

УДК 612.82.571.1

СИНТЕЗ БЕЛКА В ЯДРАХ НЕЙРОНОВ ГОЛОВНОГО МОЗГА  
И ИЗУЧЕНИЕ ЕГО ПРОДУКТОВ

САИТМУРАТОВА О. Х.

Институт биоорганической химии АН УзССР им. А. А. Садыкова, Ташкент

Обобщены литературные и собственные экспериментальные данные о роли клеточных ядер в синтезе белка, механизме биосинтеза белков в ядрах. Представлены результаты собственных исследований по включению меченых аминокислот ядер в образующиеся белки, выделению, изучению природы, органоспецифичности и их действия на двигательную активность животных.

Выяснение роли нейрональных белков и пептидов животных и человека остается одной из актуальных проблем. Значительная часть выделенных в этом направлении исследований посвящена проблемам биосинтеза белков ядрами клеток животных и механизму их синтеза.

Многообразие структурных свойств клеточных ядер эукариот обуславливает их полифункциональность. Возникновение некоторых видов болезней, в том числе злокачественных новообразований, зависит от изменения функции и активности клеточного ядра и ядрышек [1].

Исследования последних 30 лет показали, что клеточные ядра способны синтезировать сравнительно незначительное количество специфических белков. Поэтому процесс образования этих белков и механизм их синтеза привлекает особое внимание исследователей. В этой связи участие клеточных ядер в синтезе белков считается одной из самых интересных проблем и дискутируется в современной биохимии [2—4]. В ядре, вероятно, синтезируется лишь часть общеклеточного белка и, как полагают [3], синтез даже ограниченного количества специфических ядерных белков (например, митохондриальных хромосомных белков) может иметь существенное физиологическое значение.

По предположению некоторых авторов [5], белки, синтезированные в ядрах, по-видимому, могут иметь особо важную роль в регуляции процессов, протекающих в ядре: при репликации генома, например, в роли посредника передачи информации в ядре, и, возможно, при синтезе нуклеиновых кислот и взаимосвязи с информационными процессами в цитоплазме. Исследуя соотношение активности ядерного полипептидного синтеза (ЯПС) и матричного синтеза белков в клетках печени крыс [6], установили, что ЯПС активируется в условиях

торможения синтеза белков в цитоплазме. На модельных опытах показано, что системы ЯПС- и ADP-рибозилирования ядерных белков конкурируют в определении общей структуры хроматина: ADP-рибозилирование способствует конденсации, а ЯПС—деконденсации хроматина.

Впервые сведения по ядерному синтезу белка появились в 1955 году, когда была исследована интенсивность включения меченых аминокислот в изолированные ядра селезенки [7]. Последующее выделение этих включений в цитоплазму было описано цитологами в некоторых нейронах, нейросекреторных клетках, овощах [8]. На основании полученных данных авторы пришли к выводу о наличии в ядре автономной белоксинтезирующей системы (БСС). Впоследствии аналогичные данные были получены для ядер других типов клеток животных [2, 9—19] и растений [9, 20, 21]. Работы подобного характера велись медленно и только в последние годы наличие БСС в ядрах эукариотических клеток стало установленным фактом [6]. При выяснении внутриядерной локализации меченых *de novo* белков после инкубации суспензии ядер в среде с радиоактивными аминокислотами и после фракционирования органелл обнаружено, что радиоактивность больше всего присуща ядрышкам, меньше—нуклеоплазме [22], внешней мембране [23], различным фракциям хроматина [2, 16, 17] и ДНП с небольшим количеством прочносвязанных белков [24].

Некоторыми исследователями изучены вновь синтезированные в ядрах продукты. Так, Zimmermann и соавт. [12], изучая синтез белка в изолированных ядрах и ядрышках клеток *HeLa*, сделали вывод, что очищенные ядра синтезируют белок, и цитоплазматические загрязнения, содержащие рибосомы или митохондрии не ответственны за наблюдаемый синтез. При исследовании свойств ядерного синтеза белка, то есть потребности БСС отмечено отсутствие некоторых составных частей в смеси инкубации, что указывает на возможную ненужность некоторых из них, или на присутствие их в достаточном количестве внутри ядра для того, чтобы поддержать реакцию. Авторы также отмечают, что ядерные белки, очевидно, синтезируются в ядрышках. В 15%-ном ПЛАГ было обнаружено два радиоактивных пика: один большой, другой маленький. Фракция, обуславливающая маленький пик, растворима в кислоте, поэтому авторы предполагают возможность соответствия ее гистону. Что касается большого пика, то его природа неизвестна. Чуть позже Laval, Bouleille [13] использовали для измерения образования белка в ядерных фракциях электронномикроскопическую автордиографию. На автордиограммах радиоактивность была связана с определенными областями ядра, в ядрышке она была в 3 раза выше, чем в остальных частях ядра. Эти результаты могут быть истолкованы в пользу концепции, что синтез белка происходит в ядре. Авторами получены чистые ядерные фракции и инкубированы с мечеными аминокислотами. При полном удалении внеш-

ней ядерной мембраны с прикрепленными к ней рибосомами в ядрах происходит синтез белка. 2,4-динитрофенол, ингибитор окислительного фосфорилирования, оказывает тормозящий эффект на процесс мечення ядер. Меченый продукт был чувствителен к проназе, так как переваривание нерастворимого материала проназой после осаждения в кислоте вызывало полную потерю радиоактивности. Авторы полагают, что включение аминокислот ядрами происходит другим путем, отличным от цитоплазматического. Позднее Laval и Mouli [17] анализировали электрофорезом в ПААГ и автордиографически синтезированные ядрышками продукты *in vitro*. Путем электрофореза меченых ядрышковых белков обнаружили два радиоактивных пика: маленький пик растворялся в кислоте, а большой—не растворялся.

Эти же исследователи определяли N- и C-концы белка при помощи протеолитических ферментов и обнаружили радиоактивность вдоль полипептидных цепей (в середине и у C-конца). Авторы пришли к выводу, что в ядрышковой системе происходит синтез белка [17].

По данным Gallwitz и Mueller [25, 26], меченые аминокислоты включались в изолированные ядра HeLa клеток *in vitro* в присутствии цитоплазматической рН<sub>2</sub> фракции и системы, генерирующей энергию. Автордиографически метка была распределена равномерно на ядре. Целью авторов было предварительно определить, какие белки действительно синтезируются в ядре. Обнаружено, что вистоны образуются в рибосомах цитоплазмы клеток [26]. Полученные результаты показали, что новосинтезированные меченые белки были равномерно распространены по всему ядру. Ядерные и микросомные системы продемонстрировали одинаково высокую чувствительность к РНКазе, ДНКазе и ингибиторам синтеза белка. ДНКазе в дозе 50 мкг/мл уменьшает активность включения аминокислот ядер на 60—70% в течение 30 мин инкубации. Предполагают, что основной механизм включения аминокислот может быть одинаковым в обеих внеклеточных системах.

Внешняя мембрана и ее частицы не ответственны за белоксинтезирующую активность ядер (БСА). Синтез белка является функцией системы, присутствующей в ядре. В качестве кандидата на эту роль были идентифицированы в электронном микроскопе в ядрах клеток тимуса, печени и HeLa ядерные рибосомы [27—29]. Поскольку их мало, совершенно очевидно, что они ответственны за низкий уровень синтеза белка, наблюдаемый в изолированных ядрах. В ядрах и цитоплазме участвуют сходные ферментные системы синтеза белка. Предполагалось существование ферментов—активаторов аминокислот и транспортных РНК при многообразии конкурирующих реакций с различной чувствительностью к концентрации ионов в ядре по сравнению с микросомной системой. Этот факт может объяснить эффективность подобных систем. В исследованиях синтеза белка в ядрах и цитоплазме показана различная природа синтезированных белков по электрофоретическому распределению с ПААГ. При электрофорезе

продукта, синтезированного *in vitro* микросомами, изолированными из клеток во время синтеза ДНК, основными являются отчетливые полосы радиоактивных гистонов; такие полосы отсутствуют в продукте ядерной системы тех же клеток, хотя гистоны составляют большую часть белка ядра. Цель исследования заключается в том, чтобы доказать связь этих белков с функцией ядра, возможно они могут исполнять какие-то специальные функции в регулировке экспрессии генов или при репликации хромосом.

Вигман, Лонгеу [13] изучали синтез белка выделенными ядрами из незрелых нервных клеток, активно делящихся и злокачественных нейроblastов головного мозга взрослых крыс. По данным авторов, синтез белка нарушается, если ядра обработать неионным детергентом, тритоном X-100 или гипертонической сахарозой. Пуромидин и циклогексимид в концентрации 50—100 мкг/мл тормозят включение радиоактивной аминокислоты на 87 и 76% соответственно. Это показывает, что синтез белка в ядрах головного мозга происходит при помощи сходных механизмов в других исследованных системах. РНКаза не влияет на включение меченых аминокислот. Было также обнаружено, что синтез белка более активно происходит в глияльных ядрах по сравнению с нейрональными.

Как отмечают Reid и соавт. [30], различные белки могут быть синтезированы в ядре, но скорость синтеза этих белков отличается.

Вслед за вышеперечисленными работами Rein [15] опубликовал результаты изучения ядерного синтеза белка в нейрональных и глияльных клетках головного мозга крыс. Включение аминокислоты в белки ядер головного мозга происходит приблизительно в 3 раза активнее, чем в белки ядер печени. Наблюдалась возможность влияния цитоплазматических загрязнений на ядерный синтез белка. Кроме того, исследовалось влияние тритона X-100 на ультраструктуру ядер и частично на их опоспособность синтезировать белки. Присутствие ионов калия сильно тормозит включение аминокислот при любом pH. Присутствие ионов натрия обязательно. Работы Alfrey и соавт.

в основном подтверждают точку зрения, что синтез белка в ядре зависит от  $\text{Na}^+$  [31—33], а в цитоплазме этот процесс требует  $\text{K}^+$  [34]; выявлена неодинаковая способность изолированных ядер различных типов клеток головного мозга к эндогенному синтезу белка.

Работа Dravid, Wong [16] по исследованию включения [ $^{14}\text{C}$ ] аминокислот в белок изолированными ядрами головного мозга крыс показывает, что в совершенно стерильных условиях  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ , РНКаза, ДНКаза, пуромидин, циклогексимид и хлорамфеникол не влияют на способность ядер печени и головного мозга включать меченые аминокислоты в белок. При увеличении преинкубации некоторые факторы, существенные для включения аминокислот, выводятся из ядра в среду.

Эти авторы, так же как и Rein [15], выявили неоднозначную способность изолированных ядер из головного мозга и печени крыс к эндогенному синтезу белка.

Матиния и Уманский [2], используя в качестве матрицы изолированный хроматин ядер клеток печени крысы, обнаружили, что способностью стимулировать включение аминокислот обладают не только целые ядра, но и очищенный хроматин и комплекс ДНК с прочносвязанными белками. Удельная радиоактивность прочносвязанных негистоновых белков выше, чем лабильносвязанных, в гистоны метка не включается. Величина  $M_r$  выделенных меченых полипептидов, по данным гель-фильтрации и анализа N-концевых аминокислот, равна 6 кД. Меченые полипептиды, прочносвязанные с ДНК, состоят в среднем из 9 аминокислот. Удельная радиоактивность белков, прочносвязанных с ДНК, возрастает линейно с увеличением времени инкубации хроматина с гидролизатом [ $^{14}C$ ] белка, а включение метки в лабильносвязанные негистоновые белки существенно увеличивается только через 30 мин после начала инкубации. Предполагается, что механизм синтеза полипептидов в системе отличается от классического механизма синтеза белка на рибосомах.

В 1978 году вышли две статьи Allen [3] и Goldl [4], в которых отмечается, что если ядра действительно способны синтезировать белок, то, по крайней мере, некоторые продукты трансляции должны быть уникальными для ядра, то есть не должны обнаруживаться в цитоплазме. Те же белки, которые действительно синтезируются ядерным механизмом, сравнивались *in vitro* как продукты трансляции ядер и цитоплазмы по электрофоретическим свойствам в ПААГ [35, 36]. Установлено, что образцы, полученные при помощи ядерных полирибосом, отличаются от образцов, полученных при помощи цитоплазматических полирибосом. В этих работах не характеризовались ядерно-специфические белки [35]. Тубулин и актин определяли в качестве основных продуктов трансляции выделенных ядер головного мозга новорожденных крыс [37]. Ядерные частицы синтезируют ядерно-специфические белки, которые отсутствуют среди продуктов трансляции цитоплазматических полирибосом. Авторы поддерживают предположение о ядерном синтезе белка.

Allen [4] приводит сведения о различиях между цитоплазматическими и ядерными полирибосомами. Однако нет ответа на ряд важных вопросов: какая часть синтеза белка может быть связана с ядром? Во всех ли клетках ограниченное количество ядерных белков может быть синтезировано на месте? Чем ограничено это количество? Ядерные белки синтезируются в самом ядре. Такой взгляд считался общепринятым до тех пор, пока не было показано, что основные классы ядерных белков синтезируются на цитоплазматических рибосомах (гистоны, негистоновые хромосомные белки). Данные о доли синтеза клеточного белка располагаются в порядке убывания следующим образом: 30% в ядрах тимоцитов теленка [38]; 10% в ядрах мышц [39] и ядрах клеток HeLa [40] и 0,2% в ядрах бластул, выделенных из морского ежа [41]. Allen приводит данные о том, что 0,4—0,8% от общего клеточного синтеза белка может быть ядерным.

Около 1% синтеза общеклеточного белка можно связать с ядрами различных клеточных типов.

Известно, что агрегатный фермент способен включать рибонуклеотидные трифосфаты в РНК. Sekegis и соавт. [42] исследовали включение аминокислот в белок ядер при помощи агрегатного фермента Вейса, который катализирует включение аминокислот в белки и во многих отношениях отличается от хорошо известных рибосомных систем.

Ситвольский, Газарян [10] на изолированных ядрах клеток слюнных желез личинок *Chironomus plumosus* показали, что необходимым условием для осуществления синтеза белка в ядрах является их целостность. Предполагается участие ядерных РНП-частиц в исследуемом процессе синтеза.

Согласно Nasig и Duncan [18], ингибирование синтеза белков в изолированных ядрах зобной железы теленка под действием ДНФ обусловлено не только разобщением окислительного фосфорилирования, но и блокированием транспорта компонентов синтеза внутри ядер. Цитидин и гуанозин, ингибирующие процесс ядерного фосфорилирования, могут также стимулировать белковый синтез при наличии в инкубационной смеси рибозо-5-фосфата. Фруктозо-1,6-дифосфат, стимулирующий фосфорилирование, может более чем на 50% ингибировать белковый синтез. Предполагается противоположный характер действия рибозо-5-фосфата и фруктозо-1,6-дифосфата на фосфорилирование и синтез белка.

Кузьмина и соавт. [43], используя интактные ядра, исследовали транспорт меченого белка в бесклеточной системе из ядер, изолированных из регенерирующей печени крыс. При этом было показано, что транспорт молекул белка ядер, обработанных тритоном X-100, осуществляется с той же интенсивностью, что и в интактных ядрах. После тотального рентгеновского облучения ядер плотность поровых комплексов на периферии ядра уменьшается, что приводит к задержке выхода меченого белка из ядра в инкубационную среду. Авторы считают, что транспорт белка с импульной меткой из ядра в цитоплазму связан с поровыми комплексами и не зависит от мембранных структур ядерной оболочки.

Казьмин, Щербан [44], изучив скорость синтеза ядерных и цитоплазматических белков ядрами синхронизированных клеток, пришли к выводу об авторегуляции процесса синтеза на протяжении всего митотического цикла. Синтез белков в ядрах исследован не только в нормальных клеточных ядрах, но и некоторых клеточных ядрах экспериментальных опухолевых клеток, например, асцитного рака Эрлиха; клеток HeLa и др., а также на ядрышках опухолевых клеток. Збарский, Перевощикова [45, 46] установили, что скорость включения меченой аминокислоты в ядра нормальных тканей в 1,5—2,0 раза превышает соответствующий показатель в ядрах саркомы М-1 крыс. Выявлена неодинаковая способность изолированных ядер различных типов клеток головного мозга к эндогенному синтезу белка [9, 14—

16]. Синтез белка исследован также в клеточных ядрах молодых животных, в частности у новорожденных телят, морского ежа. Как видно из вышеперечисленных работ, ядерный синтез белка *in vitro* исследован, в основном, в клетках печени и тимуса крыс, зубной железы телят. Но продукт, синтезированный этими клеточными ядрами, окончательно не изучен, как впрочем и в ядрах нейронов головного мозга.

Особо следует отметить механизм синтеза белков в клеточных ядрах, по которому существует несколько предположений. Некоторые авторы допускают, что прикрепленные к внешней мембране ядер рибосомы не несут ответственности за синтез белков [32], так как при отторжении рибосом от мембраны детергентами ядра продолжают синтезировать белки и процесс этот почти не зависит от присутствия обычных ингибиторов синтеза белка. Допускается также, что в клеточном ядре содержатся все необходимые компоненты, тРНК, мРНК и т. д. для автономного синтеза собственных белков [5, 47, 48]. Наряду с этим, внутри ядра есть фермент аминокиллентиды тРНК трансфераза, который присоединяет активированные аминокислоты к готовому пептиду и поэтому, возможно, выполняет функции рибосом [49]. Нами, наряду с другими авторами, показано, что в ядерной БСС рибосомы «не работают», а в рибосомах не срабатывают компоненты, присущие системе ядерного синтеза [32]. Существует чисто умозрительная гипотеза, что при ядерном синтезе срабатывает пятиплетный код, а не триплетный [50]. Сообщается, что белки синтезируются в ядрышке [51, 52], в «ядерных» рибосомах или хроматине [53]. Однозначные указания на наличие в ядре полноценных рибосом до сих пор отсутствуют, не установлено также функциональное значение ядерного синтеза.

Допускается возможность существования собственно ядерных рибосом [54], которые участвуют только в синтезе ядерных белков, но тогда не ясно, каким образом этот автономный синтез в самом ядре связан с цитоплазматическим синтезом. Если ядерный синтез белков действительно реализуется не рибосомным путем, то необходимо выяснить механизм этой функции ядра.

В литературе очень мало работ, посвященных изучению ядерного синтеза белков в нейрональных клетках головного мозга. Выявлена только неодинаковая способность изолированных ядер различных типов клеток головного мозга к эндогенному синтезу белка [9, 14—16]. Мы считаем, что изучение механизма биосинтеза белков в нейрональных ядрах животных, исследование структуры синтезированного ядрами продукта и его природы представляют несомненный интерес с точки зрения распознавания тонких механизмов функционирования клеток мозга.

С целью выяснения вышеперечисленных вопросов мы вели изучение синтеза белков ядрами *in vitro*, постарались выявить физиологическую активность и природу этих белков. В качестве объекта исследования нейроны были выбраны не случайно. Дело в том, что

нейрональные клетки не делятся, находятся в G<sub>0</sub>-фазе и обладают очень большой продолжительностью жизни. Качественный состав клеток в зависимости от фазы их роста почти не меняется и поэтому нейроны могут служить удобным источником для выделения определенного типа белка.

Нам удалось расфракционировать ядра, выделить наиболее гомогенную по плотности и размерам ядерную фракцию в градиенте плотности сахарозы, изучить их БСА под влиянием различных экзогенных факторов. Процесс биосинтеза белка исследовали с помощью [<sup>14</sup>C] аминокислот, инкубируя выделенные ядра в течение различного времени при 37°. Выделенные ядра нейронов в течение 60 мин продолжают синтезировать белки, после чего количественный показатель метки в ядрах стабилизируется, то есть интенсивность радиоактивности при регистрации выходит на плато. Нами исследовано изменение белоксинтезирующей активности ядер нейронов головного мозга в зависимости от времени после выделения. В частности, активность ядер снижается через сутки на 9%, через двое суток—на 20%, а через семь суток—на 58%. Поэтому фракцию ядер старались использовать сразу после выделения. Было показано, что нейрональные ядра головного мозга продолжают синтезировать белки *in vitro* при отсутствии экзогенных факторов (ферменты, смеси гидролизата аминокислот, АТФ и ГТФ и др.). При их добавлении в инкубационную среду (50 нмоль смеси 19 меченых аминокислот, 0,1 мМ ГТФ, 0,5 мМ АТФ, 0,5 мМ фосфоэнолпирувата, 2 мкг пируваткиназы) интенсивность синтеза белка ядрами изменяется весьма незначительно. Добавка меченых аминокислот в течение инкубации в концентрации 50 нмоль, как и в последующие периоды, указывает на то, что увеличение концентрации добавленных аминокислот со временем почти не влияет на скорость синтеза белка ядрами. В ядрах, во-первых, имеются все необходимые компоненты для автономного синтеза определенного количества белков, активирующие ферменты (аминокислоты, АТФ, ГТФ и др.). Во-вторых, большинство ингибиторов рибосомного синтеза белков слабо действуют на уровень ядерного синтеза. В ядрах, очевидно, для самостоятельного синтеза белка имеется полный набор аминокислот и система активации пептидного синтеза. В процессе изучения биосинтеза белков в изолированных ядрах нам удалось установить активное образование продуктов белковой природы. Это подтверждается данными кинетики включения [<sup>14</sup>C] аминокислот ядрами, положительной реакцией на белок по Лоури и наличием аминокислот в кислотном гидролизате, фракционированием меченого ядерного продукта. Таким образом, ядра являются наиболее вероятными органеллами, где осуществляется самостоятельный процесс включения меченых аминокислот в синтезируемые белковые молекулы.

Нами также показано, что ядра клеток нейронов кроликов более активно включают меченые аминокислоты в сравнении с ядрами нейронов крупного и мелкого рогатого скота, в связи с чем в дальней-

ших исследованиях мы использовали ядра нейронов кроликов. Наши результаты хорошо согласуются с работами других авторов [9]. Выявлены закономерности изменения скорости синтеза белка в зависимости от возраста животного. Оказалось, что начиная с 5-дневного возраста уровень синтеза белков возрастает и достигает максимума у 30—35-дневных животных. По мере дальнейшего увеличения возраста активность синтеза ядерного белка снижается.

Исследовалось влияние ряда веществ: антибиотики—ингибиторы рибосомного синтеза белков, психо- и нейротропные соединения, алкалоиды и их синтетические производные, ферменты, гормоны, фенольные соединения, фосфоорганические соединения (ФОС), пептиды и ингибитор гликозилирования иммунодепрессант—батриден на БСА ядер нейронов головного мозга кроликов. Полученные результаты позволяют предполагать устойчивость ядерного синтеза белков к антибиотикам рибосомного синтеза белков, например пурамицину, циклогексимиду, белковому ингибитору ризицину и ферментам. Ряд веществ активировал этот процесс, например, такие пептиды как энкефалин, эпиталамин, АКТГ<sub>4-7</sub> [55], а из синтетических алкалоидов такими свойствами обладали N-(β-хлорэтил)-декагидрохинолин, ликорин, лупинин, анабазина гидрохлорид, ФОС и др. Психо- и нейротропные вещества кокаин, стрихнин, амназин, яд кобры и иммунодепрессант, ингибитор гликозилирования—батриден ингибировали этот процесс [56].

По полученным результатам определена специфичность ядерного синтеза белка в сравнении с рибосомным синтезом не только относительно условий образования, но и чувствительности к некоторым экзогенным препаратам, что согласуется с результатами других авторов [12, 14, 16]. Мы выделили среди этих соединений класс активаторов и ингибиторов. Это дает возможность определить функциональное значение этого ядерного продукта при регуляции специфическими веществами скорости и количества синтезируемых белков в ядрах.

По данным Reip и Eweep [15], в ядерных мембранах обнаружены зерновидные шарики в электронном микроскопе, но это еще не указывает на наличие рибосом в ядерных мембранах. В ядерной БСС рибосомы не работают и, кроме того, ядерный синтез белка протекает в присутствии  $Na^+$  [31—33], а рибосомный—в присутствии  $K^+$  [3—4]. Более того, действие экзогенных химических агентов на ядерные мембраны, рецепторы, ферментные системы и на участки, которые отвечают за организацию ядерного синтеза белка, в большой степени зависит и от химического строения объектов воздействия.

Помимо вышеназванных исследований, изучен биосинтез белков в ядрах нейрональных клеток головного мозга при повышении и повышении содержания гормонов щитовидной железы в сыворотке крови. Концентрируемые нервными клетками гормоны щитовидной железы тироксин ( $T_4$ ) и трийодтиронин ( $T_3$ ) имеют большое значение для нормального развития и дифференцировки клеток, а также для

функционирования головного мозга. В ядрах клеток печени [57—62], а также в нейронах головного мозга [63] находятся специфические рецепторы для  $T_4$  и  $T_3$ , являющиеся негистоновыми белками, связанными с ДНК. Однако нет полной ясности в связи с влиянием тиреоидных гормонов на интенсивность и механизм ядерного синтеза белка. При снижении выработки гормонов в организме ядерный синтез белка снижается на 26—34%, а при увеличении гормонов также снижается на 46—57% по сравнению с контролем [63]. Эти данные свидетельствуют о том, что при нарушениях нормального функционирования железы изменяются не только регуляторные биохимические процессы, но и физиологическая деятельность НС, в том числе БСА ее ядер. Наши данные о влиянии  $T_4$  на интенсивность синтеза белков изолированными ядрами хорошо согласуется с работами [64], выполненными на ядрах молочной железы лактирующих крольчих, а также результатами Збарского и Перевошиковой [45, 46] о том, что ядерный синтез белка снижается при патологическом состоянии организма.

Таким образом, скорость нейронального ядерного синтеза белка снижается не только при патологии мозга, но и при патологии эндокринной системы и вообще при нарушении физиологического состояния организма.

Нами впервые выделены вновь синтезированные меченые белки после инкубации ядер их ТХУ-нерастворимых осадков; их экстрагировали 0,025 М трис+0,192 М глициновым буфером, далее экстракцию продолжали смесью 6 М мочевины, 0,1%-ного ДДС-Na и 0,14 М  $\beta$ -меркаптоэтанолом. Обессоленные и лиофильно высушенные белковые экстракты далее фракционировали на сефадексе G-50 с последующим разделением на высокоэффективном обращеннофазовом жидкостном хроматографе (две фракции выделены электрофоретически). Получены гомогенно меченные пики низкомолекулярных белков с  $M_r$  25—30 и 10—15 кД. Это кратко изложено в предыдущих наших сообщениях [65]. Здесь важно отметить, что ранее такие радиоактивные пики (большой и маленький) получили также другие авторы в ядрах клеток HeLa [12] и в ядрышках печени крыс [17]. Как отмечают некоторые авторы, маленький пик, вероятно, является гистонном, а природа большого пика неизвестна [12, 17]. Другие исследователи отмечают, что гистоны синтезируются не в ядрах, а в цитоплазме клетки и затем переносятся в ядро [66]. Мы выделили два таких радиоактивных пика из ядер нейронов головного мозга крольчих. Методами ЯМР [67], ТСХ [68], ГЖХ [69], кислотного гидролиза и др. показано, что в составе этих белков есть углеводные остатки, а именно: глюкоза, ксилоза и манноза. Содержание ксилозы превышает содержание всех остальных сахаров. Интересно то, что редко встречающийся углевод ксилоза найден, например, в составе гликопротеида сыворотки крови человека [70]. Подтверждением того, что синтезированные ядрами нейронов белки являются гликопротеинами, служит тот факт, что включение [ $^3H$ ] ксилозы в продукт значи-

тельно подавляется ингибитором гликозилирования батриденом [76].

Таким образом, нами установлено, что синтезированные в ядрах нейронов белки являются гликопротеинами. Мы еще раз подчеркиваем, что механизм синтеза белка окончательно не раскрыт, и поэтому трудно объяснить каким образом синтезированные продукты гликозилируются в ядрах. Некоторыми авторами в ядерных мембранах найдены гликозилирующие ферменты [71, 72]. Не исключено, что эти ферменты участвуют в присоединении углеводов к белковому продукту, который образуется в клеточных ядрах. Определен аминокислотный состав этих гликопротеинов [73]. В составе обоих белков преобладают следующие аминокислоты: Lys, Arg, Pro, Leu, Ala и в меньшей степени—His, Ser, Tyr. Белок с  $M_r$  10—15 кД содержит больше кислых аминокислот Asp, Glu, но не содержит 1/2Cys и Met, в отличие от белка с  $M_r$  25—30 кД. В структуре углеводной части в основном имеются ксилоза, манноза и глюкоза [69].

Нами начато изучение физиологической активности выделенных гликопротеинов из ядер клеток нейронов, параллельно также белков ядер печени и тимуса. Из ядер клеток печени и тимуса вновь синтезированные белки нами взяты для сравнения их с ядерными белками нейронов. По предварительным данным было показано, что гликопротеины ядер (мозга, печени и тимуса), взятые в концентрации 200 мкг/кг массы тела и введенные внутривенно, стимулируют двигательную активность (ДА) и поведенческие реакции. На ДА оказывают наиболее сильное влияние неразделенные фракции и выделенные I ( $M_r$  25—30 кД) и II ( $M_r$  10—15 кД) белки печени и тимуса [74]. Белки мозга обладали наиболее слабым действием на ДА из всего ряда исследованных белков. Для того, чтобы дать окончательное заключение о характере действия указанных белков, необходим детальный анализ с применением ряда тестов и, главное, с введенным белком непосредственно в мозг.

Внутрикортикально введенный гликопротеин с  $M_r$  10—15 кД из ядер нейронов в соответствии с массой животного в дозе 3 мкг вызывает изменение целого ряда электрофизиологических параметров и активацию поведенческих реакций, отчетливую активацию в лобном отделе коры и мезэнцефалической ретикулярной формации [77]. Меньшие дозы гликопротеина существенных изменений в поведении и ЭЭГ не вызывают, также не изменяют и биоэлектрическую активность гиппокампа. Как показывают наши результаты, синтезированные в ядрах низкомолекулярные гликопротеины усиливают ДА и поведенческие реакции.

В связи с тем, что ядерные гликопротеины оказывают влияние на ДА животных, изучена БСА ядер при действии нейро- и психотропных препаратов (кокаина, стрихнина, аммиака и яда кобры), введенных в ушные вены животных. При этом обнаружено резкое снижение скорости синтеза гликопротеинов в сравнении с контролем. Кокаин в концентрации 8 мкг/кг на 94% ингибирует образование бел-

ков в ядрах в опытах *in vivo*, стрихнин (0,2 мк/кг)—на 72%, аминазин (1,4 мг/кг)—на 58% и яд кобры (0,1 мг/кг)—на 70%.

При кратковременном и продолжительном действии эндогенно введенных нейротропных препаратов установлены количественные изменения в кинетике БСА ядер клеток, которые влияют на соотношение образования низкомолекулярных нейрональных гликопротеинов [75].

Исследование действия различных нейротропных препаратов на синтез белков в ядрах нейрональных клеток позволит получить сведения о функциональном состоянии ядерной мембраны, и послужит модельной системой для изучения процессов, связанных с кодированием информации памяти. Для сравнения синтезированных продуктов различных клеток ядра инкубировались в одинаковых стандартных условиях и экстрагировались в соответственно равных условиях. Для выделения ядер нейронов применялся метод градиента сахарозы различной плотности. Мы провели сравнительное изучение белков, синтезированных *in vitro* ядрами нейронов головного мозга, клеток печени и тимуса кроликов. Оказалось, что несмотря на близость значения величин  $M_r$  белков, синтезированные *in vitro* в ядрах нейронов мозга белки нейронов отличаются от белков печени и тимуса не только по аминокислотному составу, содержанию нейтральных сахаров, У.А. синтеза, характеру действия на ДА животных, но и по динамике титра антителообразования у животных, иммунизированных этими белками [74].

Полученные нами данные указывают на существенные различия в путях биосинтеза белков в ядрах нейронов головного мозга и рибосомах цитоплазмы, а также их различную чувствительность к одним и тем же воздействиям. Эти факты позволяют формировать понятие об уникальности происхождения БСА ядер и самостоятельном функциональном значении этого процесса. Результаты наших исследований подтвердили предположения многочисленных авторов о том, что ядра снабжены всеми необходимыми компонентами для самостоятельного синтеза белка, что реализуется, по-видимому, не матричным путем, а при помощи комплекса мультиферментной системы.

## PROTEIN SYNTHESIS IN THE NUCLEI OF BRAIN NEURONS

SAITMURATOVA O. Kh.

A. A. Sadykov Institute of Bioorganic Chemistry, Academy of Sciences of the Uzbek. SSR, Tashkent

This paper summarizes literature and experimental data of the author on the role of cell nuclei in protein synthesis as well as on the mechanism of protein synthesis in the nuclei. Data are presented on the incorporation of labeled amino acids into nuclear proteins, their isolation, studies on the nature, organ specificity on the effect of these proteins on the motor activity of animals.

## Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Челидзе П. В., Зацепина О. В. Тезисы докл. IX Всесоюзн. симпозиума «Структуры и функции клеточного ядра», Черногоровка, с. 38, 1987.
2. Матинян К. С., Уманский С. Р. Биохимия, т. 43, вып. 1, с. 111—120, 1978.
3. Allen W. R. Trends in Biochem. Sciences, v. 3, № 10, p. 225—228, 1978.
4. Gold J. A. Trends in Biochem. Sciences, v. 3, № 10, p. 228—230, 1978.
5. Георгиев Г. П. Ядра. Цитология ферментов, с. 32—37, М., Мир, 1971.
6. Гудникова М. Н., Шевченко Н. А., Бойков Ю. И., Митрохин Ю. И., Тодоров И. Н. Биохимия, т. 50, вып. 12, с. 1990—1996, 1985.
7. Carthy K. M., Parson T. J., Carter A. W., Jastro J. J. Biol. Chem., v. 41, № 23, p. 5489—5499, 1966.
8. Кедровский Б. В. Цитология, т. 3, № 3—4, с. 312, 1961.
9. Джохадзе Д. И., Ракивашвили Н. Р. Сообщ. АН ГрузССР, № 3, с. 298—305, 1975.
10. Ситвольский Н. С., Газарян К. Г. Цитология, т. 18, № 11, с. 1403—1408, 1976.
11. Розгоны Н. И., Галас В. Л. Докл. АН СССР, т. 5, № 5, с. 449—451, 1977.
12. Zimmerman E. F., Nachev J., Nelson P., Arias J. Biochemistry, v. 18, № 6, p. 2636—2644, 1969.
13. Laval M., Bouteille M. Experimental Cell Research, v. 79, № 2, p. 401—403, 1973.
14. Burdman J. A., Jouney J. L. J. Neurochemistry, v. 16, p. 493—500, 1969.
15. Lovtrup-Fain H., Mc Eween B. S. Brain Res., v. 19, p. 433—444, № 3, 1970.
16. David A. P., Wong E. J. Neurochem., v. 19, p. 2707—2725, 1972.
17. Laval M., Mouti Y. Biochemic. v. 58, p. 1137—1179, 1976.
18. Nasir B., Duncan D. Biochem. Med., v. 8, № 3, p. 464—471, 1973.
19. Кузьминская А. С. и др. Цитология, т. 16, с. 575—581, 1974.
20. Джохадзе Д. И. Биохимические особенности клеточных ядер различных тканей, с. 176, Тбилиси, 1977.
21. Дурмишидзе С. В., Джохадзе Д. И. Докл. АН СССР, т. 242, № 2, с. 453, 1978.
22. Shirley M. A., Anderson K. M. Int. J. Biochem., v. 10, № 3, p. 251—256, 1979.
23. One H., Tarayama H. Biochim. et biophys. acta, v. 166, № 1, p. 175—185, 1978.
24. Umansky S. R., Matinyan K. S., Torarsky V. J. European G. J. Biochem. v. 105, № 1, p. 117—129, 1980.
25. Gallwitz D., Mueller G. C. European Journal of Biochemistry, № 9, p. 411—413, 1969.
26. Gallwitz D., Mueller G. C. Science, v. 163, p. 1351, 1969.
27. Frenster J. H., Allfrey V. G., Mirsky A. E. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, v. 7, 46, p. 432, 1960.
28. Wang T. Y. Biochim. et biophys. acta, v. 49, p. 108, 1961.
29. Winckelmans D., Hill M., Errera M. Biochim. et biophys. acta, v. 80, p. 52, 1964.
30. Reid B. P., Stellwagen P. H., Cole R. D. Biochim. et biophys. acta, v. 155, p. 583, 1968.
31. Allfrey V. G., Hopkins J. W., Frenster J. H., Mirsky A. E. Ann. N. Y. Sci., v. 88, p. 722—740, 1960.
32. Allfrey V. G. J. Cell. Biol., v. 21, p. 213, 1964.
33. Allfrey V. G., Meadt R., Hopkins J. W., Mirsky A. E. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 47, p. 907—912, 1961.
34. Sachs H. J. Biol. Chem., v. 233, p. 643—649, 1958.
35. Chatterjee N. K., Dickerman H. W., Beach T. A. Arch. Biochem. and Biophys., v. 183, p. 228, 1977.
36. Pederson T. J. Mol. Biol., v. 82, p. 163, 1974.
37. Lipman F. Science, v. 173, p. 875, 1971.

38. *Gold J. A., Canani D., Bonblk M., Weissbach H., Dickerman H.* J. Biol. Chem., v. 250, p. 9198, 1975.
39. *Allen W. R., Will F. H.* Exp. Cell. Res., v. 97, p. 151, 1975.
40. *Phillips W. F., Conkey Mc E. H.* J. Biol. Chem., v. 251, p. 2876, 1976.
41. *Gold J. A., Canani D., Boublik M., Weissbach H., Dickerman H.* Proc. Fed. Am. Soc. Exp. Biol., v. 34, p. 706, 1975.
42. *Sekeris C. E., Schmid W., Gallwitz D., Lukacs O.* Life Sci., v. 5, p. 969—975, 1966.
43. *Кузьмина С. Н., Бульдьева Т. В., Троицкая Л. П.* Докл. АН СССР, т. 250, № 4, с. 1005—1008, 1980.
44. *Казьмин С. Д., Щербан С. Д.* Биохимия, т. 45, вып. 1, с. 28—34, 1980.
45. *Збарский И. Б., Перевощикова К. А.* Вопр. мед. химии, т. 6, вып. 1, с. 34—40, 1960.
46. *Збарский И. Б., Перевощикова К. А.* Биохимия, т. 22, вып. 1—2, с. 295—304, 1957.
47. *Wilson S. N., Hoagland M. B.* Proc. Nat. Acad. Sci., v. 54, № 2, p. 600—607, 1965.
48. *Frenster I. G., Allfrey V. G., Mirsky A. E.* Nat. Acad. Sci., v. 46, № 4, p. 432—444, 1960.
49. *Шапоиль Ф., Энни А. Л.*—В кн.: Биосинтез белка, с. 264—279, М., Мир, 1977.
50. *Крик Ф.* Природа, № 3, с. 25—26, 1978.
51. *Brinsteel M. L., Hyde B. B.* J. Cell Biol., v. 18, № 1, p. 41—50, 1963.
52. *Anderson K. M., Crosthwaite H. C., Slavic M.* Exp. Cell Res., v. 66, p. 273—282, 1971.
53. *Gurley J. R., Walters R. A., Enger M. D.* Biochem. and Biophys. Res. Commun., v. 40, № 2, p. 428—436, 1970.
54. *Стрелков Л. А., Чаурули Н. Б., Кафиани К. А.* Молекуляр. биология, т. 17, вып. 5, с. 10—17, 1983.
55. *Саитмуратова О. Х.* ДАН УзССР, № 5, с. 47—48, 1988.
56. *Саитмуратова О. Х.* Нейрохимия, т. 8, № 1, с. 149—150, 1989.
57. *Азимова Ш. С., Петрова О. С., Абдукаримов А. А.* Биохимия, т. 50, вып. 1, с. 114—121, 1985.
58. *Серкс М., Оппенгеймер Дж.*—В кн.: Взаимодействие гормонов с рецепторами, М., с. 364, 1979.
59. *Gulton V. A., Schaufsma G.* Endocrinology, v. 112, № 6, p. 1919—2006, 1983.
60. *Ungar G.* Internat. rev. of neurobiology, New York. Acad. Press. v. 17, p. 37—60, 1975.
61. *Bres O., Eales I. G.* Gen. and Comp. Endocrinol., v. 61, № 1, p. 29—39, 1986.
62. *Erkenbrack D. E.* Endocrinology, v. 119, № 1, p. 311—317, 1986.
63. *Саитмуратова О. Х., Туракулов Я. Х.* Узб. биол. журн., № 2, с. 5—9, 1988.
64. *Цветкова Н. Я.* Бюллетень Всесоюзного научно-исследовательского института физиологии и биохимии с/х животных, вып. 3, с. 19—20, 1970.
65. *Саитмуратова О. Х., Ахмедова Д., Рашидходжаева Г., Леонтьев В. Б.* Узб. биол. журн., № 6, с. 67—69, 1979.
66. *Gurley L. R., Enger M. D., Walsters R. A.* Biochemistry, v. 12, № 2, p. 237—245, 1973.
67. *Леонтьев В. Б., Мухамедханова С., Саитмуратова О. Х., Ахмедова Д., Рашидходжаева Г.* Тезисы докл. Всесоюзн. конф. по ЯМР спектроскопии высокого разрешения, Ташкент, Изд-во «Фан», с. 97, 1979.
68. *Саитмуратова О. Х., Ахмедова Д., Алимходжаева Г.* Химия природн. соедин., № 6, с. 791—792, 1983.
69. *Саитмуратова О. Х., Немцова О. Г., Леонтьев В. Б.* Химия природн. соедин., № 4, с. 565—567, 1987.

70. *Rajendra V., Arthur H. Y.* Carbohyd Res., v. 87, № 2, p. 343—351, 1980.
71. *Gardon D. H., Snow C. M., Senior A.* et al. The Journal of Cell Biology, v. 104, № 5, p. 1157—1164, 1988.
72. *Hart G. W.* 14-th International Congress of Biochemistry, MO: S 21—4. v. 1, p. 20, Prague, 1988.
73. *Саитмуратова О. Х., Леонтьев В. Б., Ахмедова Д., Рашидходжаева Г.* Узб. биол. журн., № 4, с. 62—63, 1980.
74. *Саитмуратова О. Х.* Нейрохимия, т. 8, № 1, с. 70—71, 1989.
75. *Саитмуратова О. Х., Рустамова Ф., Садыков А. А., Леонтьев В. Б.* Нейрохимия, т. 6, № 3, с. 360—367, 1987.
76. *Саитмуратова О. Х., Хазбиевич И. С., Насыров С. Х.* ДАН УзССР, № 9, с. 46—48, 1986.
77. *Саитмуратова О. Х.* ДАН УзССР, № 5, с. 53—55, 1987.

Поступила 20.11.1990