



ВЛИЯНИЕ ГИПОТАЛАМИЧЕСКИХ БЕЛОК-ГОРМОНАЛЬНЫХ КОМПЛЕКСОВ НА ФУКОЗИЛИРОВАНИЕ ГЛИКОПРОТЕИНОВ ГИППОКАМПА

УДК 577.171.55

СААКЯН С. А., *ГРЕКШ Г., СААКЯН Ф. М., СРАПИОНЫАН Р. М.,
**ЮРК Р., ГАЛОЯН А. А., **МАТТИЕС А.

Институт экспериментальной биологии АН Армении, Ереван

*Институт фармакологии и токсикологии, Медицинская Академия ГДР

**Институт нейробиологии и исследований мозга, АН ГДР, Магдебург

Изучено влияние ряда кардиоактивных гипоталамических соединений на фукосилирование гликопротеинов гиппокампа крыс. Установлено, что одна из форм нейротропного гормона «К» (иК₂) в значительной степени подавляет процесс фукосилирования. Коррелирующие данные были получены при изучении действия этого же соединения на изменение активности фукокиназы.

Получены результаты, свидетельствующие о возможном участии предшественника иК₂—БНК (белка-носителя нейротропного гормона «К») в процессах обучения и запоминания.

В течение продолжительного времени (более 25 лет) накоплен фактический материал, свидетельствующий о наличии в магноцеллюлярных ядрах гипоталамуса трех специфических белок-гормональных комплексов [1—3]. Указанные белок-гормональные комплексы (БГК) идентифицированы как биохимические системы, осуществляющие химическую регуляцию метаболизма функций головного мозга и ряда висцеральных органов. При диссоциации БГК было установлено, что высокомолекулярные соединения являются гликопротеинами, а нековалентно связанные с ними кардиоактивные гликопептиды, ранее обнаруженные в том же регионе мозга, кардиотропными нейротропными, условно обозначенные «К», «С», и «Г» [4]. Исследование физико-химических и структурно-функциональных свойств обнаруженных гликопротеинов наряду с достоверными данными радиоиммунохимического анализа (РИА), подтверждает существование новых нейроспецифических гликопротеинов [3].

При изучении деградации предварительно денатурированных гликопротеинов протеолитическими ферментами [5, 6] обнаружены и идентифицированы кардиоактивные триптические фрагменты, показано участие этих биологически активных соединений в ряде метаболических процессов: ингибции Ca^{2+} -тока, регуляции внутриклеточного уровня циклических нуклеотидов, гликолизе и гликогенолизе, высвобождении и захвате катехоламинов.

Совокупность приведенных данных свидетельствует о том, что эти гликопротеины являются не только носителями, но и предшественниками некоторых биологических соединений, включая прогормональные формы нейротропных гормонов «К», «С» и «Г».

Котрансляционное и/или посттрансляционное гликозилирование полипептидных цепей является основным результатом модификации

макромолекулярной структуры и/или функции ферментов, рецепторных молекул и других функциональных белков, участвующих в различных клеточных процессах. Среди модифицированных гликопротеинов наиболее изученными в функциональном отношении (в особенности в дифференциации или развитии клетки) являются (фуко)-гликопротеины. Впрочем, вопрос биосинтеза олигосахаридной цепи и механизм влияния его модификаций на фукозилрование гликопротеина остается еще в значительной степени не выясненным [7—9]. Меченая L-фукоза, как оказалось, является удобной моделью предшественника для изучения изменений в биосинтезе (фуко)-гликопротеинов, так как, по-видимому, не включается интенсивно в другие гликоконъюгаты [10]. Включение фукозы в гликопротеин является последним этапом, завершающим процессинг олигосахаридной цепи. При этом перемещение фукозы под действием фукозилтрансферазы в терминальный невосстановленный остаток [11] олигосахаридной цепи происходит после ее активации под действием специфических фукокиназ [12, 13].

Исходя из участия в ряде метаболических процессов упомянутых выше гипоталамических белок-гормональных комплексов, мы предположили о возможном моделирующем действии этих нейрогормонов, их предшественников и препрогормональных форм на фукозилрование гликопротеинов мозга и на активность фукокиназы, что стало целью настоящего исследования.

Материалы и методы

Эксперименты проводили на 7-недельных крысах-самцах линии *Wistar* массой 210—240 г. Их содержали в стандартных лабораторных условиях группами по 10 особей в клетке без ограничений пищи и воды. После декапитации из гиппокампа готовили срезы толщиной 0,5 мм, нарезаая структуру перпендикулярно к ее продольной оси. В каждом эксперименте инкубировали по 3 среза из одного гиппокампа в контрольных условиях и при наличии исследуемых веществ. После предварительной инкубации в течение 15 мин в 0,8 мл инкубационной среде, содержащей (в mM) NaCl—134, NaHCO₃—16, CaCl₂—0,75; KH₂PO₄—1,24, MgSO₄—1,3, глюкозы—10, pH—7,4, исследуемые образцы добавляли к инкубационной среде в объеме 100 мкл. Среда контрольных срезов доводили до общего объема 0,9 мл. Спустя 10 мин добавляли 2 мкМ L-[6-³H] фукозы (16,8 Ки/ммоль; «New England Nuclearg») в инкубационную среду. Конечная концентрация меченого предшественника составляла 10 мМ. В ходе эксперимента инкубационную среду аэрировали (95% O₂, 5% CO₂); время включения меченой фукозы составляло 1 ч. Далее проводили гомогенизацию тканевых срезов в 0,3 мл 0,1 н. NaOH. Белки осаждали добавлением к 0,2 мл гомогената 0,5 мл охлажденной во льду 12%-ной ТХУ. Полученный осадок промывали последовательно дважды 6%-ной ТХУ, водой, этанолом и растворяли в 0,3 мл гидрохлорида гуанина при 50°. Радиоактивность препаратов, растворенных в смеси диоксана, содержащего сцинтиллятор (6 г PPO, 0,2 POPOP, 100 г нафталина) в соотношении 1:1, измеряли на сцинтилляционном спектрометре. Содержание белка в препаратах определяли по методу Lowry и соавт. [14], где в качестве стандарта использовали БСА. Чтобы вычислить скорость включения (пмоль фукозы/мг белка/ч), удельная радиоактивность всех белков (д. р. в мг⁻¹) была скорректирована величиной радиоактивного предшественника в инкубационной среде с использованием следующего уравнения:

$$R = \frac{d.p.m. \times \text{мг белок} - 1 \times r - 1}{d.p.m. \times \text{пмоль предшественник}^{-1} (\text{среда})}$$

где iR — нерастворимый белок, r — число распад в мин.

Активность фукокиназы (В. С. 2. 7. 1. 52) определяли путем измерения перехода $[^{14}\text{C}]$ 1-фукозы в $[^{14}\text{C}]$ фукозу-1-фосфат, в растворимой фракции ткани головного мозга крыс, по методу, описанному в литературе для различных тканей [12, 15, 16], и модифицированному нами применительно к ткани головного мозга [17]. Ткань головного мозга крыс гомогенизировали в 9 объемах 77,5 мМ TAPS буфера, pH 8,5. Гомогенат центрифугировали при 20000 g в течение 45 мин. Полученная надосадочная жидкость служила источником фермента. 200 мл этой фракции доводили до 320 мл инкубационной смеси, содержащей в мМ: TAPS—50; ATP—4,8; MgSO_4 —5,8; KF—84 и 33 μM 1-фукозы- $[^{14}\text{C}]$ (57 мКи/ммоль; («Radiochemical Centre Amersham», Англия), разбавленный 1-фукозой до 10 м Ди/ммоль). После 45 мин инкубации при 37° ферментативную реакцию прекращали, смесь переносили на колонку с Dowex (2×8, 200—400 меш, 30×5 мм), активировали 10 мл раствора, содержащего 190 г формата аммония и 54 г 85% муравьиной кислоты на 1 л, pH 7,5. После этого колонку промывали 10 мл 10 мМ формата аммония, pH 7,5 и 0,5 мл раствора, содержащего 0,1 М HCl и 0,2 М KCl, для удаления непревращенной $[^{14}\text{C}]$ фукозы. Далее 1- $[^{14}\text{C}]$ фукоза-1-фосфат элюировали 2 мл раствора, содержащего 0,2 М HCl и 0,2 М KCl. К 1 мл полученного элюата прибавляли 1 мл воды и 12,5 мл диоксиана, содержащего сцинтиллятор, и измеряли в жидком сцинтилляционном спектрометре. Активность фукокиназы выражали в пкмоль $[^{14}\text{C}]$ фукоза-1-фосфат/мг белка/ч.

Результаты и обсуждение

При исследовании влияния нейрогомона (НК_3), белков-носителей (БНК, БНГ) и их трипептических фрагментов (ТфБНГ, ТфБНГ₅) на фукозилрование гликопротеинов гипокампа крыс было найдено значительное уменьшение включения фукозы при инкубировании тканевых срезов в присутствии 0,1 μM ТфБНГ₅ и 10 μM БНГ (рис. 1). Остальные соединения не оказывали заметного влияния на включение $[^{14}\text{H}]$ фукозы в гликопротеины гипокампальных срезов.

Как видно из рис. 2, БНГ, который уменьшал в значительной мере фукозилрование гипокампальных гликопротеинов, вызывает в тех же концентрациях ярко выраженное ингибирование активности фукокиназы. Остальные исследуемые кардиоактивные соединения не изменяли активности фукокиназы. С учетом литературных данных [17, 18], свидетельствующих о многоэтапном процессе превращений фукозы перед включением в гликопротеины, и вышеописанных фактов можно допустить, что ингибирующее действие БНГ на активность фукокиназы и соответственно фукозилрование гипокампальных гликопротеинов происходит на I этапе превращения фукозы — образовании фукозы-1-фосфата.

Известно много работ о взаимосвязи процессов фукозилрования и механизмов, лежащих в основе формирования длительной памяти [17, 19—21, 26]. Одновременно установленные взаимосвязь и взаимодействие нейропептидов и «классических» нейромедиаторов в деятельности мозга также делают правомочным постановку вопроса, об их роли в интегративных процессах обучения и памяти [25, 24].

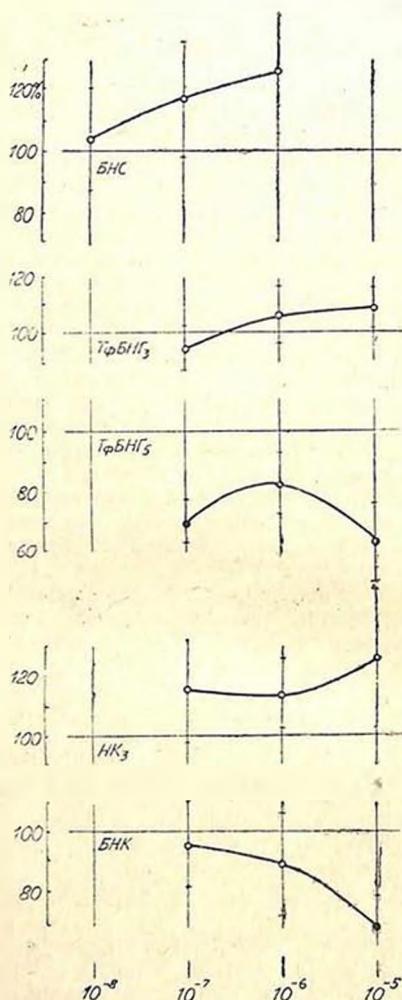


Рис. 1. Действие кардиоактивных соединений на включение фукозы в гиппокампальные срезы ($n=6$). Здесь и на рис. 2 по оси абсцисс — концентрация исследуемых веществ, в М. БНС — белок-носитель нейрогормона «С», ТФБНГ₃ — триптический фрагмент белка-носителя нейрогормона «Г₃», ТФБНГ₅ — триптический фрагмент белка-носителя нейрогормона «Г₆», НК₃ — нейрогормон «К₃», БНК — белок-носитель нейрогормона «К».

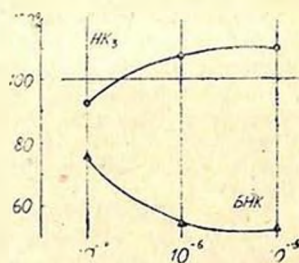


Рис. 2. Действие кардиоактивных соединений на изменение активности фукокиназы

В свете сказанного представляют интерес полученные нами ранее данные, демонстрирующие участие кардиоактивных соединений мозга в пресинаптической регуляции высвобождения катехоламинов. Изучение влияния этих соединений на нейромедиаторные соединения мозга может способствовать выявлению механизмов их действия на процессы обучения и памяти. Исследования в этом направлении были связаны с разработкой поведенческих методик [22, 23].

Полученные результаты свидетельствуют о корреляции специфического ингибирования фукозилирования гилпокампаальных гликопротеинов и потери памяти под действием БНК.

В сочетании с вышеприведенными данными результаты исследования поведенческих навыков и формирования соответствующих следов памяти могут служить признаком участия кардиоактивных БГК в механизмах их регуляции различных форм деятельности мозга.

Авторы приносят свою благодарность Ангелике Райхел за техническую помощь.

INFLUENCE OF HYPOTHALAMIC PROTEIN-HORMONE COMPLEXES ON HIPPOCAMPAL GLYCOPROTEIN FUCOSYLATION

SAHAKIAN S. A., *GRECKSCH G., SAHAKIAN F. M., SRAPIONIAN R. M.,
**JORK R., GALOYAN A. A., **MATTHIES H.

G. Ch. Bunatyan Institute of Biochemistry, Academy of Sciences of the Armenian SSR, Yerevan, *Institute of Pharmacology and Toxicology, Medical Academy Magdeburg, G DR, **Institute of Neurobiology and Brain Research, Academy of Sciences of the GDR, Magdeburg, GDR

We have studied the effect of several cardioactive hypothalamic compounds on fucosylation of glycoproteins in rat hippocampus. We have established that one form of neurohormone K (nK_3) is a strong fucosylation inhibitor. Similar data were obtained when the effect of this compound on fucosinase activity was studied. We have evidence that PCK, precursor and protein carrier of neurohormone K, may play a part in learning and memory.

ЛИТЕРАТУРА

1. Галоян А. А. ДАН АрмССР, т. 38, № 4, с. 305—308, 1964.
2. Галоян А. А. ДАН АрмССР, т. 34, № 3, с. 157—159, 1962.
3. Срапионян Р. М. Нейрохимия, т. 6, с. 109—116, 1987.
4. Galoyan A. A., Srapionian R. M. Neurochem. Res., v. 8, p. 15—15.5, 1983.
5. Galoyan A. A. Neurochem. Res., v. 11, p. 769—787, 1985.
6. Срапионян Р. М., Саакян С. А., Саакян Ф. М., Галоян А. А. Нейрохимия, т. 1, с. 263—271, 1983.
7. Gool H. C., Felzi I., Kapadia A., Knowles B. B., Solter D., Evans M. J. Nature, v. 292, p. 156—158, 1981.
8. Minter L. N., Erickson P. F., Lusher R. S. Dev. Brain. Res., v. 4, p. 13—21, 1982.
9. Spooner E., Fukuda M., Klock J. C., Oates J., Dell A. J. Biol. Chem., v. 259, p. 4792—4801, 1984.
10. Sturgess J. M., Minaker E., Mitranic M. M., Moscarello M. A. Biochim. Biophys. Acta, v. 320, p. 123—132, 1973.
11. Broquet P., Perez-Gonzalez M. N., Louisot P. J. Neurochem., v. 32, p. 599—606, 1979.

12. *Ishihara H., Massaro D. J., Heath E. C. J. Biol. Chem.*, v. 243, p. 1103—1109, 1968.
13. *Ishihara H., Heath E. C. J. Biol. Chem.*, v. 243, p. 1110—1115, 1968.
14. *Lowry O. H., Rosebrough H. L., Farr A. L., Randall R. J. J. Biol. Chem.*, v. 193, p. 265—275, 1951.
15. *Kilker R. D., Shuey D. K., Serif G. S. Biochem. Biophys. Acta*, v. 570, p. 271—283, 1979.
16. *Richards W. L., Serif G. S. Biochim. Biophys. Acta*, v. 404, p. 353—367, 1977.
17. *Popov N., Matthies H.* —In: *Neurobiology of Hippocampus* (ed. W. Selfert), p. 473—487, 1983.
18. *Jork R., Sehmitt M., Lossner B., Matthies H. Biomed. Biochim. Acta*, v. 43, p. 261—270, 1984.
19. *Matthies H.* —In: *Neuronal Plasticity and Memory Formation* (eds. C. Marsan, H. Matthies), p. 1—5, New York, Raven Press, 1982.
20. *Popov N., Ruthrich H. L., Pohle W., Schulzeck, Matthies H. Brain Res.*, v. 101, p. 295—304, 1976.
21. *Rose S. P. R.* —In: *Neural Mechanisms of Conditioning* (eds. D. L. A'kon, C. D. Woody) p. 233—247, New York, Plenum press, 1985.
22. *Jork R., Grecksch G., Matthies H. Pharmacol. Biochem. Behav.*, v. 25, p. 1137—1144, 1986.
23. *Rose S. P. R., Jork R. Behav. Neural Biol.*, v. 48, p. 246—258, 1987.
24. *Булаев В. М., Раевский К. С. Успехи физиол. наук*, т. 14, № 4, с. 65—82, 1982.
25. *Krieger D. T. Sciences*, v. 222, p. 975—985, 1982.
26. *Sukumar R., Rose S. P. R. J. Neurochem.*, v. 34, p. 1000—1006, 1980.

Поступила 16.IV.1990