

ВНЕКЛЕТОЧНЫЕ ЦИКЛИЧЕСКИЕ НУКЛЕОТИДЫ В ГОЛОВНОМ МОЗГЕ

Г. Г. ГАЛСТЯН, Р. А. ЗАХАРЯН, Г. С. ХАЧАТРЯН

Институт экспериментальной биологии АН Армянской ССР,
лаборатория нуклеиновых кислот, Ереван

Аннотация — Установлено, что внеклеточный cAMP в нейронах и глиальных клетках головного мозга в основном стимулирует синтез рРНК, а cGMP — синтез гяРНК. Глиальные клетки являются предпочтительным местом первичного действия внеклеточных циклических нуклеотидов. Их влияние на метаболизм клеток головного мозга реализуется в результате взаимодействия с рецепторами на внешней поверхности плазматических мембран. Рецепторы идентифицированы фотоаффинным маркированием.

ՍԵՑԻՈՂԻՅԱ — Փարզվել է, որ գլխուղեղի նեյրոններում և գլիալ բջջերում cAMP գլխավորապես խթանում է ռՆԻՔ-ի սինթեզը, իսկ cGMP-ն՝ նեյրոգլիա կորիզային ՌՆԲ-ի սինթեզը: Գլիալ բջջերը նաեղխանում են արտաբջջային ցիկլիկ նուկլեոտիդների նախնական ազդեցության նախընտրելի տեղը: Նրանց ազդեցությանը գլխուղեղի բջջերը փոխանակության վրա միջնորդվում է ջրաուլալազմայի թաղանթի արտաբև մակերևուի վրա գտնվող սեղանոտորների հետ փոխազդեցությանը: Ռեցեպտորները նույնազգել են ֆոտոաֆինային նշանակ:

Abstract — It was established that exogenous AMP in neurones and glial cells mainly stimulated the synthesis of rRNA, and cGMP promoted the synthesis of nonribosomal forms of RNA. It was supposed that the initial place of action of exogenous AMP and cGMP were the cells of neuroglia. Their action was realized in the result of the interaction with receptors on the surface of plasmatic membranes. The receptors were identified by photoaffine marking.

Ключевые слова: мозг головной, внеклеточные циклические нуклеотиды, нейроны, глиальные клетки, РНК, РНК-полимераза.

Известно, что циклические нуклеотиды у высших животных служат важными внутриклеточными модуляторами и участвуют в трансформации физиологического, в частности гормонального, сигнала, получаемого клеткой извне [17, 18]. А исследования последних лет показали, что в некоторых тканях млекопитающих циклические нуклеотиды наряду с функцией внутриклеточного проводника сохраняют и свою эволюционно более древнюю внеклеточную функцию, т. е. принимают непосредственное участие в системе межклеточных взаимодействий [3—6]. Эта функция реализуется как их взаимодействием с поверхностными рецепторами [3, 9], так и поступлением внутрь клеток [5, 6]. Очевидно, вопрос о механизме действия внеклеточных циклических нуклеотидов может быть решен для каждой ткани в отдельности.

Обнаруженные ранее факты эффекторной активности внутриклеточно введенных циклических нуклеотидов [7, 8] побудили нас более подробно исследовать их возможную роль внеклеточных сигналов для клеток головного мозга. Неоднородность клеточного построения

головного мозга обусловила раздельное изучение его основных составных элементов—нейронов и глиальных клеток.

Материал и методика. Работа выполнена в 1984 г. Эксперименты проводили на белых беспородных 3—4-недельных крысах-самцах. В работе использовали сАМР, сGMP, аденозин, 5'-АМР, дибутрил-сАМР, дибутрил-сGMP, АТР, ГТР, СТР, УТР, уридин, спермидин (Sigma, США), фикол, сефарозу 4В, В-СН-активированную сефарозу (Pharmacia, Швеция), набор для электрофореза в ПААГ, 1,6-дигидроксилап, дифениламин (Serva, ФРГ), [^3H] сАМР—28 Ки/мМ, [^3H] сGMP—28 Ки/мМ, [^{14}C] оротовую кислоту—40,5 мКи/мМ, [^{14}C] УТР—232,5 мКи/мМ, [^3H] уридин—28 Ки/мМ (Amersham, Англия). Остальные реактивы—отечественного производства.

При определении скорости усвоения предшественника *in vivo* животным *in vivo* вводили 100 мКи оротовой кислоты, а через 30 мин—50 мкг исследуемого вещества. После 30 мин инкубации животных усыпляли уретаном и быстро замораживали в жидком азоте. РНК-полимеразную активность ядер определяли после 20 мин инкубации. Обогащенные фракции нейронов и глиальных клеток выделяли по модифицированному методу Бломстрада и Хамбергера [11]. Субклеточное фракционирование и очистку ядер проводили по модифицированной прописи [7]. Активность I и II форм РНК-полимеразы определяли по методу [2] при разных ионных силах и pH. Определяли в частности РНК [7], ДНК [12] и белка [15]. Синтез РНК в изолированных клетках головного мозга изучали в 1 мл смеси, содержащей 38 мМ трис-НСl буфера (pH 7,4), 2 мМ Na фосфатного буфера (pH 7,4), 120 мМ NaCl, 5 мМ KCl, 1 мМ MgCl₂, 1,8 мМ CaCl₂, 10 мМ глюкозы, 50 мкм меченого уридина, 0,35 мкм меченого уридина и aliquоту клеток из расчета 450—500 мкг по белку. сАМР и сGMP добавляли до конечной концентрации 10^{-7} М, а их дибутрил аналоги— 10^{-5} М. Реакцию проводили при 35° в течение 30 мин и останавливали добавлением равного объема 10%-ного раствора ТХУ. При определении активности РНК-полимеразы объем смеси увеличивали до 2,5 мл, а количество клеток—до 1,5 мг по белку. Смесь (без уридина) инкубировали 20 мин, реакцию останавливали во льду добавлением 5 мМ ЭДТА.

Синтез 8-аминоклеточамино производных сАМР и сGMP и их связывание с В-СН-активированной сефарозой проводили по прописи [15]. Концентрация иммобилизованных сАМР и сGMP в реакционной смеси (объем смеси—2,5 мл, количество клеток—1,5 мг по белку) составляла 10^{-7} М. После инкубации отделение клеток от частиц аффинной сефарозы проводили в холодных условиях пропусканием смеси через колонку с нейлоновым фильтром в присутствии 10^{-4} М сАМР или сGMP, 0,25 М NaCl и 5 мМ ЭДТА. Флюороаффинное маркирование проводили по методу [10]. Маркированные белки идентифицировали по специфической радиоактивности после электрофореза, а ПААГ в присутствии ДЭС-Na.

Весь неврологический материал (15—20 животных, 5—6 экспериментов в каждой серии) обрабатывали статистически по Стьюденту-Фишеру.

Результаты и обсуждение. Изменение синтеза РНК является одним из наиболее общих показателей глубоких метаболических перестроек клеток. Ранее было показано, что фракция яРНК, условно обозначаемая как яРНК I типа, по своему составу принадлежит ГЦ типу и является предшественником рРНК. яРНК II типа характеризуется ДНК-подобным составом, часть этой РНК служит предшественником мРНК [7].

Как показали проведенные исследования, внутринтеринальное введение сАМР и сGMP значительно стимулирует синтез практически всех изучаемых типов РНК в клетках головного мозга (табл. 1). При этом при действии сАМР как в нейронах, так и глиальных клетках в большей степени стимулируется синтез рРНК—активность I формы РНК-полимеразы, ответственной за синтез рРНК, а также удельная радиоактивность яРНК I типа и РНК из микросомной фракции по срав-

Таблица 1. Влияние внеклеточных сАМР и сГМР на синтез РНК в нейронах и глияльных клетках головного мозга

Иссле- туемое вещество	Усвоение предшественника, нмг мин мкг РНК				РНК-полимеразная ак- тивность ядер, пМ [¹⁴ C] сГМР/мг ДНК	
	яРНК I типа	яРНК II типа	микросом- ная фрак- ция	цитозоль	I форма РНК-поли- меразы	II форма РНК-поли- меразы
Нейроны						
Контроль	25572±2237	21636±2034	7015±638	2082±211	109.6±10.53	295.4±29.72
сАМР	52701±6444	35715±4381	15894±1965	3580±465	235.6±30.45	416.5±47.53
P*	< 0.01	= 0.01	< 0.01	= 0.02	< 0.01	< 0.1
сГМР	33276±3650	38570±4085	11025±1453	2681±53	139.2±16.42	439.3±48.15
P	= 0.2	< 0.01	< 0.05	= 0.1	< 0.2	< 0.05
Глияльные клетки						
Контроль	19225±1634	17485±1923	5617±515	1565±196	75.2±8.05	198.4±19.58
сАМР	42365±5248	28150±3096	13593±1644	3255±348	147.5±15.12	307.5±33.54
P	< 0.001	= 0.01	= 0.001	= 0.01	< 0.01	< 0.05
сГМР	27735±4360	32207±3018	10845±1037	2195±234	94.7±10.32	408.7±51.55
P	< 0.1	= 0.001	< 0.1	< 0.1	< 0.2	< 0.01

Примечание: * — достоверность.

нению с контролем повышаются более чем в два раза. Примерно на 80—100% повышается также удельная радиоактивность цитозольной РНК, основную часть которой составляет яРНК. При этом активность II формы РНК-полимеразы, ответственной за синтез мРНК, повышается всего на 40—50%. сГМР, в отличие от сАМР, в обеих клеточных фракциях главным образом стимулирует синтез мРНК — активность II формы РНК-полимеразы в нейрональных ядрах по сравнению с контролем повышается примерно на 50%, а в глияльных ядрах — более чем в два раза. По сравнению с другими фракциями РНК более значительным представляется и увеличение удельной радиоактивности яРНК II типа. В целом сАМР является более активным стимулятором синтеза РНК и клетках головного мозга, чем сГМР. Учитывая высокую фосфодиэстеразную активность спинномозговой жидкости, для контроля мы проводили эксперименты по изучению действия продуктов гидролиза сАМР-5'-АМР и аденозина на синтез РНК в клетках головного мозга. Полученные результаты дали основание заключить, что эффективная роль внутриклеточно введенных циклических нуклеотидов обусловлена именно их циклической структурой.

Примечательно, что изменения в синтезе РНК в нейронах и глияльных клетках головного мозга под действием соответствующих циклических нуклеотидов практически одинаковы. Можно предположить, что нейроны и глияльные клетки идентичным механизмом реагируют на действие внеклеточных циклических нуклеотидов. С другой стороны, можно предположить, что ответ одного типа клеток является производным от другого. Исследование кинетики усвоения меченого предшественника не внесло ясности в этот вопрос. Первые изменения в синтезе

РНК регистрируются через 8—10 мин после введения циклических нуклеотидов, причем одновременно в обеих клеточных фракциях.

Для выяснения особенностей взаимодействия внеклеточных циклических нуклеотидов с нейронами и глиальными клетками были проведены эксперименты по изучению их действия на синтез РНК в изолированных клетках. Как видно из данных табл. 2, характер изменений синтеза РНК в изолированных глиальных клетках при действии как свободных, так и иммобилизованных сАМР и сГМР практически не отличается от такового в экспериментах *in vivo*. При этом свободный сАМР способствует повышению активности I формы РНК-полимеразы более чем на 50%, тогда как активность II формы повышается всего на 20%. Внеклеточный сГМР стимулирует только активность II формы РНК-полимеразы. Примерно такие же изменения выявляются при действии иммобилизованных сАМР и сГМР. Правда, практически во всех случаях иммобилизованные циклические нуклеотиды оказывались менее активными стимуляторами синтеза РНК, чем свободные.

При действии внеклеточных циклических нуклеотидов в изолированных нейронах выявляются только изменения скорости усвоения меченого предшественника без изменения РНК-полимеразной активности ядер. При этом сАМР усиливает, а сГМР ингибирует усвоение [³H] уридина. Тут следует отметить, что в процессе препарирования клетки головного мозга неизбежно повреждаются, причем нейроны — в большей степени. В обогащенной нейрональной фракции часть нейронов лишена нервных окончаний. Можно предположить, что, лишившись нервных окончаний, они теряют способность адекватно реагировать на действие внеклеточных циклических нуклеотидов. Тем не менее сравнение полученных результатов с некоторыми литературными данными [13, 14] дает основание предположить, что глиальные клетки служат местом первичного действия внеклеточных циклических нуклеотидов.

Известно, что дибутирил производные сАМР и сГМР проникают внутрь клеток, и, ингибируя фосфодиэстеразу, способствуют повышению внутриклеточной концентрации циклических нуклеотидов [1]. Как видно из данных табл. 2, дибутирил-сАМР и -сГМР способствуют повышению РНК-синтезирующей активности как нейрональных, так и глиальных ядер, при этом во всех случаях в большей степени стимулируется активность II формы РНК-полимеразы. Сравнение этих результатов с данными, характеризующими действие иммобилизованных сАМР и сГМР, дает основание предположить, что клетки головного мозга имеют поверхностные рецепторы к внеклеточным сАМР и сГМР. В то же время у нас нет оснований исключить возможность поступления части внеклеточных циклических нуклеотидов внутрь клеток как *in vivo*, так и *in vitro*. Более того, можно предположить, что действие сГМР на скорость усвоения предшественника изолированными нейронами обусловлено его поступлением внутрь клеток (табл. 2).

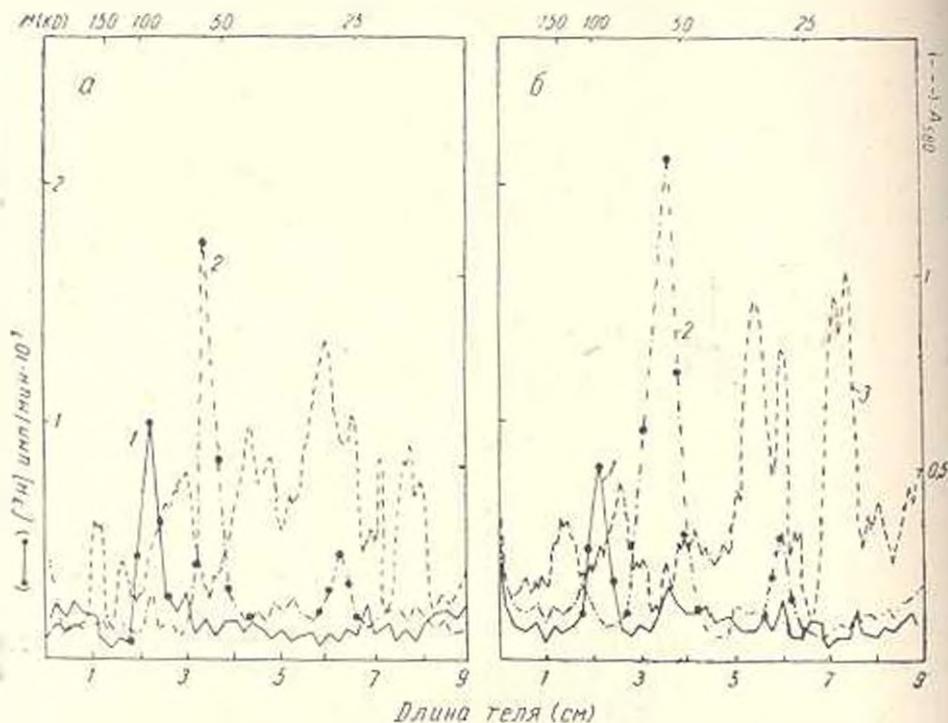
Мы попытались идентифицировать рецепторы внеклеточных циклических нуклеотидов прямым фотоаффинным маркированием. Как видно из рисунка, сАМР в обеих фракциях связывается с белком, молекулярная масса которого составляет 55 кД, а сГМР — с белком 75 кД.

Таблица 2. Влияние внеклеточных сАМР и сОМР и их аналогов на синтез РНК в нейронах и глиальных клетках головного мозга

Исследуемое вещество	Нейроны				Глиальные клетки	
	усвоение предшественника, нмп/милл мкг ДНК	РНК-полимеразная активность ядер, пМ [¹⁴ C] УМР мкг ДНК		усвоение предшественника, нмп/милл мкг ДНК	РНК-полимеразная активность ядер, пМ [¹⁴ C] УМР мкг ДНК	
		I форма РНК полимеразы	II форма РНК полимеразы		I форма РНК полимеразы	II форма РНК полимеразы
Контроль	2035±217	91.5±9.17	250.3±26.05	5274±596	73.7±7.52	189.5±18.19
сАМР	2240±367	105.7±13.41	352.5±25.36	10197±1549	114.5±13.05	232.1±20.18
Р*	<0.5	н. д.	н. д.	<0.05	0.05	<0.2
сОМР	1675±215	98.5±11.35	273.7±30.61	7545±674	79.2±9.45	201.4±28.12
Р*	<0.5	н. д.	н. д.	<0.05	0.05	<0.1
Дибутирин сАМР	3722±385	125.2±13.44	352.9±38.15	9402±921	96.5±11.14	344.1±38.57
Р*	<0.05	<0.2	<0.2	<0.02	0.3	<0.05
Дибутирин сОМР	2687±255	123.9±11.63	430.7±48.21	8270±946	102.7±12.31	294.7±28.05
Р*	<0.5	<0.2	<0.05	=0.05	0.2	<0.1
сАМР сефароза	2367±248	—	—	6470±706	105.2±11.57	248.6±25.70
Р*	<0.5	—	—	0.2	0.2	<0.5
сОМР-сефароза	2098±235	—	—	5986±615	84.5±9.25	264.1±27.46
Р*	н. д.	—	—	<0.2	н. д.	<0.2
Сефароза 4В	19.5±217	84.5±9.35	241.7±28.51	4765±524	79.4±8.93	205.8±21.65

Примечание. * - в качестве контроля принимается действие сефарозы 4В

Хотя эти величины хорошо соответствуют молекулярным массам регуляторных субъединиц сАМР- и сGMP-зависимых протеникиназ, у нас нет других доказательств их идентичности.



Фотоаффинное маркирование глиальных клеток (а) и нейронов (б). 1—сАМР; 2—сGMP. Электрофорез проводили в присутствии ДДС-Na и 10% ПААГ. Гель маркировали стандартным набором метчиков.

Полученные результаты могут пролить свет на некоторые стороны взаимодействия нейронов и глиальных клеток головного мозга. Внеклеточные циклические нуклеотиды, основным источником которых в спинномозговой жидкости являются поступления из нейронов, воздействуют на глиальные клетки, которые в свою очередь оказывают влияние на нейроны.

ЛИТЕРАТУРА

1. Васильев В. Ю., Гуляев Н. Н., Севарин Е. С. Ж. Всесоюз. хим. об-ва им. Менделеева, 20, 306—322, 1975.
2. Гаузе Л. Н., Экизаидови В. К., Кафиани К. А. Биохимия, 45, 1017—1026, 1980.
3. Исаев Э. И. Тез. докл. II Всесоюз. симп. «Циклические нуклеотиды», Ташкент, 1978.
4. Салганик Р. И. Тез. I Всесоюз. симп. «Циклические нуклеотиды», Красноярск, 1976.
5. Федоров Н. А. Укр. биохим. журн. 53, 63—70, 1981.
6. Федоров Н. А., Корешкова Н. А., Стенанова С. Б., Гуляев Н. Н. Докл. АН СССР, 250, 250—252, 1980.
7. Хачатрян Г. С. Биохимия нуклеиновых кислот и высшие функции головного мозга. Ереван, 1981.

- в. Хачатрян Г. С., Бахуцц Г. Г. Биолог ж. Армения, 38, 222—227, 1985.
9. Amana F., Kitagawa T., Akamatsu L. Cell. Struct. and Funct., 8, 459—463, 1963.
10. Antonoff R. S., Fergusson J. J. J. Biol. Chem., 229, 3319—3321, 1974.
11. Blomstrand C., Hamberger A. J. J. Neurochem., 16, 1401—1407, 1969.
12. Burton K. Biochem. J., 62, 315—323, 1956.
13. Chang R. S. L., Tran N. T., Podaslo S. E., Snyder S. H. Soc. Neurosci., 4, 511, 1978.
14. Henn F. A. Adv. in Cell Neurobiol., 1, 379—403, 1981.
15. Lowe C. R. Eur. J. Biochem., 73, 265—274, 1977.
16. Lowry O. H., Rosebrough N. H., Faer A. L., Randell R. J. J. Biol. Chem., 193, 265—275, 1951.
17. Robison G. A., Butcher R. W., Sutherland E. W. Cyclic AMP. New York, Academic Press, 1971.
18. Tata J. R. Mol. and Cell Endocrinol., 36, 17—27, 1984.

Поступило 29.IV 1986 г.

Биолог. ж. Армения, т. 39, № 9, с. 787—790, 1986

УДК 547.263

С-КОНЦЕВЫЕ АМИНОКИСЛОТЫ БЕЛКА ПРОТЕОЛИПИДОВ ИЗ МОЗГА И НЕКОТОРЫХ ДРУГИХ ОРГАНОВ КРЫСЫ

Т. И. КАЗАРЯН

Институт биохимии АН Армянской ССР, Ереван

Аннотация — С-концевыми аминокислотами белка протеолипидов из головного мозга являются фенилаланин и лизин, а из сердца, печени, почек (корковый, мозговой слой) и скелетной мышцы — только лизин.

Մանուագիր — Տույ՞ր է տրվել, որ գլխուղեղի պրոտեոլիպիդների սպիտակուցի С-ձալրային ամինաթթուներն են ֆենիլալանինը և լիզինը, իսկ սրտի, լյարդի, երիկամ-էտրի (ուղեղային և կեղևային մասերի) և կմախքային մկանիկը՝ լիզինը:

Abstract — Phenylalanine and lysine have been identified as the C-terminal amino acids of the proteolipids from brain and lysine as the C-terminal amino acid of proteolipids from heart, liver, kidney (cortical and medullary parts) and skeletal muscle.

Ключевые слова: протеолипиды, С-концевые аминокислоты, органы крысы.

В связи с разной локализацией и предполагаемой функцией гидрофобных мембранных липопротенинов — протеолипидов (ПЛ) в различных органах и субклеточных образованиях представляет интерес выяснение сходства и различий белкового и липидного компонента ПЛ, выделенных из разных источников. Ранее нами были представлены данные, касающиеся N- и С-концевых аминокислот ПЛ из серого и белого вещества мозга и сердца крупного рогатого скота и С-концевых аминокислот ПЛ, изолированных из некоторых субклеточных образований мозга крысы. В продолжение этих исследований мы изучали С-концевые аминокислоты ПЛ, выделенных из различных органов крысы (головной мозг, сердце, печень, почки — корковый, мозговой слой, скелетная мыш-