

577.15.02, 577.15., 06

© Коллектив авторов

## ИССЛЕДОВАНИЕ ЦИТОЗОЛЬНОЙ МОНОАМИНОКСИДАЗЫ ПЕЧЕНИ КРЫСЫ.

Т.А.МОСКВИТИНА, А.Е. МЕДВЕДЕВ

Институт биомедицинской химии РАМН,  
Погодинская ул., Москва, 119832, Россия, факс 245-0857.

Достигнуто разделение цитозольной и мембраносвязанных клеточных форм MAO. Полученные данные свидетельствуют об отсутствии в препаратах цитозольной формы фермента митохондриальных и микросомальных MAO, а также вновь синтезированных, связанных с рибосомами молекул этого фермента. Свойства мембраносвязанной и цитозольной форм MAO отличаются. Сродство к фенилэтиламину на порядок выше для цитозольного фермента, который проявляет более высокую чувствительность к ацетиленовым ингибиторам, чем мембраносвязанные MAO.

**Ключевые слова:** митохондрии, цитозоль, моноаминоксидаза, ингибиторы моноаминоксидазы

**ВВЕДЕНИЕ.** Моноаминоксидаза (MAO; К.Ф. 1.4.3.4) - интегральный белок внешней мембраны митохондрий - катализирует реакцию окислительного дезаминирования важнейших нейромедиаторов-моноаминов [1,2]. Фермент существует в двух формах, А и Б, каждую из которых кодирует свой ген [2]. Синтез молекул фермента осуществляется на свободных рибосомах [3], однако дальнейшая последовательность событий, приводящих к встраиванию MAO во внешние мембраны митохондрий, остается малоизученной.

Несколько групп исследователей обнаружили активность MAO А и MAO Б в микросомах [4]. Хотя значение этого факта пока совершенно непонятно, вполне возможно, что там происходит посттрансляционная модификация этих белков.

Для флавинирования фермента\* (присоединения флавиновой простетической группы к апоферменту) необходимо, чтобы ФАД присутствовал в среде изначально [5]; если добавлять его в процессе трансляции белка, то образования функционально компетентного фермента не происходит [5].

С-концевому фрагменту аминокислотной последовательности (около 28 аминокислот) MAO Б, по-видимому, принадлежит важная роль в закоривании

фермента в мембране, в то время как каталитически активные молекулы МАО А, лишенные 24 С-концевых аминокислотных остатков, все-таки могут встраиваться во внешнюю мембрану митохондрий [6].

В ряде работ сообщалось о т.н. растворимой МАО, однако данные о количестве и свойствах этого фермента противоречивы, а условия выделения не исключают возможного загрязнения цитозоля другими субклеточными фракциями [7,8,9]. Содержание растворимой МАО варьирует от 2 до 35%, сродство фермента к субстратам больше или меньше, чем у митохондриального фермента [7,10]. По данным [8], моноаминоксидазная активность растворимой фракции не тормозится специфическими ингибиторами МАО.

В настоящем сообщении моноаминоксидазная активность цитозоля обнаружена в условиях, исключающих загрязнение этой фракции митохондриями и микросомами, и показано, что введение селективного ингибитора моноаминоксидаз *in vivo* тормозит эту активность.

**МЕТОДИКА** Выделение субклеточных структур из 10% гомогената печени и мозга крыс проводили при дифференциальном центрифугировании гомогената в изотоническом растворе сахарозы при рН 7,6. Легкие и тяжелые митохондрии осаждали при 18000g в течение 20 мин, микросомы и цитозоль разделяли при 105000g в течение 2-х часов.

Активность МАО определяли радиометрически [10], используя в качестве субстратов МАО типа А 100 мкМ [<sup>14</sup>-С]-серотонин, а МАО типа В – 5 мкМ [<sup>14</sup>-С]-фенилэтиламин. В ряде экспериментов субстратом служил 100 мкМ [<sup>14</sup>-С]-тирамин. Преинкубацию со специфическими ингибиторами проводили при комнатной температуре в течение 30 мин. Активность сукцинатдегидрогеназы определяли, как описано [11]. Количество цитохрома Р450 и его инактивированной формы Р420 определяли спектрофотометрически [12]. Отделение связанного с рибосомами белка производили после обработки смесью 0,6 мМ меркаптоэтанола с пуромицином с соотношением белок:пуромицин 30:1, как описано ранее [13] и последующего центрифугирования при 105000g. Белок определяли по методу Лоури и сотр. [14]. Паргилин вводили подкожно в дозе 10 и 50 мг/кг животных за 1,5 часа до забоя. Серии сравнивали, используя критерий t Стьюдента.

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.** До сих пор ни в одной из работ [7,8,9] не приводилось строгих доказательств отсутствия в препаратах цитозольной МАО загрязнений другими субклеточными структурами. Ранее Арчаковым и соавт. [15] показана закономерность загрязнения соседними по плотности органеллами клетки при их разделении. Следовательно, свойства и само существование цитозольной формы МАО находится под вопросом. Поскольку микросомальная и митохондриальная МАО не отличаются по своим свойствам [4], то присутствие в препаратах цитозоля микросом может внести большую ошибку в суждения о цитозольной МАО. При центрифугировании гомогенатов печени и мозга крысы при 105000g в течение 1 часа действительно можно обнаружить до 10% активности МАО во фракции цитозоля. При этом сукцинатдегидрогеназной активности, маркера внутренней мембраны митохондрий, не определяется, но присутствует большое количество цитохромов, указывая на загрязнение микросомальной фракцией. Увеличение же времени центрифугирования при 105000g вдвое хотя и приводит к снижению

количества обнаруживаемой моноаминоксидазной активности, но здесь не обнаруживается следов микросомальных частиц (по тестированию цитохромов). В табл.1 приведены данные, характеризующие ферментные препараты, получаемые по предлагаемой методике из печени крысы. Видно, что цитозольная фракция в выбранных условиях не содержит маркеров мембран митохондрий и микросом. Возможное присутствие в цитозоле МАО, связанной с рибосомами непосредственно после ее синтеза, также не обнаружено, т.к. обработка цитозоля и микросом пуромицином в условиях, приводящих к отделению вновь синтезированных молекул от рибосом [13], абсолютно не сказывается на содержании цитозольной МАО (данные не представлены). Как видно из табл. 1, более жесткие условия центрифугирования, применяемые в наших опытах, позволили полностью отделить фракцию цитозольной МАО от микросомальной и митохондриальной. Последняя оказалась обогащенной фракцией микросом. Это связано с тем, что мы использовали режим центрифугирования, позволяющий осадить не только «тяжелые» (зрелые), но и «легкие» (молодые) митохондрии.

Таблица 1. Выход (%) активности МАО и белков-маркеров в различные субклеточные фракции печени крысы.

	МАО А	МАО В	СДГ	цит.Р450	цит.Р420
гомогенат	100	100	100	100	100
митохондрии	70	86	65	71	1
микросомы	5	3	12	20	81
цитозоль	1,4	3	0	0	0

Многочисленные эксперименты показывают, что выход цитозольной МАО составляет в среднем 3-5%. Цитозольный и митохондриальный ферменты различаются по своим свойствам. В случае МАО В сродство цитозольного фермента к субстрату 2-фенилэтиламину значительно выше, чем у митохондриального ( $K_m$  2,2 и 29 мкМ, соответственно). Диагностическая (для идентификации МАО Б) концентрация депренила также тормозит активность цитозольного фермента несколько сильнее, чем митохондриального (табл.2).

Таблица 2. Влияние депренила и паргилина на активность МАО митохондрий и цитозоля

Ингибитор	Условия	МАО цит	МАО мит
0,05 мкМ Депренил	инкубация <i>in vitro</i>	$62,7 \pm 2,0$	$53 \pm 1,8^*$
Паргилин	10 мг/кг, п/к	100	$58,5 \pm 6,4^*$
Паргилин	50 мг/кг, пк	100	$96,1 \pm 0,6$

Результаты представлены в виде % ингибирования по сравнению с контролем. В экспериментах с депренилом активность МАО определяли с ФЭА в качестве субстрата, а при введении паргилина крысам - с тирамином. \*  $P < 0,05$  при сравнении эффективности торможения митохондриальной и цитозольной МАО

При введении паргилина животным активность МАО в митохондриях тормозится в меньшей мере чем в цитозоле как при использовании низкой (10

мг/кг) так и высокой (50 мг/кг) дозы ингибитора (Табл.2). Последнее служит независимым подтверждением различной субклеточной локализации и свидетельствует о том, что доставка ингибитора к молекулам растворимого и мембраносвязанного фермента осуществляется различными путями.

Авторы благодарны Е. Петушковой за помощь при определении цитохромов P450.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 99-04-48968).

#### \* ЛИТЕРАТУРА.

1. Горкин В.З., Медведев А.Е. (1995) Белки и пептиды, изд. Наука, т.1, с. 83-88.
2. Shih J.C., Chen K., Ridd M. (1999) Ann. Rev. Neurosci., **22**, 197-217.
3. Weyler W.J. (1992) J. Neural. Transm. (Suppl.), **41**, 3-6.
4. Mitoma J., Ito A. (1992), **111**, 20-24.
5. Zhou B.P., Lewis D.A., Kwan S.W., Abell C.W. (1995) J. Biol. Chem., **270**(4), 23656-23660.
6. Wouters J. (1998) Curr. Med. Chem., **5**, 137-162.
7. Mayanil C.S.K., Baquer N.Z. (1984) J. Neurochem., **43**, N4, 906-912.
8. Sim K., Lim F. (1992). Biochem. Pharmacol., **43**, 1181-1184.
9. Egashita T., Zusho H., Kanemuchi S., Sho H., Kamjo K. Biochem. Exp. Biol. (1974-1975), N4, 333-341.
10. Пеккель В.А., Киркель А.З. (1985) Вopr. мед. хим., **31**, 122-125.
11. Котляр А.Б., Виноградов А.Д. (1984) Биохимия, **49**(3), 511-518.
12. Менгазетдинов Д.Э., Карузина И.И., Арчаков А.И. (1989) Биохимия **54**(7), 1102-1107.
13. Берман А.Е., Замараева Т.В., Мазуров В.И. (1972). Молек. биол., **6**(5), 632-638.
14. Lowry O.R., Rosebrough N.I., Farr A.L., Randall R.I. (1951). J. Biol. Chem., **193**, 193-201.
15. Арчаков А.И., Панченко Л.Ф., Катитанов А.Б., Эфрон И.И., Князева Т.А., Жеребкова Н.С. (1971). Цитология, **13**(7), 887-894., 3407-3413.

Поступила 22.11.99.

#### STUDY ON MONOAMINE OXIDASE FROM RAT LIVER CYTOSOL

T.A. MOSKVITINA, A.E. MEDVEDEV

Institute of Biomedical Chemistry, Russian Academy of Medical Sciences,  
10 Pogodinskaya street, Moscow, 119832 Russia, fax: (095)245-0857

Cytosolic and particulate monoamine oxidases have been isolated. Cytosolic preparation was free from mitochondrial and microsomal contaminations and also ribosome-bound MAO molecules. Cytosolic MAO had higher affinity for phenylethylamine and exhibited higher sensitivity to acetylenic inhibitors than the mitochondrial enzyme.

**Key Words:** mitochondria, cytosol, monoamine oxidase, monoamine oxidase inhibitors