

УДК 547.963.3:575.312.31

БЕЛКИ КЛЕТОЧНЫХ ЯДЕР ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС В ОНТОГЕНЕЗЕ

ТЕРПИЛОВСКАЯ О. Н., ИВАНОВ В. А., АБРАМОВА З. И., БЕЛОВА М. М.

Методом градиентного электрофореза в ПААГ обнаружены качественные и количественные изменения ядерных белков клеток головного мозга крыс в процессе постнатального онтогенеза. Процесс развития мозга сопровождается появлением дополнительных пиков в зоне высокомолекулярных белков. В результате анализа индивидуальных белков показано, что сыворотка кроликов, иммунизированных нейтральной ДНКазой из ядер печени крыс, реагирует с ядрами нейронов и нейроглии головного мозга этих животных. В некоторых фракциях, полученных гель-фильтрацией негистоновых белков, обнаружена ДНКазная активность с двухцепочечной ДНК при pH 7—8.

Совокупным использованием различных методов установлено, что белковые компоненты хроматина обладают высокой структурной и функциональной гетерогенностью, которая обусловлена в значительной мере наличием кислых (негистоновых) белков [1], функциональное разнообразие которых свидетельствует о наличии среди них сложных ферментных систем, участвующих в процессах метаболизма и регуляторных модификациях нуклеиновых кислот и белков [2]. Поэтому изучение кислых хроматиновых белков, функцию которых прежде всего следует рассматривать в генетическом аспекте, является, по-видимому, одним из необходимых путей в области исследования функциональной активности ткани и органа. Иммунологический анализ обнаружил в составе негистонов специфические для НС белки, некоторые из них выделены и охарактеризованы биохимическими методами [3]. На основании экспериментов по выработке условного рефлекса предполагают, что негистоновые нейроспецифические белки вовлекаются в протекание навыка [4].

Несмотря на довольно большое количество экспериментальных данных, крайне мало представлен в литературе анализ белков головного мозга в процессе онтогенеза. В данной работе приводятся результаты электрофоретического исследования белков крыс разных возрастов, их биохимический анализ головного мозга локализации ДНКазы в хроматине.

Материалы и методы

Работу проводили на беспородных крысах-самцах и кроликах-самцах (массой 2 кг) породы шиншилла. Для электрофоретического

анализа белков использовали крыс различного возраста: 1-дневных, 1-месячных и взрослых (3-месячных). Исследовали различные фракции: исходный гомогенат, цитоплазматическую фракцию и ядра клеток.

Получение гомогената и цитоплазматической фракции. Крыс перфузировали охлажденным 0,14 М NaCl, декапитировали, быстро извлекали мозг и гомогенизировали в стеклянном гомогенизаторе Поттера с тефлоновым пестиком в 1,9 М сахарозе (рН 6,5) при 1—4°. Все последующие операции также проводили на холоду. Гомогенат разбавляли 1 мМ фосфатом калия (рН 6,5), содержащим 1 мМ MgCl₂. В качестве детергента использовали тритон X-100 в концентрации 0,125%. Полученный гомогенат центрифугировали 15 мин при 3 000 g. Надосадочную жидкость отбирали для анализа.

Выделение ядер. Ядерную фракцию получали согласно описанному ранее методу [5]. Осадок ресуспендировали в 0,6 М сахарозе и насланвали на непрерывный сахарозный градиент 0,6 М—1,6 М с «подушкой» из 2,2 М сахарозы. Ядерную фракцию получали в осадке центрифугированием в течение 60 мин при 105 000 g.

Электрофорез. Исходный гомогенат, надосадочную жидкость и ядра обрабатывали 2—3-минутным кипячением в солиобилизирующем растворе, содержащем 0,075 М трис-сульфат, 5%-ный β-меркаптоэтанол (β-МЭ), 2,5%-ный SDS, рН 9,0, который приготавливали на 50%-ной сахарозе [6].

Электрофорез белков проводили в градиентном ПААГ в диапазоне концентрации от 4 до 20%. В систему добавляли 0,1% SDS. Приготовление градиентных микрогелей проводили по методу Daines, Mauger [7] на гелевых столбиках диаметром 2,5 мм и длиной 10 см. Трубочки изготовляли из молибденового стекла и перед употреблением силиконировали, используя для этого 0,03%-ный силикон-эластомер E-301, растворенный в эфире, и высушивали при 120° 1 ч. В пробы добавляли бром-феноловый синий и об окончании электрофореза судили по прохождению зоны красителя. На каждую трубочку наносили по 10 мкг белка. Электрофорез проводили в течение 7 ч при 0—2°, при силе тока 0,46 мА на одну трубочку. Первые 40 мин сила тока составляла половину указанной величины.

Гели извлекали, фиксировали 12 ч 12,5%-ной ТХУ, отмывали от ТХУ 7%-ной уксусной кислотой 30 мин на водяной бане при 40—45°, окрашивали 0,2%-ным раствором Кумасси бриллиантовым синим в течение 45 мин при 40—45° и отмывали от излишков красителя уксусной кислотой до обесцвечивания фона. Прямую денситометрию гелей проводили на денситометре оригинальной конструкции [8]. Содержание белка в пробах определяли по методу Lowry и соавт. [9]. Для анализа индивидуального ядерного белка (ДНКазы) использовали иммунолюминесцентный метод [10] и методы фракционирования негистоновых белков [11].

Локализацию нейтральной ДНКазы ядер мозга крыс изучали, используя специфические иммунные сыворотки [10]. Нейтральная

ДНКазы была выделена из ядер печени крыс [12]. Полученные препараты применяли для иммунизации кроликов, состоявшей из четырех введений с интервалами в 7 дней. Фермент вводили в возрастающих дозах от 0,5 до 4,0 мг белка в смеси с адьювантом Фрейнда. Реиммунизацию проводили через 40 дней с момента последнего введения, при этом фермент вводили без адьюванта. Кровь брали через 7 дней после окончания цикла.

На микротоме-криостате (МК-25) получали срезы мозговой ткани, проходящие через область гиппокампа толщиной 5—7 мкм. Срезы фиксировали в камере криостата 96%-ным этанолом в течение 10 мин. Промывали физраствором, содержащим 10 мМ фосфат натрия. На срезы наносили специальную иммунную сыворотку, инкубировали 30—40 мин при 22° во влажной камере. После тщательной отмывки препараты инкубировали в тех же условиях с меченой антиглобулиновой сывороткой, смешанной с родамином.

Фракционирование негистоновых белков хроматина. Из очищенных клеточных ядер выделяли хроматин, который с помощью солевой экстракции диссоциировал на комплексе ДНК с гистонами и негистоновую фракцию белков. Для этого использовали методы, описанные ранее [11]. Негистоновые белки наносили на колонку с сефадексом G-200 и проводили гель-фильтрацию. Фракции негистоновых белков, полученные в результате гель-фильтрации, обессоливали и концентрировали диализом против 5 мМ фосфата калия (рН 7,1), содержащего 5 мМ β-МЭ и 10% глицерина. ДНКазную активность определяли спектрофотометрически, регистрируя кислоторастворимые продукты реакции, которую проводили с двухцепочечной ДНК в качестве субстрата. Условия диализа и состав реакционной смеси опубликованы в статье Иванова и соавт. [13].

Результаты и обсуждение

Созревание мозга крыс характеризуется не только увеличением его веса, но и изменением содержания белков на единицу массы. Установлено, что мозг новорожденных крыс содержал около 10% белка, а у взрослых—15%. Увеличение содержания общего белка в процессе развития мозга наблюдали также и другие авторы [14]. Но наибольший интерес представляют исследования онтогенетических изменений белкового спектра, поскольку именно они, по-видимому, функционально значимые стадии процесса развития. Подобные данные представлены крайне недостаточно и противоречиво [15, 16]. В связи с этим нами был проведен электрофоретический анализ белков головного мозга крыс разного возраста: 1-дневных, 1-месячных и взрослых (3-месячных). На рис. 1 приведены денситограммы общих белковых фракций. В результате сравнения денситограмм было идентифицировано свыше 60 четко разделяющихся белков и установлено, что процесс постнатального развития сопровождается увеличением количественных раз-

личий между ними. Небольшие различия обнаружены в области низкомолекулярных белков (пики 1—4). С увеличением возраста наблюдалось усложнение электрофореграмм, в зонах быстро и медленно мигрирующих белков появлялись более интенсивные пики, отражающие процессы созревания мозга, его миелинизацию (пики 9—10, 15—23). В области со средней электрофоретической подвижностью (пики 30—45) у взрослых по сравнению с новорожденными можно заметить появление новых пиков. Подобное обогащение белкового спектра и увеличение концентрации отдельных белков происходило и среди высокомолекулярных медленно мигрирующих белков (пики 45—67).

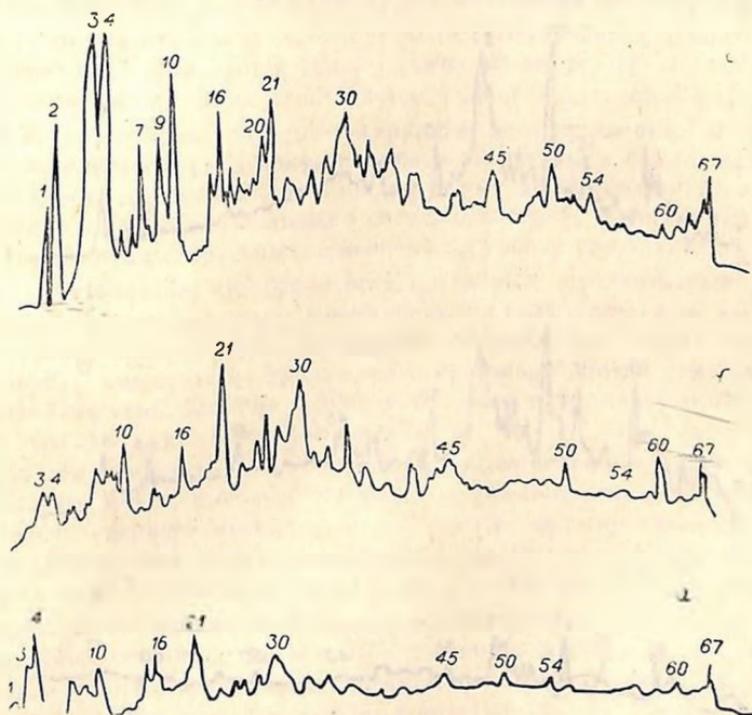


Рис. 1. Денситограммы образцов ПААГ после диск-электрофореза тотальных белков гомогената головного мозга крыс: а—однодневных, б—месячных, в—взрослых

Белковый спектр цитоплазматической фракции отличался менее выраженным разнообразием (рис. 2). Сравнивая денситограммы исходного гомогената и цитоплазматической фракции, можно сделать важное заключение о том, что возрастные изменения белков становятся выраженными уже к месячному возрасту и незначительно отличаются у взрослых крыс.

Наибольший интерес представляет анализ ядерных белков. Данные литературы показывают, что хромосомные белки, в составе которых на-

ходятся и нейроспецифические, играют важную роль в контроле состояния ДНК и регуляции генной активности—процессах, управляющих дифференциацией клеток и созреванием ткани. В ядерной фракции, в отличие от других исследованных фракций, отмечалось обогащение некоторых групп белков во всех изученных возрастных группах животных (рис. 3). У 1-дневных крыс ядерная фракция имела более сложный спектр белков по сравнению с цитоплазматической. Особенно большие отличия наблюдались в области высокомолекулярных белков. Эта группа белков (пики 45—67) имеет больше четко выраженных пиков, и идентичные белки (пики 45, 50, 54) содержались в более высокой концентрации в ядерной фракции. Аналогичная картина прослеживалась у

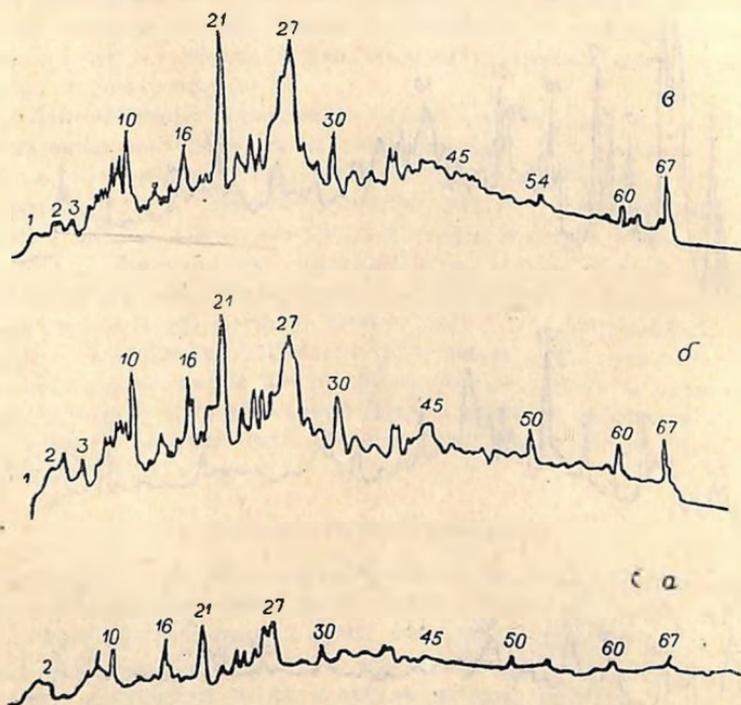


Рис. 2. Денситограммы образцов ПААГ после диск-электрофореза белков цитоплазматической фракции. Обозначения те же, что и на рис. 1

месячных и взрослых животных. Важно отметить, что именно в этой области спектра находятся специфические белки мозга. На основании электрофоретической подвижности белок 14-3-2 соответствует промежуточной зоне (пики 45—54), а белок S-100 — зоне, дальше отстоящей от старта [17].

При сравнении электрофореграмм ядерной фракции животных разных возрастов можно отметить, что гистоновые белки (пики 2—4) в процессе развития животных практически не изменялись. Содержание этих белков у новорожденных было такое же, как у взрослых. Таким

образом, наши исследования подтверждают известные данные Kelly [15]. Некоторые белки (пиксы 5—21) присутствовали во всех возрастных группах и изменялись лишь в относительной концентрации в процессе развития (пиксы 20—21). Белки со средней электрофоретической подвижностью (пиксы 22—45) с возрастом приобретали более выраженную гетерогенность, те же изменения имелись и в области высокомолекулярных белков. При этом происходит как усложнение белкового спектра, так и повышение содержания этих белков в онтогенезе. Изменения спектра ядерных белков не завершаются к месячному возрасту: 30-дневные и взрослые крысы имеют выраженные различия (рис. 3).

Данные литературы свидетельствуют о том, что в течение постнатального развития мозг млекопитающих подвергается характерным изменениям: 1) образуется такое количество нейронов, которое присуще взрослому мозгу; 2) осуществляется период ускоренного роста, в течение которого происходит интенсивная дифференцировка; 3) наступает окончательный период консолидации, приводящий к формированию зрелого головного мозга [18]. Наряду с этими преобразованиями были обнаружены изменения белкового спектра, которые, по-видимому, являются отражением возрастных изменений на уровне процессов метаболизма белков. Показано, что белки всех изученных субклеточных фракций подвергаются в онтогенезе качественным и количественным изменениям. Но только при исследовании ядерных белков имели место изменения у взрослых животных по сравнению с месячными, тогда как белки цитоплазматической фракции и исходного гомогената, как уже было сказано выше, эти различия утрачивают.

Несмотря на то, что образование числа нейронов, характерное для взрослого мозга, и морфологическое созревание органа заканчиваются в течение первого месяца развития крысы, формирование макромолекулярной основы мозгоспецифических процессов продолжается, отражаясь на метаболизме ядерных белков клеток мозга. Полученные нами данные были положены в основу дальнейшего исследования ядерных клеточных белковых компонентов головного мозга с целью выявления индивидуальных функционально активных белков, для чего применялся непрямой метод люминесцирующих антител. На рис. 4 представлена иммуофлуоресцентная картина взаимодействия иммунной сыворотки со срезом, проходящим через область гиппокампа крыс. Отчетливо видно интенсивное специфическое свечение в ядрах нейронов и нейроглии. Результаты экспериментов свидетельствуют о наличии в клеточных ядрах головного мозга белков, иммунологически подобных ядерной ДНКазе печени, что находится в соответствии с полученными ранее данными [19]. Так, в общих белковых фракциях ядер нейронов и глии была обнаружена ДНКазная активность методом регистрации кислотонерастворимых продуктов гидролиза ДНК, собранных на мембранных фильтрах.

Для более подробной характеристики ядерных белков в данном ис-

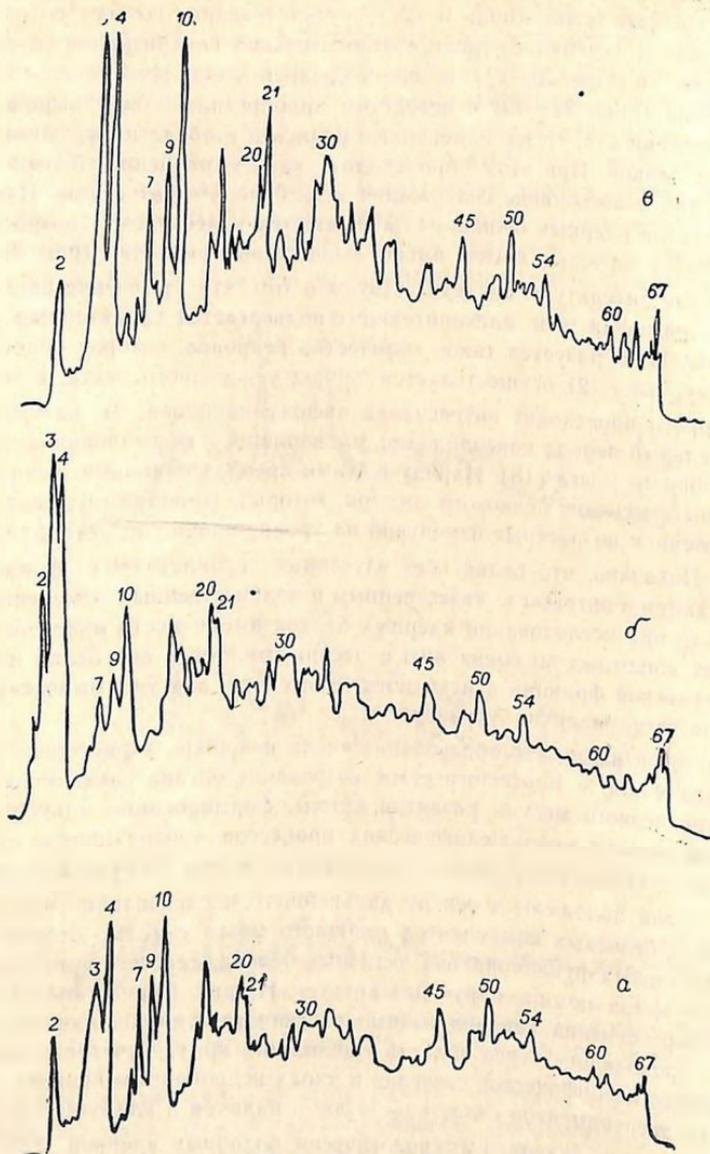


Рис 3. Денситограммы образцов ПААГ после диск-электрофореза белков ядерной фракции. Обозначения те же, что и на рис. 1

следовании использовали методы фракционирования хроматина. Фракцию негистоновых белков наносили на колонку с сефадексом и проводили гель-фильтрацию. Как видно из рис. 5, кислые белки хроматина проявляют ДНКазную активность, которая обнаруживается спектрофо-

тометрически по кислоторастворимым продуктам гидролиза двухцепочечной тимусной ДНК. При этом показано, что негистоновые белки головного мозга содержат несколько активных ДНКазных фракций, различающихся величиной M . Данные литературы также свидетельствуют



Рис. 4. Иммунофлуоресцентное окрашивание среза гиппокампа головного мозга крысы. Ок. 5, об. 20×100 . Антиглобулиновая сыворотка получена от кроликов, иммунизированных ядерной нейтральной ДНКазой хроматина печени крысы

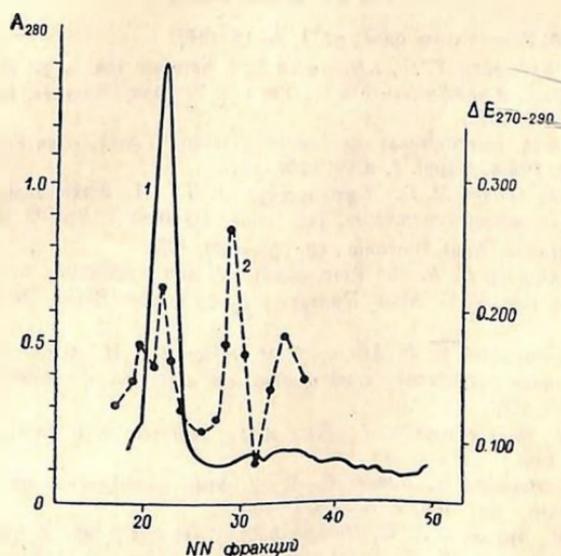


Рис. 5. Гель-фильтрация (сефадекс G-200) негистоновых белков хроматина клеток мозга. 1—белок (A_{280}), 2—активность ДНКазы ($\Delta E = E_{270} - E_{290}$)

о гетерогенности ядерных ДНКаз других тканей млекопитающих, например, в составе негистоновой фракции белков хроматина клеток *HeLa* были обнаружены 4 различных эндо-ДНКазы [20].

Подробное исследование функционально активных белков головного мозга, ассоциированных с хроматином, по-видимому, позволит выявить некоторые закономерности нейроспецифической регуляции активности генов и определить функциональный подход к исследованию биохимических механизмов интегративной деятельности мозга на уровне генетического аппарата клетки.

NUCLEAR PROTEINS FROM RAT BRAIN IN POSTNATAL ONTOGENESIS

TERPILOVSKAJA O. N., IVANOV V. A., ABRAMOVA Z. I., BELOVA M. M.

Institute of Biophysics, USSR Academy of Sciences, Pouchino
Ulyanov-Lenin's State University, Kazan

Both quantitative and qualitative changes have been detected in rat brain nuclear proteins in the course of postnatal ontogenesis by means of gradient electrophoresis technique. A new peak in the zone of high molecular weight proteins was detected. The blood serum of rabbits, immunized by neutral DNA-ase from rat liver nuclei, crossreacted with rat brain neuron and neuroglia nuclei.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ельцина Н. В. Успехи совр. биол., 87, 1, 3—15, 1979.
2. Stein G. S., Spetsberg T. C., Kleinsmith L. I. Science, 183, 4127, 817—824, 1974.
3. Magandos P. I., Zomzely-Neurath C., York C. Biochem. Biophys. Res. Comm., 68, 4, 1309—1316, 1975.
4. Livett B. G.—In: International Review of Cytology. N. Y.—San Francisco—London: Acad. Press, Suppl. 7, p. 53—237, 1978.
5. Третьяк Т. М., Ткачук М. Г., Терпиловская О. Н. III Всесоюзная конференция «Память и следовые процессы». Тез. докл., Пушкино, с. 91—93, 1974.
6. Stephen J. Mayor. Anal. Biochem., 69, 350—360, 1975.
7. Dames W., Maurer H. R.—In: Electrophoresis and Isoelectric focusing in polyamide gel. Eds. R. C. Allen, Maurer H. R. de Gryter, Berlin—N. I., p. 221—231, 1974.
8. Ларин В. Т., Санталов Б. Ф., Хохлов А. М., Розанов С. И.—В кн.: Описание научных принципов устройства новых приборов и методики пользования ими, Пушкино, с. 7—13, 1981.
9. Lowry O. H., Rosebrough N. I., Farr A. L., Randall R. I. Biol. Chem., 193, 1, 265—275, 1951.
10. Хофман Р., Штраубе В., Клауш Б.—В кн.: Иммунологические методы (под ред. Х. Фримеля). М., Мир, с. 435—441, 1979.
11. Третьяк Т. М., Архипова Л. В., Иванов В. А. ДАН СССР, 257, 5, 1262—1264, 1981.
12. Винтер В. Г., Зоткина Н. Л., Гайнуллина Ф. Х. Биохимия, 41, 1, 119—123, 1976.
13. Иванов В. А., Третьяк Т. М., Газиев А. И., Санталов Б. Ф. Биохимия, 45, 5, 912—922, 1980.
14. Хиден Х.—В кн.: Функциональная морфология клетки. М., ИЛ, с. 185—260, 1963.
15. Kelly P. T., Luttges M. W. J. of Neurochemistry, 27, 1163—1172, 1976.
16. Griffith A. L., Arthur La Velle, Ca'simpridis N. Brain Res., 21, 537—540, 1970.
17. Певзнер Л. З., Венков Л., Черешаров Л. Укр. биохим. ж., 1, 50, 20—24, 1978.

18. Осборн Н. Н. Микрохимический анализ нервной ткани. М., Медицина, с. 184—253, 1978.
19. Третьяк Т. М., Иванов В. А., Терпиловская О. Н. Укр. биохим. ж., 51, 6, 624—628, 1979.
20. Fischman G. I., Lambert M. W., Studzinsky G. P. Biochem. et Biophys. Acta, 567, 2, 464—471, 1979.

Институт биологической физики АН СССР, Пущино
Казанский государственный университет
д-м. В. И. Ульянова-Ленина

Поступила 31.V.1982