ՀԱՅԱՍՏԱՆԻ ԿԵՆՍԱԲԱՆԱԿԱՆ ՀԱՆԴԵՍ
БИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ АРМЕНИИ
XXXIV, 4, 405—409, 1981

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

УДК 612.017.1

СИНТЕЗ БЕЛКА GP-350 В МОЗГЕ ИНБРЕДНЫХ КРЫС ПРИ ОБУЧЕНИИ

К. Б НАЗАРЯН

Ключевые слова: гликопротеид Gp-350, обучение.

Сиалогликопротеид GP-350 впервые был выделен и описан Ван Амеронгеном и соавт. [13, 14]. Этот нейроспецифический белок, локализованный в цитоплазме нейронов и синаптических мембранах, найден во всех структурах мозга теленка и крысы. Его функция, как и функции других белков, уникальных для нервной ткани, неизвестна. Однако в ряде работ указывается, что нейроспецифические белки S-100, 14—3—2, 10B, 11A могут иметь непосредственное отношение к процессам обучения и памяти. Показано, например, увеличение содержания S—100 и 14—3—2 в гиппокампе крыс при выработке пищевых и оборонительных условных рефлексов [1, 5]. С другой стороны, Богоч [5], Попов и соавт. [11] отмечают важную роль гликопротеидов при обучении.

Целью настоящей работы являлось изучение синтеза нейроспецифического белка GP—350 при выработке кожно-оборонительного условного рефлекса в коре головного мозга у инбредных крыс генетически различных линий с неодинаковой способностью к обучению в Т-образном лабиринте.

Материал и методика. В опытах использовались крысы-самцы инбредных линий WAG/G Sto и August/Lac Sto с массой 150±10 г. В группе контроля было по 12 животных каждой линии (по 4—«пассивный», по 8—«активный» контроль), в опытной—8 крыс. Животные группы «пассивного» контроля не получали никаких раздражений, а «активного»—получали такое же количество ударов тока и вспышек света, что и крысы опытной группы, но несочетанно. Выработку кожно-оборонительного условного рефлекса проводили по ранее описанной методике однодневного обучения [2]. За 10 мин до начала воздействий крысам вводили внутрибрюшинно по 0,3 мл ^{3}H-глюкозамина (Amersham, Англия) с удельной активностью 1 мк/мл. Через 1 и 2 ч после его введения крыс декапитировали и быстро выделенные ткани коры мозга гомогенизировали в 9 об. (об./вес) 0,32 М сахарозы и 0,005 трис-HCl, pH 7,5, гомогенат центрифугировали 60 мин при 100000 g и супернатант лиофилизировали. Обессоленные на сефадексе G-25 белки супернатанта фракционировали методом диск-электрофореза в 7,5%-ном полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия по Вауган [15]. На каждый гель наслаивали по 500 мкг белка, содержание которого определяли по Лоури. После электрофореза гели окрашивали по Фербэнксу и соавт. [6], денситометрировали на приборе Chromascan (Joyce-Loebl, Англия) и фотографировали. Затем заморо-

женные гели разрезали на диски толщиной 3 мм, высушивали в сцинтилляционных флаконах в течение суток и деполимеризовали при 37° 6 ч в 0,3 мл смеси 30%-ного H_2O_2 и насыщенного NH_4OH, в соотношении 99:1. Во флаконы наливали по 10 мл сцинтилляционной смеси состава: 3 г PPO, 257 мл тритона X-100, 37 мл этилен гликоля, 106 мл этанола и до 600 мл ксилола (смесь изомеров). Радиоактивность определяли на счетчике Mark II (Nuclear Chicago, США), эффективность счета составляла 40%. Каждый флакон считали по 10 мин. Результаты обрабатывали по t-критерию Стьюдента.

Результаты и обсуждение. В мозге основная часть ^{3}H-глюкозамина включается в углеводы в виде глюкозамина (60%), сиаловых кислот (20%) и небольшая часть—в виде галактозамина, нейтральных сахаров и т. д. [4, 7]. Следовательно, можно считать, что ^{3}H-глюкозамин практически полностью включается в состав белков и других соединений, содержащих углеводный компонент. При определении содержания радиоактивной метки в срезах полиакриламидного геля через 1 и 2 ч после введения оказалось, что главный пик активности соответствует полосе белка с подвижностью GP-350 (рис. 1). Зону, соответствующую

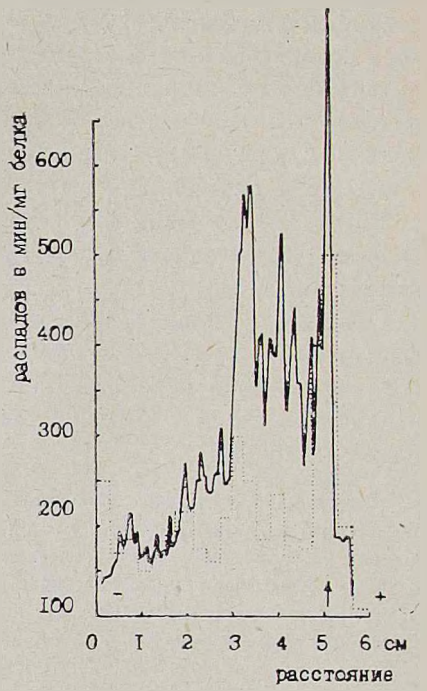


Рис. 1. Денситограмма белков (———) и радиограмма гликопротеидов (. . .) электрофоретического разделения растворимой фракции белков коры мозга крысы. По оси абсцисс—расстояние от катодного конца геля, по оси ординат—радиоактивность срезов (распады/мин/мг белка). Стрелка показывает положение зоны белка с подвижностью GP-350.

белку GP-350 на электрофореграмме гомогената ткани коры мозга, определяли, сопоставляя ее с электрофореграммой очищенного белка GP-350. Электрофоретическая подвижность последнего равна таковой преальбуминовой фракции, что находится в хорошем соответствии с результатами Ван Амеронгена [13, 14]. Как видно из рис. 2, через 2 ч после инъекции глюкозамина его включение в зону с подвижностью GP-350 достоверно повышено по сравнению с «активным» контролем у крыс обеих линий. На это же время приходится максимум включе-

ния ^{3}H-глюкозамина в белок GP-350 из растворимой фракции белков мозга крысы [13]. В мозге у крыс линии August включение повышается на 35% ($p<0{,}001$), а линии WAG—на 14% ($p<0{,}005$). Подобная тенденция наблюдается и через 1 ч после введения радиометки, однако в этом случае прирост радиоактивности по сравнению с контролем

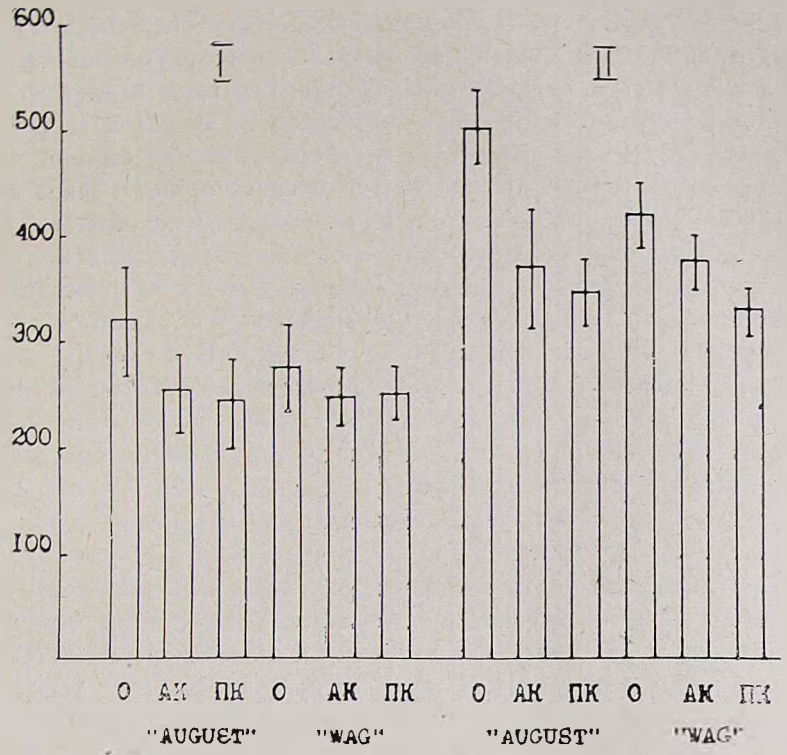


Рис. 2. Гистограмма радиоактивности (число распадов/мин/мг белка) зоны с электрофоретической подвижностью GP-350 через 1 и 2 ч после введения ^{3}H-глюкозамина. О—обученные крысы, АК—«активный» контроль, ПК—«пассивный» контроль.

гораздо меньше, и он статистически недостоверен у крыс линии WAG. Кроме того, оказалось, что в тканях коры мозга обученных крыс линии August в зону белка GP—350 включается больше ^{3}H—глюкозамина, чем у обученных крыс линии WAG. «Пассивный» и «активный» контроли обеих линий также различаются по удельной радиоактивности белка GP-350, что говорит об активации его биосинтеза и при неспецифических воздействиях, но при этом не наблюдается межлинейных различий.

Эти результаты находятся в хорошем соответствии с данными Хидена [9] о включении меченых аминокислот в кислые белки мозга крыс линии Wistar. Им были использованы две специально выведенные группы животных этой линии, хорошо и плохо обучающиеся в Т-образном лабиринте. У хорошо обучающейся группы при сравнении с контролем обнаружена высокодостоверная разница включения радиомет-

ки в некоторые кислые белки (с электрофоретической подвижностью, соответствующей нейроспецифическому белку 14—3—2) коры и гиппокампа. У плохо обучающейся линии такие различия были недостоверны. В предыдущей работе нами показано, что крысы линии August достигают критерия выработки кожно-оборонительного условного рефлекса значительно быстрее (в среднем через 14 побежек), чем крысы линии WAG (42 побежки). Сопровождающий выработку рефлекса повышенный уровень РНК, возможно, обуславливает усиление белкового синтеза и в первую очередь—нейроспецифических белков (GP-350, S-100, 14—3—2), который сильнее выражен у хорошо обучающейся линии August [2]. В этом смысле очень интересными представляются данные Шашова [12], показавшего усиление синтеза трех белков α-, β- и γ-растворимой фракции мозга золотых рыбок при обучении новому навыку, причем не обнаруженных в других органах. Такое усиление синтеза сопряжено с увеличением содержания РНК. Исходя из седиментационных характеристик синтезированного de novo РНК, удалось показать, что синтезируется в основном мРНК, которая может служить, по предположению автора, матрицей для специфических белков, интенсивно синтезирующихся при обучении. Сходные данные получил Богоч [5] при тренировке голубей. Он показал, что синтез глиального нейроспецифического белка 10 В в мозге зависит от «количества обучения» и сильнее активируется у хорошо обучающихся птиц, по сравнению с контролем, чем у плохо обучающихся.

Статистически достоверное повышение включения ^{3}H-глюкозамина в белок GP-350 при обучении крыс свидетельствует о том, что последний вовлечен в процессы, связанные с механизмами формирования и фиксации временных связей. Ограниченный выбор сроков определения включения метки в белок GP-350, связанный с техническими трудностями, к сожалению, не позволяет говорить, с какой стадией собственно выработки или консолидацией рефлекса сопряжен максимум синтеза этого белка у обученных крыс. Вполне вероятно, что GP-350—белок с нейрональной локализацией, синтезируясь в цитоплазме, переносится в составе быстромигрирующего компонента аксоплазматического тока в синапс, где участвует в повышении синаптической проводимости, которая, по современным представлениям, может являться определяющей в механизмах долговременной памяти [3]. Действительно, по данным Ван Амеронгена [3], в нейронах существует два пула GP-350. Первый, составляющий 70% от его общего содержания, растворим в воде и локализован в цитоплазме, второй (30%) связан с мембранами синаптосом. Накопление этого белка в синапсах может привести к встраиванию дополнительных молекул его в синаптическую мембрану и либо к сужению синаптической щели, либо к усилению рецепторных свойств постсинаптической мембраны и повышению синаптической проводимости.

Институт экспериментальной биологии АН Армянской ССР,
Институт психиатрии АМН СССР

Поступило 7.V 1980 г.

GP-350 ՄԳԻՏԱԿՈՒՅԻ ՍԻՆԹԵԶԸ ԳՇԱՅԻՆ ԱՌՆԵՏՆԵՐԻ ՈՒՂԵՂՈՒՄ ՍՈՎՈՐԵՑՆԵԼԻՍ

Կ. Բ. ՆԱԶԱՐՅԱՆ

ՅՀ-գլյուկոզամինի ներառումը GP-350 սպիտակուցի կազմում հավաստիորեն մեծանում է սովորեցրած գծային առնետների մոտ՝ «ակտիվ» կոնտրոլի համեմատությամբ։ Օգտագործված August և WAG գծերի առնետներն ավելի քան երկու անգամ տարբերվում էին T-նման լաբիրինթոսում ռեֆլեքսի առաջացման արագությամբ։ Ցույց է տրված, որ ՅՀ-գլյուկոզամինի ներառման ակտիվացումը August գծի առնետների մոտ, որոնք արագ են սովորում T-նման լաբիրինթոսում, ավելի ցայտուն է արտահայտված (35% «ակտիվ» կոնտրոլի համեմատությամբ), քան WAG գծի առնետների մոտ (14%)։

ЛИТЕРАТУРА

1. *Клементьев Б. И., Гринкевич Л. Н., Глущенко Т. С., Репин В. С., Певзнер Л. З.* Докл. АН СССР, *221*, 243, 1975.
2. *Назарян К. Б., Митрофанов И. И., Сальников В. В.* Бюлл. экспер. биол., *83*, 649, 1977.
3. *Розанов С. И.* Ж. общ. биол., *34*, 872, 1973.
4. *Barondes S. H.* Nature, *205*, 18, 1965.
5. *Bogoch S.* Biol. Psych., 9, 73, 1974.
6. *Fairbanks G., Steck T. L., Wallach D. F. H.* Biochemistry, *10*, 2606, 1971.
7. *Haywood P., Barondes S. H.* Brain Res., *57*, 397, 1973.
8. *Hyden H., Lange P. W.* Proc. Natl. Acad. Sci USA, *65*, 898, 1970.
9. *Hyden H., Lange P. W., Seyfried C.* Brain Res., *61*, 446, 1973.
10. *Pande C. V.* Anal. Biochem., *24*, 25, 1976.
11. *Popov N., Rüthrich H.—L., Pohle W., Schulzeck S., Matthies H.* Brain Res., *101*, *295*, 1976.
12. *Shashoua V. E.* Brain Res., *111*, 347, 1976.
13. *Van Amerongen A., Fewerda W., Roukema P. A.*, J. Neurochem., *23*, 405, 1974.
14. *Van Amerongen A., Van Den Eijnden D., Hijlman J., Roukema P.* J. Neurochem. *19*, 2195, 1972.
15. *Vaughan W. J., Fliesles S. J.* J. Neurochem., *23*, 279, 1974.