые возможности для исследования вопросов синаптической нейротрансмиссии на молекулярном уровне, тем самым приблизив нас к более глубокому пониманию процессов, связанных с передачей нервного импульса.

Поступило 10 XII 1987 г.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Вартанян А. А. Биолог. ж. Армении, 41, 3, 1988.
2. Фоменко А. И., Халимуратов А. Г., Степаненко С. И., Пожарин С. В. Биол. мембрана, 2, 124—128, 1986.
3. Bredehyst R., Klarpoth K., Hiltz H., Schethagen C., Gerliss C. Cell Differentiation, 9, 95—101, 1980.
4. Bredehyst R., Welken K., Rochette Igly C., Hiltz H. Eur. J. Biochem., 20, 267—274, 1962.
5. Carter S. C. ADP-Ribosylation of Proteins, Ed. Athozs A., Hiltz H., Shall S. Springer-Verlag, Berlin, 397—401, 1985.
6. Durkacz R. W., Irwin I., Shall S. Biochem. Biophys. Res. Commun., 101, 1433—1444, 1981.
7. Hajos F. Brain Res., 93, 385—489, 1975.
8. Hayutshi O., Ueda K. ADP-Ribosylation of Proteins, Acad. Press, London—New York, 148—161, 1982.
9. Hann F. A., Lamberger A. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69, 2686—2690, 1971.
10. Hiltz H., Hille S., Seyler Z. Physiol. Chem., 362, 1415—1425, 1981.

11. Ithel M., Jongstra—Ellen I., Mandel P. Biochem. Biophys. Res. Commun., 116, 428—434, 1983.
12. Kanai Y., Miwa M., Matsushima T. Nature, 274, 809—812, 1978.
13. Kanai Y., Sugimura T., Matsushima T. Biochem. Biophys. Res. Commun., 79, 300—306, 1974.
14. Lester H. A., Steer H. J., Michaelson D. M. J. of Neurochem., 35, 1080—1086, 1982.
15. Smulson M. E., Hough C., Kasid U., Dritschilo R., Lubet A. ADP—Ribosylation of Proteins, Ed. Althous A., Hiltz H., Shall S., Springer—Verlag, Berlin, 207—216, 1985.
16. Ueda K., Hayashi O. Annual. Rev. Biochim., 54, 73—100, 1985.
17. Willems G. T., Johnstone A. P. Biosci. Rep., 3, 815—830, 1983.

Поступило 10.XII 1987 г.

Бюллет. ж. Армении, т. 41, № 5, 1988

УДК 577.352.315:612.111.612.014.462.4

## ИНДУКЦИЯ $Ca^{2+}$ -H<sup>+</sup> ОБМЕННИКА ПРИ ДЕЙСТВИИ ФТОРИДА НА ЭРИТРОЦИТЫ

А. В. ГЮЛЬХАНДЯНИ

Ереванский филиал Всесоюзного научного центра хирургии АМН СССР

Добавление  $Ca^{2+}$  к суспензии клеток, инкубируемых с ингибитором гликолиза NaF, приводило к протонному всплеску и выделению  $K^+$ . В некоторых случаях, а также в присутствии глюкозы или  $Mg^{2+}$  последовательные введения  $Ca^{2+}$  вызывали серию всплесков; скорость выхода  $K^+$  при этом уменьшалась. Подсчитана  $Ca^{2+}$ -зависимая кажущаяся проницаемость при иницировании одного и нескольких всплесков. На основании опытов с монофором А32187 предполагается, что протонный всплеск обусловлен образованием  $Ca^{2+}$ -H<sup>+</sup> обменника при трансформации эритроцитов.

NaF զրկուիզի բեֆրիտորով ինկուբացված քլորիդների կախությամբ  $Ca^{2+}$  ավելացնելու շնորհիվ առաջանում է պրոտոնային նդիումը և  $K^+$  արտազատման իրոշ զեպրերում, ինչպես նաև գլյուկոզայի կամ  $Mg^{2+}$  առկայության դեպքում  $Ca^{2+}$  ներհոսքային ներթրիումները նարտում են մի շարք նդիումներ, ընդ որում,  $K^+$  արտազատման արագությունը նվազում է: Հաշվարկվում է  $Ca^{2+}$ -կախյալ կախումային հաղորդականությունը մեկ և մի բանի նդիումների ժամանակ: Ա32187 խնեֆորով կատարված փորձերը ցույց են տալիս նեֆորիտ, որ պրոտոնային նդիումը պայմանավորված է էրիթրոցիտների տրանսֆորմացիայի ժամանակ  $Ca^{2+}$ -H<sup>+</sup> փոխանակիչի գոյացումով:

The addition of  $Ca^{2+}$  to erythrocyte suspension, incubated with inhibitor of glycolysis NaF, leads to proton rebound and ejection of  $K^+$ . In some cases, as well as in presence of glucose or  $Mg^{2+}$ , the successive injections of  $Ca^{2+}$  have resulted in series of rebounds with decreased rate of  $K^+$  efflux. The  $Ca^{2+}$ -dependent potassium conductance in the initiation of one and some rebounds has been calculated. On the basis of experiments with ionophore A32187, it is supposed that proton rebounds are due to generation of  $Ca^{2+}$ -H<sup>+</sup> exchanger by transformation of erythrocytes.

Сокращения. СССР—карбониллиманитд.торфенили.лразон.