



УДК 612.822+612.8.015+577.352

ДИНАМИКА ВКЛЮЧЕНИЯ $[^3\text{H}]$ ЛЕЙЦИНА В БЕЛКИ ЦНС ВИНОГРАДНОЙ УЛИТКИ ПРИ ОБУЧЕНИИ

ГРИНКЕВИЧ Л. Н.

Институт автоматики и электрометрии СО АН СССР, Новосибирск

Изучали включение $[^3\text{H}]$ лейцина в водорастворимые белки ЦНС виноградной улитки на ранних стадиях формирования условного оборонительного рефлекса. Методом диск-электрофореза в ПААГ показано, что при этом многократно повышается содержание кислого нейроспецифического белка с подвижностью (R_f) 0,58 без усиления включения меченого предшественника. Высказывается предположение о посттрансляционных модификациях белка-предшественника, либо выходе его в цитоплазму из клеточных структур в процессе обучения.

Предполагается наличие причинно-следственной связи увеличения количества этого белка в цитоплазме с ростом возбудимости нейрона и ориентировочным поведением, необходимым компонентом формирования условной связи. Кроме того, зарегистрировано увеличение включения метки в две особо кислые белковые фракции на всех изученных стадиях обучения и небольшое угнетение включения метки в белки с $R_f < 0,5$ спустя 7—24 ч после обучения.

Высшие беспозвоночные (в нашем случае *Helix pomatia*) являются наиболее распространенным объектом электрофизиологических и поведенческих исследований в связи с относительно «простым» устройством НС и наличием гигантских нейронов. У этих животных идентифицированы клеточные элементы, принимающие участие в формировании нескольких оборонительных и пищевых условных рефлексов [1—3], интенсивно изучаются клеточные аналоги обучения, позволяющие сопоставить нейрональные и поведенческие изменения [2—4], получены интересные результаты, касающиеся ионных механизмов обучения, опосредованных активацией вторичных посредников, протеинкиназ и фосфорилированием синаптических белков [5—8]. Однако обнаруженные мембранные изменения удовлетворительно описывают только картину кратковременной памяти и не объясняют происхождения следовых реакций, сохраняющихся длительное время, поэтому изучение метаболизма информационных макромолекул и их роли в формировании и сохранении следа памяти продолжает оставаться актуальным.

В предыдущих работах нами было показано, что формирование условного оборонительного рефлекса у виноградной улитки сопровождалось ко-

личественными изменениями кислых нейроспецифических белков как в суммарном гомогенате ЦНС [9], так и в некоторых клеточных элементах условиорефлекторной сети [10, 11]. Ранние стадии обучения характеризовались резким увеличением количества белка с R_f 0,58 при исследовании в 7,5%-ном ПААГ. Закрепление рефлекса приводило к возвращению к контролльному уровню, при достижении 100% критерия обученности повышенное количество кислых мозгоспецифических белков оставалось только в командных нейронах этого оборонительного рефлекса [10, 11].

В настоящей работе для выяснения причин наблюдаемых изменений в содержании исследуемых мозгоспецифических белков была проведена серия экспериментов по включению изотопной метки в белки ЦНС виноградной улитки на различных этапах обучения.

Материалы и методы

Эксперименты проведены на половозрелых улитках *Helix pomatia*, у которых вырабатывали условный оборонительный рефлекс закрытия дыхательного отверстия [1, 9], условным стимулом служило легкое постукивание по раковине, безусловным — струя воздуха, направленная в дыхательное отверстие. Улитки получали по 15 сочетанных либо несочетанных стимулов в день с интервалом 3—5 мин. Для достижения 100%-ного уровня обучения обычно необходимо 180—240 сочетаний.

После получения 15, 30, 60 и 120 сочетанных стимулов извлекали подглоточный комплекс ганглиев, который затем инкубировали в 2 мл физиологического раствора, содержащего [3 H]лейцин, (1,45 [3 H]лейцина 130 Ки/ммоль), либо [3 H]гидролизат белка в концентрации 0,1 мКи/мл. После 2-часовой инкубации ганглий отмывали, экстрагировали водорастворимые белки, которые подвергали диск-электрофорезу в 7,5%-ном ПААГ в системе Ористейна-Дэвиса [11]. Электрофорез проводили в вертикальных пластинах, одновременно анализируя 5 опытных и 4 контрольных образца. В карман для анализа наносили по 200 мкг белка. После окончания электрофореза гели фиксировали и окрашивали амидочерным 10Б («Reanal», Венгрия). Сканирование проводили на денситометре Scan-40 («Milhan», Англия). После сканирования гели разрезали на фрагменты, которые растворяли в 0,5 мл 30%-ной H_2O_2 при $\pm 50^\circ$ в течение ночи, затем во все флаконы добавляли по 10 мл сцинтиллятора Брея (РРО—4 г, РОРОР—0,2 г, нафталин 60 г, метанол 100 мл, диоксан 800 мл).

Результаты и обсуждение

При исследовании методом диск-электрофореза водорастворимых белков ЦНС виноградной улитки у животных, подвергнутых как ассоциативному (сочетанное), так и неассоциативному (несочетанное нанесение стимулов) обучению обнаружили резкое увеличение количества кислого белка R_f 0,58 на ранних стадиях обучения. При этом ассоциативное обучение в среднем сопровождалось более высоким ростом количества этого белка, по сравнению с неассоциативным, в то время как неассоциативное харак-

теризовалось большей дисперсией (то есть большим разбросом абсолютных значений) (рис. 1). К 90—120 сочетаниям количество белка с R_f 0,58 возвращалось к контрольному уровню. В остальных белковых фракциях достоверных изменений обнаружено не было. Таким образом, полученное различие между ассоциативным и неассоциативным обучением на ранних стадиях формирования оборонительного рефлекса носило только количественный характер в зоне белков с R_f 0,58.

Для изучения механизмов столь значительного увеличения количества кислого мозгоспецифического белка с R_f 0,58 (фракция 10) нами была проведена серия экспериментов с включением радиоактивного предшест-

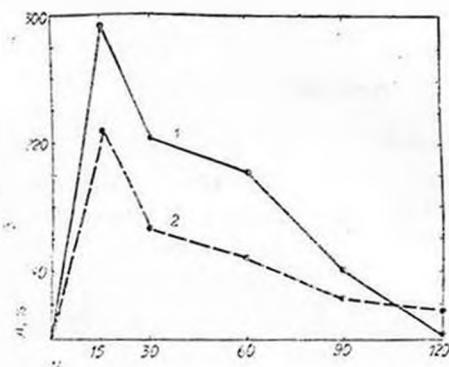


Рис. 1. Диаграмма процентного содержания кислого мозгоспецифического белка с R_f 0,58 виноградной улитки на разных стадиях обучения. 1—ассоциативное обучение, 2—неассоциативное обучение. По оси абсцисс—число сочетаний стимулов, по оси ординат—содержание белка в процентах по отношению к контролю, принятому за 100%; $p < 0,05$

венника на разных стадиях обучения, сразу после обучения и спустя 7 и 24 ч после обучения. При сопоставлении оптического и радиоактивного профилей водорастворимых белков ЦНС виноградной улитки, получивших 15 сочетаний воздействий, обнаружено, что белок фракции 10, количество которого резко возрастало при обучении, является относительно медленно обменивающимся, его количественный и интенсивный рост (на 200—400%) не сопровождался интенсификацией включения метки в расчете на 1 мг белка (рис. 2).

При дальнейшем увеличении количества сочетаний (30—60) наблюдалась тенденция к снижению включения метки и падению уровня включения ниже контрольного (рис. 3). Анализ оптических и радиоактивных профилей спустя 7 и 24 ч после обучения (30 и 120 сочетаний) также не показал увеличения включения метки в эту фракцию (рис. 4).

На всех этапах обучения отмечался рост включения метки в белковые фракции кислых низкомолекулярных белков: во фракцию 12—на 50%, а 13—на 200% относительно контрольного уровня. Особенно ярко этот эффект был выражен при инкубации ганглия сразу после обучения: через 7 и 24 ч уровень включения меченого предшественника остается достаточно высоким (рис. 3, 4).

В других фракциях изменения были не так сильно выражены: в зонах высокомолекулярных белков, где не происходит четкого разделения и суммируются эффекты, имеющие разнонаправленный характер, уровень включения оставался близким к контрольному. Спустя 7 и 24 ч после обу-

чения наблюдалось увеличение числа фракций (№ 4, 7—10), в которые включение метки оказывалось ниже контрольного.

Таким образом, можно заключить, что динамика белкового обмена у виноградной улитки на разных этапах обучения характеризуется достаточно сложной картиной. Интенсивность включения метки широко изменяется от фракции к фракции и претерпевает существенные изменения при активной функциональной нагрузке. На ранних стадиях обучения наблюдается интенсивное увеличение включения метки во фракциях 12 и

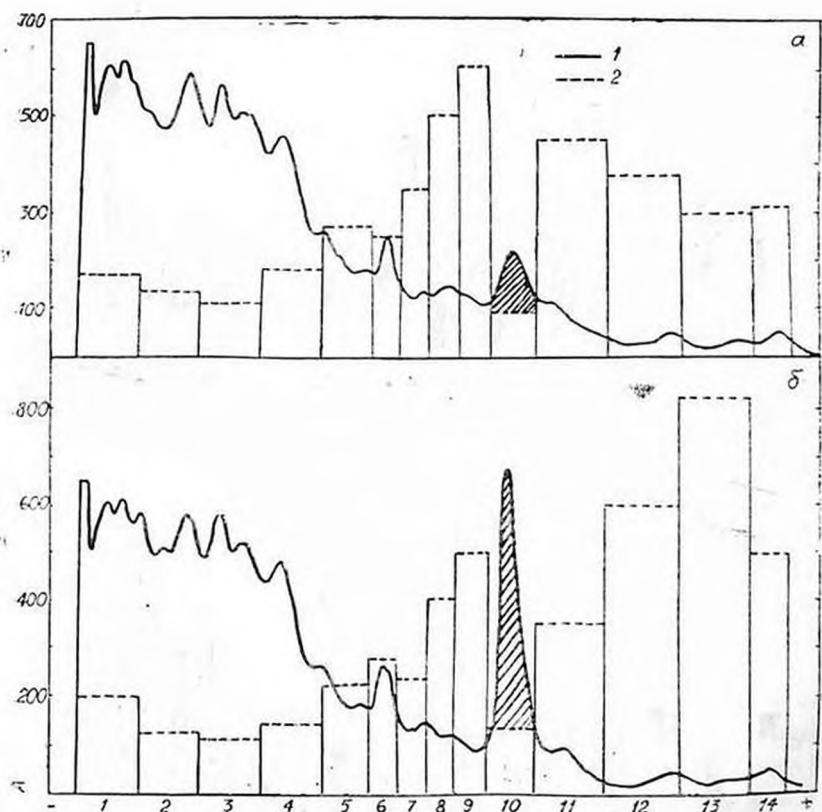


Рис. 2. Диск-электрофорез водорастворимых белков ЦНС виноградной улитки в 7,5%-ном ПААГ, в контроле (а) и после обучения (30 сочетаний) (б). 1—оптический профиль, 2—профиль радиоактивности. По оси абсцисс—номера фракций. По оси ординат—радиоактивность (А) в $\text{нкп}/\text{мин}/\text{мкг}$ белка

13, не сопровождающееся достоверным ростом их количества. В используемой нами системе электрофореза в этих фракциях наибольшей подвижностью отличаются кислые низкомолекулярные белки, преимущественно мозгоспецифические. Таким образом, вероятнее всего, эти белки, подвергаясь дальнейшему гидролизу, выполняют модуляторную роль в функционировании ЦНС и, являясь низкомолекулярными, в дальнейшем не реги-

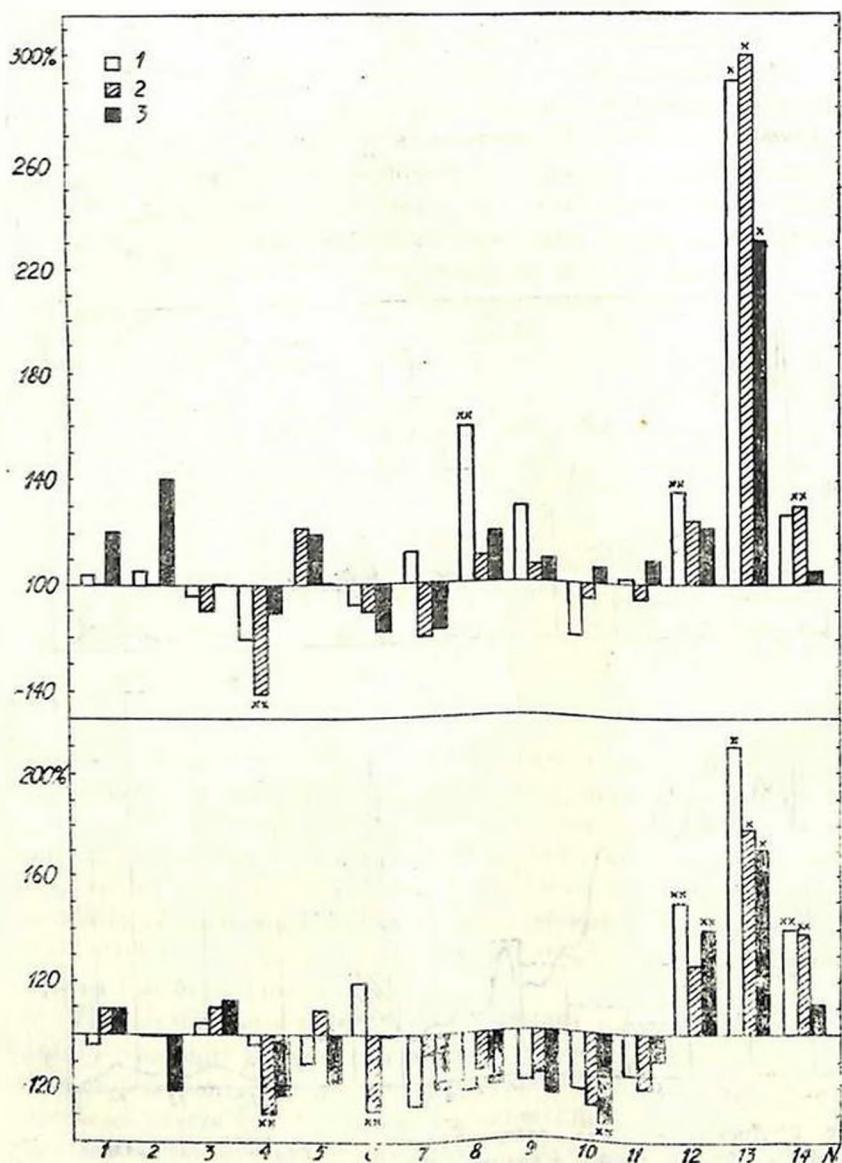


Рис. 3. Диаграммы включения радиоактивного предшественника ($[^3\text{H}]$ лейцина) в белковые фракции обученных улиток относительно контрольных через 30 мин после обучения: 1—обучение, 15 сочетаний, $n=5$; 2—30 сочетаний, $n=9$; 3—60 сочетаний, $n=7$. Здесь и на рис. 4, по оси абсцисс №№ фракций, по оси ординат—изменение включения метки в % по отношению к контролю. Контроль принят за 100%. * $p<0,01$; ** $p<0,05$ (по отношению к контролю)

Рис. 4. Диаграмма включения радиоактивного предшественника ($[^3\text{H}]$ гидролизат белка) в белковые фракции обученных улиток относительно контрольных: 1—50 сочетаний через 7 ч после обучения, $n=9$; 2—120 сочетаний через 7 ч после обучения, $n=8$; 3—120 сочетаний через 24 ч после обучения, $n=8$

стрируются используемой системой детекции. Незначительное угнетение включения метки во фракции менее подвижных белков свидетельствует о сложных перестройках ЦНС, подвергнутой активной функциональной нагрузке [10].

Резкое увеличение количества мозгоспецифического белка с R_f 0,58 (10-я фракция) не сопровождается изменением интенсивности включения метки. Таким образом, увеличение его содержания в цитоплазме не может быть объяснено увеличением скорости синтеза. Среди возможных причин этого феномена можно предположить выход белка из мембранных или иных клеточных структур, ироцессинг медленно обновляющегося предшественника, распад на активные субъединицы крупного структурного белка и некоторые другие посттрансляционные изменения.

Принимая во внимание тот факт, что ранние стадии обучения характеризуются ростом возбудимости нейронов, нельзя исключить возможность аналогии описываемого белка каталитической субъединице протеинкиназы, выходящей из мембраны в цитоплазму после взаимодействия с cAMP ее регуляторной субъединицы [12]. По современным представлениям, фосфорилирование белков K^+ -каналов посредством протеинкиназ может обеспечивать пластичность рефлексов.

Методом микроколоночной гель-фильтрации на сефадексе G-75 было установлено, что нативный белок с R_f 0,58 имеет M_r 44 кД, что близко величине M_r актина (43 кД), который при обучении может деконденсироваться из комплекса с тубулином.

В настоящее время показано, что при долговременном обучении модифицируются те же синапсы и K^+ -каналы, что и при краткосрочном [12]. Однако для длительного поддержания их в этом состоянии необходим синтез макромолекул [13, 14]. В связи с этим Kandel и Shwarz предположили возможность синтеза новых регуляторных субъединиц протеинкиназы с высокой константой связывания cAMP [13]. Однако Greenberg и соавт., проверяя эту гипотезу на LE сенсорных нейронах аплиции при долговременном обучении, не обнаружили синтеза новых регуляторных субъединиц протеинкиназы, а показали уменьшение количества R-субъединиц по отношению к каталитическим. При этом не исключена вероятность усиления синтеза специфических протеаз либо инициации синтеза репрессора генов регуляторных субъединиц [15].

Таким образом, можно полагать, что наиболее кислые нейрэспецифические белки (фракции 13 и 14), синтез которых увеличивается при обучении и сохраняется на высоком уровне длительное время, а затем остается повышенным в отдельных командных нейронах оборонительного рефлекса, могут претендовать на роль посредников «обучения» с генетическим аппаратом нервных клеток.

Ранние стадии обучения у моллюсков характеризуются генерализованной реакцией всей НС, увеличивается возбудимость основной массы нейронов. Ассоциативное обучение отличается от неассоциативного только количественной величиной эффекта как на мембранным [5] (пластичность K^+ -каналов), так и на изученном нами цитоплазматическом уровне.

Количество белка с R_f 0,58, резко повышенное в цитоплазме на ранних стадиях формирования рефлекса, при его закреплении возвращается к контрольному уровню. Исходя из этого, нами было высказано предположение о причинно-следственной связи увеличения количества этого белка в цитоплазме с ростом возбудимости нейрона и ориентировочным поведением. В пользу предположения о количественном перераспределении белка с R_f 0,58 между мембраной и водорастворимой фракцией свидетельствуют предварительные данные о наличии этого белка в мембранный фракции (метод иммуноферментного анализа), низкая скорость обмена, отсутствие увеличения интенсивности включения меченого предшественника при значительном росте количества. Таким образом, ранние стадии формирования как ассоциативного, так и неассоциативного поведения имеют общий компонент, который, вероятно, является необходимым условием формирования условной связи. Наиболее кислые нейроспецифические белки (фракции 12 и 13), уровень синтеза которых остается повышенным при долговременном обучении и сохраняется в отдельных командных нейронах оборонительного рефлекса при закреплении связи [9], являются более вероятными кандидатами на роль факторов, «кодирующих» память.

Для выяснения роли генома в формировании оборонительного рефлекса и поиска генов, экспрессия которых увеличивается в процессе обучения, у виноградной улитки *Helix pomatia* нами выделена высокомолекулярная ДНК и на основе вектора ЕМБЛ-3А создана библиотека генов.

Дальнейшее изучение физико-химических характеристик, внутриклеточной локализации и генной экспрессии этих белков будет способствовать выяснению их роли в функционировании метаболического аппарата нервной клетки и пластических перестройках при обучении.

THE INCORPORATION OF LABELED PRECURSORS INTO PROTEINS OF THE SNAIL CENTRAL NERVOUS SYSTEM DURING LEARNING

GRINKEVICH L. N.

Institute of Automation and Electrometry, Siberian Division USSR
Academy of Sciences, Novosibirsk

We studied the incorporation of [3 H]-leucine into water-soluble proteins of the CNS of *Helix pomatia* at early stages of the formation of the conditioned defense reflex. Disc electrophoresis in polyacrylamide gel demonstrated an intensive increase in the amount of the acidic neurospecific proteins having mobility of 0.58 (by 200–400%) as compared with the control. The total incorporation of the labeled precursor expressed as counts/min per mg protein was not increased. The observed effect can either be due to posttranslational modifications of the precursor protein, or to its release into the cytoplasm from cell organelles during learning. It is proposed that the increased level of this

protein in the cytoplasm is associated with the increased excitability of the soma and orientation behavior, which is a necessary prerequisite for the formation of the conditioned reflex. In addition, we observed an increased label incorporation into two extremely acidic protein fractions at all studied learning stages. The label incorporation into proteins with the mobility below 0.5 was somewhat inhibited 7–24 hours after learning.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Литвинов Е. Г., Максимова О. А., Балабан П. М., Масиновский В. П. Журн. высш. нервн. деят-сти, т. 27, вып. 1, с. 203–206, 1976.
2. Литвинов Е. Г., Логунов Д. Б. Журн. высш. нервн. деят-сти, т. 29, вып. 2, с. 284–293, 1979.
3. Максимова О. А., Балабан П. М. Нейронные механизмы пластичности поведения. М., Наука, 1983.
4. Пирузян Л. А., Максимова О. А., Балабан П. М. Докл. АН СССР, т. 270, № 3, с. 751–754, 1983.
5. Kandel E. R., Abrams T., Bernier L., Carew T. J., Hawkins R. D. Molecular neurobiology, v. 48, p. 821–830, 1983.
6. Зубова Т. Г., Крылова А. А., Соколов Е. Н. Журн. высш. нервн. деят-сти, т. 31, вып. 6, с. 1263–1269, 1981.
7. Элкон Д. Л. В мире науки, № 9, с. 34–45, 1983.
8. Farley J., Auerbach S. Nature, v. 319, p. 220–224, 1986.
9. Гринкевич Л. Н., Сафронова О. Г., Штарк М. Б. Бюл. эксперим. биол. и мед., № 10, с. 429–431, 1984.
10. Гринкевич Л. Н. Докл. АН СССР, т. 252, с. 248–250, 1980.
11. Shtark M. B., Grinkewich L. N., Deriy B. N., Zapara T. A., Tretyakov V. P. Neuronal plasticity and memory formation, N.-Y., Raven Press, 1982.
12. Kandel E. R., Schwartz J. M. Science, v. 218, p. 433–443, 1982.
13. Montarolo P. G., Goellet P., Castellucci V. F., Morgan J., Kandel E. R., Schacher S. Science, v. 23, p. 1249–1254, 1986.
14. Goellet P., Castellucci V. F., Schacher S. S., Kandel E. R. Nature, v. 322, p. 419–422, 1986.
15. Greenberg S. M., Castellucci V. F., Baurley H., Schwartz J. H. Nature, v. 329, p. 62–65, 1987.

Поступила 1. VII 1988.