



УДК 612.571.1

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ БЕЛКОВ, СИНТЕЗИРОВАННЫХ *IN VITRO* ЯДРАМИ НЕЙРОНОВ ГОЛОВНОГО МОЗГА. С АНАЛОГИЧНЫМИ БЕЛКАМИ ДРУГИХ ТКАНЕЙ

САНТМУРАТОВА О. Х.

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

Проведено сравнительное изучение гликопротеинов, синтезированных *in vitro* ядрами нейронов головного мозга, с белками печени и тимуса кроликов. Показано, что, несмотря на близость величин M_r , синтезированные в ядрах нейронов мозга *in vitro* белки отличаются от белков печени и тимуса по содержанию нейтральных сахаров, величиной У. А. синтеза, воздействием на двигательную активность животных и по динамике антителообразования у животных, иммунизированных этими гликопротеинами.

Включение [^{14}C] аминокислот в изолированные клеточные ядра головного мозга и различных тканей животных [1—9] свидетельствует об автономном синтезе белка и всех необходимых для него компонентов в ядрах [8, 10, 11]. Ядра клеток Hela, ядрышки печени крыс и изолированный хроматин синтезируют белок *in vitro* [1, 6, 8]. Laval, Moule [6] выделяли белки, синтезированные фракцией «ядра-ядрышки» *in vitro* из [^{14}C]аминокислот. При этом радиоактивность распределялась вдоль всей полипептидной цепи. Матинян, Уманский [8], используя в качестве матрицы изолированный хроматин печени крыс, доказали возможность синтеза *in vitro* белков с M_r 6 кД. Однако экспериментальные доказательства белкового синтеза в ядрах различного происхождения не дают представления о природе, органоспецифичности и функции этих белков.

Цель настоящей работы—сравнительное исследование белков, синтезируемых ядрами нейронов головного мозга, с белками, синтезируемыми ядрами клеток печени и тимуса.

Материалы и методы

В опытах использовали кроликов от одного помета по 3—4 животных на опыт (всего 33 животных).

После декапитации животных ткани мозга, тимуса и печени сразу отделяли и ополаскивали холодным раствором 0,9% NaCl.

Выделение ядер из нейронов проводили по Lovtrup-Rein [4] с тем

лишь отличием, что сначала микродиссекцией отделяли серое вещество, нейрональные клетки головного мозга от глияльных клеток и вручную гомогенизировали в холодном растворе 0,32 М сахарозы (1 г/3 мл раствора), содержащей 3 мМ $MgCl_2$ и 1 мМ K_2HPO_4 , pH 7,4, затем гомогенат фильтровали и центрифугировали 15 мин при 3000 об/мин. Остальные процедуры выполняли согласно Lovtrup-Rein [4]. Ядра выделяли в градиенте плотности сахарозы, используя ультрацентрифугу «Beckman» (США), ротор SW-27, 60 мин при 78000 g.

Выделение клеточных ядер из печени. Печень споласкивали 0,32 М сахарозой, содержащей 3 мМ $MgCl_2$, удаляли соединительную ткань и остаточную массу измельчали ножницами до кашицеобразного состояния. Добавляли 0,32 М сахарозу из расчета 4 мл на 1 г ткани, затем 2—3 мин измельчали на микроизмельчителе. Измельченный материал гомогенизировали в гомогенизаторе Поттера, а гомогенат фильтровали через два слоя марли и центрифугировали 10 мин при 700 g. Осадок суспендировали в 2,2 М сахарозе и опять гомогенизировали. Гомогенат насливали на 5 мл 2,2 М сахарозы и центрифугировали 1 ч при 78000 g.

Выделение ядер из тимуса. В расчете на 1 г ткани тимуса добавляли 10 мл 0,25 М сахарозы, содержащей 3 мМ $MgCl_2$, 1 мМ K_2HPO_4 и 2—3 мин ткань измельчали на микроизмельчителе. Затем гомогенизировали в гомогенизаторе Поттера, гомогенат фильтровали через двухслойную марлю и центрифугировали 10 мин при 2500 об/мин. Осадок суспендировали в 20 мл 2,2 М сахарозе и центрифугировали при 5000 об/мин 10—15 мин.

При центрифугировании ядра нейронов головного мозга, печени и тимуса осаждаются на дно пробирки, а обломки клеток и эритроциты собираются в верхнем слое. Полученные ядра еще раз промывали 0,32 М сахарозой и использовали для исследования синтеза белков.

Синтез белка в изолированных ядрах нейронов головного мозга, печени и тимуса изучали в стандартных условиях (по включению [^{14}C]лизина) [12]. Меченые ядерные белки осаждали из инкубационной среды 5%-ным раствором ТХУ. Осадок отделяли центрифугированием (15 мин при 3000 об/мин) и экстрагировали смесью 0,025 М триса и 0,192 М глицинового буфера, pH 8,3. Для обессоливания белков проводили диализ против воды и лиофилизировали.

Гель-фильтрация белков. Величины M_r меченых белков из ядер нейронов головного мозга, печени и тимуса определяли с помощью гель-фильтрации в 0,05 М аммоний-ацетатном буфере, pH 6,06 на колонках (1,1 × 102 см) с сефадексом G-50 (тонкий, «Pharmacia», Швеция), предварительно калиброванных БСА, соевым ингибитором трипсина и цитохромом С («Reanal», Венгрия). Собирали фракции по 4 мл. Образцы по 0,1—0,2 мл просчитывали в жидкостном сцинтилляционном счетчике LS-230 («Beckman», США) в смеси, содержащей 10 мл сцинтилляционной жидкости и 3 мл абсолютного спирта.

Определение нейтральных сахаров. 100 мкг ядерного гликопротеида гидролизovali в 0,5 мл 0,1 н. раствора H_2SO_4 при 80° в течение часа и

после охлаждения добавляли к нему 3 мл 0,1%-ного раствора антрона («Calbiochem», США) в концентрированной серной кислоте. Смесь помещали на 15 мин в кипящую водяную баню. После охлаждения определяли поглощение при 620 нм (калибровочную кривую строили по глюкозе). Содержание белков во фракциях определяли по Lowry и соавт. [13]. Полученные результаты обрабатывали методом вариационной статистики [14].

Действие выделенных электрофоретически гомогенных фракций белков на поведенческие реакции животных определяли по изменению поведенческой активности на приборе «Opto-Wagatax» («Technibol», США), регистрирующем двигательную активность при помощи фотодиодов, расположенных на двух уровнях, что позволяет рассматривать отдельно горизонтальную и вертикальную компоненты двигательной активности.

Для определения физиологической активности исследуемые ядерные белковые фракции вводили внутривентриально в смеси 0,025 М триса и 0,192 М глицинового буфера, pH 8,3, в дозе 200 мкг/кг за 30 мин до начала измерения двигательной активности, которую измеряли в течение 30 мин, то есть с 30 до 60 мин после введения. Контрольным животным вводили воду, буфер или эквивалентное количество БСА. Для получения сыворотки, содержащей антитела к исследуемым гликопротеинам, синтезируемым в ядрах нейрональных клеток и печени, был использован конъюгат суспензии активированной целлюлозы с гликопротеином, выделенным из ядер нейронов мозга и печени. Об интенсивности иммунного ответа судили по реакции пассивной гемагглютинации (РПГА). При перекрестной иммунодиффузии было показано отсутствие специфичности гликопротеинов из ядер нейронов головного мозга по сравнению с гликопротеинами, выделенными из печени, хотя наличие общих детерминантных групп частично и проявлялось.

Белково-целлюлозный комплекс получали конъюгацией гликопротеина из ядер мозга путем 24-часовой инкубации при 4° с активированной суспензией целлюлозы в 0,1 М карбонат-бикарбонатном буфере [22]. Непрореагировавшие гликопротеины удаляли промыванием суспензии физиологическим раствором. Количество иммобилизованного препарата определяли по окрашиванию бромфеноловым синим.

Для иммунизации использовали 10—12 мышей гибридов первого поколения (CBA×C57 BL)-F₁. После однократной иммунизации внутривентриально белково-целлюлозным комплексом наличие антител было показано на 7-й день и достигало максимума на 35-й день, после чего отмечалось снижение интенсивности антителообразования. Характеристику полученной сыворотки проводили методом РПГА.

Результаты и обсуждение

В табл. 1 приведены данные по включению [¹⁴C]лизина в клеточные ядра различных тканей кролика: при одинаковых условиях синтеза белков в ядрах нейронов головного мозга протекает интенсивнее,

чем в ядрах клеток печени и тимуса. Полученные данные хорошо согласуются с имеющимися в литературе [4, 7, 15].

Для сравнительного исследования белков, синтезированных ядрами клеток нейронов головного мозга, печени и тимуса (диализированные и лиофильно высушенные), ядерные белки фракционировали на колонке с сефадексом G-50 в одинаковых условиях. Данные по оптической плотности и радиоактивности фракций элюата представлены на рис. 1.

Таблица 1

Включение [^{14}C]лецина в изолированные ядра клеток различных органов кроликов (n=5)			
Вид ядер	Количество животных	Радиоактивность имп/мин мг ядерного белка	Процент включения
Головной мозг (нейроны)	20	4492±138	100
Печень	15	2884±124	64
Тимус	22	892±121	20

Примечание. Здесь и в табл. 2 различия по сравнению с контролем (нейроны мозга) достоверны, $p < 0,005$.

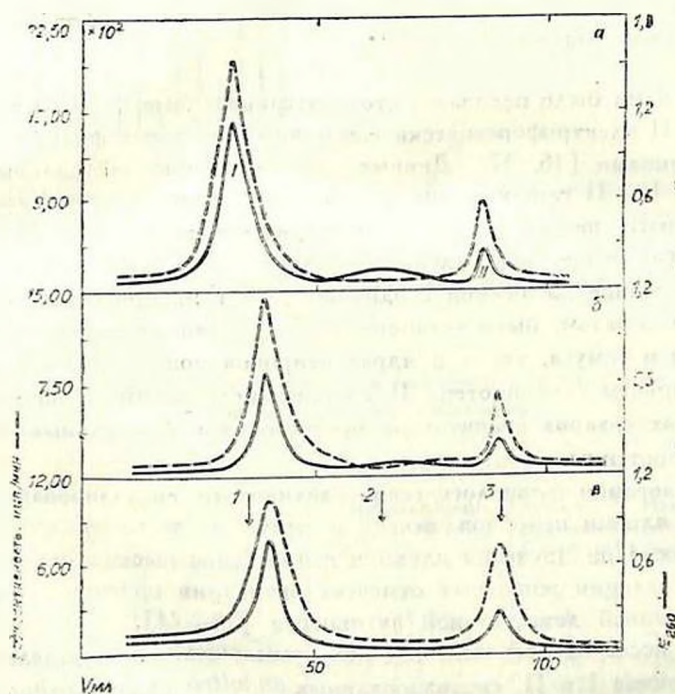


Рис. 1. Гель-фильтрация на сефадексе G-50 белков, синтезированных *in vitro* ядрами клеток различных органов кроликов: а—мозг, б—печень, в—тимус. Маркерные белки: 1—БСА (68 кД), 2—соевый ингибитор трипсина (21 кД), 3—цитохром С (12 кД)

При гель-фильтрации ядерные белки из нейронов головного мозга, печени и тимуса обнаруживают две радиоактивные фракции с M_r 25—

35 (I) и 10—15 (II) кД. По общему количеству фракции I ядерных белков в трех исследованных образцах преобладали над фракциями II. Исследование I и II фракций элюата показало, что пики по оптической плотности и радиоактивности в основном совпадают.

Таким образом, белки, синтезированные *in vitro* ядрами нейронов головного мозга, клеток печени и тимуса кроликов, в основном сходны по величине M_r .

Содержание белков и нейтральных сахаров в синтезированных *in vitro* белковых фракциях ядер различных органов ($n=4$)

Таблица 2

Орган	Гликопротеины	Содержание нейтральных сахаров в % к песу образца белковой фракции	Содержание белков в % к песу образца белковой фракции
Головной мозг (нейроны)	I	$7,0 \pm 1,0$	$26,7 \pm 1,4$
	II	$1,50 \pm 0,49$	$36,0 \pm 1,7$
Печень	I	$3,25 \pm 0,25$	$24,2 \pm 1,7$
	II	$3,0 \pm 0,2$	$8,50 \pm 0,25$
Тимус	I	$8,75 \pm 0,25$	$26,2 \pm 1,3$
	II	$15,50 \pm 0,49$	$32,7 \pm 3,8$

Ранее нами было показано, что синтезированные *in vitro* ядрами нейронов I и II электрофоретически гомогенные белковые фракции являются гликопротеинами [16, 17]. Данные по содержанию нейтральных сахаров в фракции I и II гликопротеинов, синтезированных в ядрах нейронов головного мозга, печени и тимуса, приведены в табл. 2. Содержание нейтральных сахаров во всех ядерных белках колеблется в пределах 1,5—16%, содержание же белков сходно по всем гликопротеинам (26—36%).

Таким образом, было установлено, что белки, синтезированные в ядрах печени и тимуса, как и в ядрах нейронов мозга, являются гликопротеинами, причем гликопротеин II ядерных белков тимуса по содержанию нейтральных сахаров значительно превосходит все остальные исследованные гликопротеины.

Исследования физиологической активности синтезированных гликопротеинов ядрами нейронов, печени и тимуса *in vitro* представляют особый интерес. При изучении влияния нейроспецифических белков на поведенческие реакции животных отмечена активация ориентировочных реакций, спонтанной двигательной активности [18—21].

Нами исследовалось действие как суммарных, так и отдельно взятых гликопротеинов I и II, синтезированных *in vitro* ядрами нейронов головного мозга, печени и тимуса кроликов на одном из широко применяемых интегральных поведенческих показателей—вертикальной двигательной активности животных.

На рис. 2 представлена динамика изменения вертикальной двигательной активности в интервале от 30 до 60 мин после введения гликопротеи-

нов. Введение БСА не приводило к изменениям двигательной активности по сравнению с теми животными, которым инъецировали физиологический раствор. Выделенные из мозга гликопротеины обладали наиболее умеренным действием на двигательную активность из всего ряда исследованных гликопротеинов (рис. 3, а). Наиболее активное возбуждающее действие оказывали гликопротеины ядер печени и тимуса (суммарные гликопро-

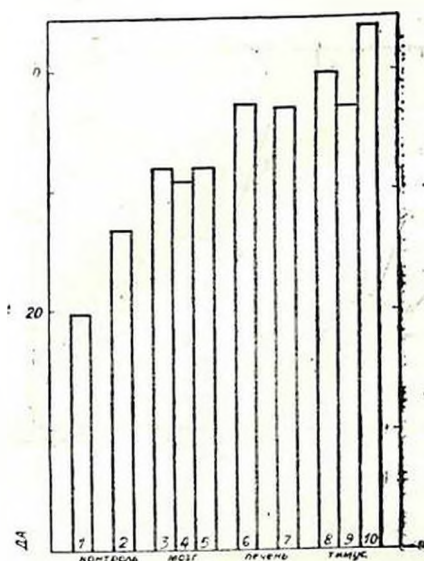


Рис. 2. Изменение динамики вертикальной двигательной активности (ДА) животных под действием гликопротеинов, синтезированных *in vitro* ядрами клеток кроликов: 1—контроль, H_2O ; 2—контроль, буфер; 3, 6, 8—суммарная фракция белков; 4, 9—I фракция гликопротеинов; 5, 7, 10—II фракция гликопротеинов

теины и отдельно фракции I и II, рис. 3, б, в). Способность ядерных гликопротеинов печени и тимуса усиливает двигательную активность, несмотря на относительно низкую скорость их синтеза, может свидетельствовать в пользу информативной значимости органоспецифичных гликопротеинов.

Таблица 3

Первичный иммунный ответ при однократной иммунизации
белково-целлюлозным комплексом

День после иммунизации	Титр антител полученной сыворотки				
	гликопротеин I мозга	гликопротеин II мозга	Нефракционированный гликопротеин мозга	гликопротеин I печени	Нефракционированный гликопротеин печени
4	—	—	—	—	—
7	1:32	1:64	1:16	1:8	1:8
15	1:128	1:128—256	1:156	1:16	1:16
30	1:256	1:256	1:512	1:32	1:32
37	1:512	1:512—1024	1:1024	1:128	1:128

Примечание. Из-за малого количества тимусного гликопротеина иммунизации не проводили.

Результаты проведенных нами исследований позволяют сделать вывод, что фракции I и II гликопротеинов, синтезированные *de novo* ядрами нейронов головного мозга, печени и тимуса, обладают нейроспецифи-

ческим действием повышения двигательной активности животных. Полученные данные позволяют сделать предположение о том, что гликопротеины, синтезированные *de novo* изолированными ядрами, обладая в норме умеренным действием на двигательную активность, могут оказаться эффективными при патологических состояниях. Значения титров антител полученной сыворотки при иммунизации белково-целлюлозным комплек-

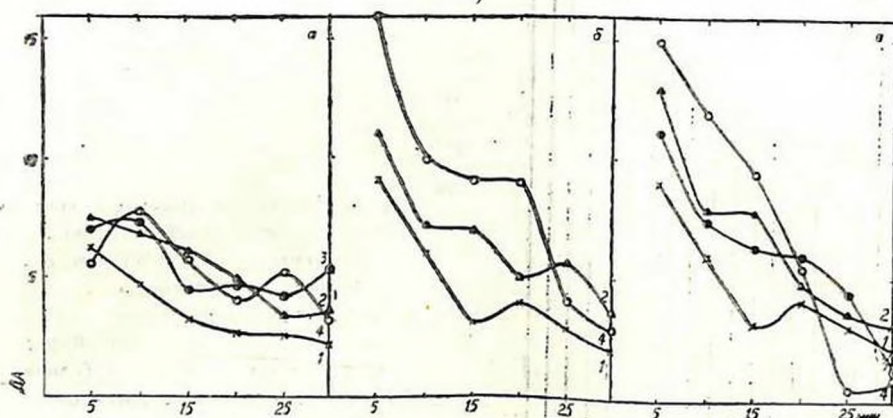


Рис. 3. Изменение вертикальной двигательной активности (ДА) животных под действием гликопротеинов, синтезированных *in vitro* ядрами нейронов головного мозга (а), печени (б) и тимуса кроликов (в). 1—контроль, буфер; 2—суммарная фракция белка; 3—I фракция гликопротеинов; 4—II фракция гликопротеинов

сом представлены в табл. 3. Показано, что гликопротеины, выделенные из ядер нейронов мозга и клеток печени, по своей специфичности отличаются, хотя иммунологически и имеют ряд общих детерминантных групп. Дальнейшие исследования по синтезу иммуносорбента с иммобилизованными антителами позволят выделить в достаточном количестве данные гликопротеины и дать точную их характеристику.

Таким образом, гликопротеины, синтезированные *in vitro* ядрами нейронов головного мозга, сходны по величине M_r с гликопротеинами печени и тимуса, но различаются содержанием нейтральных сахаров, скоростью синтеза белка и нейроспецифической активностью.

COMPARATIVE STUDY OF PROTEINS SYNTHESIZED *IN VITRO* BY NUCLEI OF BRAIN NEURONS AND ANALOGOUS PROTEINS OF OTHER TISSUES

SAITMURATOVA O. H.

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

A comparative study of glycoproteins synthesized *in vitro* by the nuclei of brain neurons, rabbit liver and thymus has been carried out.

It was shown that despite the proximity of their molecular masses, the proteins synthesized *in vitro* in the nuclei of brain neurons differ from proteins of other studied organs in the content of neutral sugars, specific activity, effect upon motor activity of animals and immunological properties.

ЛИТЕРАТУРА

1. Zimmerman E. F., Nackey J., Nelson P., Arias I. *Biochemistry*, v. 8, № 6, p. 2636—2644, 1969.
2. Gallwitz D., Mueller G. C. *Eur. J. Biochem.*, v. 9, № 3, p. 431—438, 1969.
3. Burdman J. A., Journey L. J. *J. Neurochem.*, v. 16, p. 493—500, 1969.
4. Lovtrup-Rein H. *Brain Res.*, v. 19, № 3, p. 493—514, 1970.
5. David A. R., Wong E. J. *Neurochem.*, v. 19, p. 2709—2725, 1972.
6. Laval M., Moule Y. *Biochimie*, v. 58, p. 1173—1179, 1976.
7. Джохадзе Д. И., Раквиашвили Н. Р. *Сообщ. АН ГССР*, т. 77, № 3, с. 299, 1975.
8. Матинян К. С., Уманский С. Р. *Биохимия*, т. 43, вып. 1, с. 111—120, 1978.
9. Саитмуратова О. Х., Ахмедова Д., Рашидходжаева Г., Леонтьев В. Б. *Узб. биол. журн.*, № 6, с. 67—69, 1979.
10. Allfrey V. F., Littan V. C., Mirsky A. E. *J. Cell. Biol.*, v. 21, p. 213, 1964.
11. Ситвольский Н., Газарян К. Г. *Цитология*, т. 18, № 11, с. 1403, 1976.
12. Саитмуратова О. Х., Рустамова Ф. Н., Садыков А. А., Леонтьев В. Б. *Нейрохимия*, т. 6, № 3, с. 360—367, 1987.
13. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. K., Randall R. J. *J. Biol. Chem.*, v. 193, № 1, p. 265—275, 1951.
14. Монцевичюте—Эрингене Е. В. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*, т. 8, № 4, с. 71—78, 1964.
15. Роззони И. Ч., Галяс В. А. *ДАН УССР*, т. 5, № 5, с. 449—451, 1977.
16. Саитмуратова О. Х., Алимходжаева Г., Леонтьев В. Б., Леконцева В. К. *Химия природных соеди.*, № 4, с. 514—515, 1982.
17. Леонтьев В. Б., Мухамедханова С. И., Саитмуратова О. Х., Ахмедова Д., Рашидходжаева Г. Тезисы докл. Всесоюз. конф. по ЯМР—спектроскопии высокого разрешения, Ташкент, Фан, 1979.
18. Hyden H., Lange P. W. *Science*, v. 159, № 3821, p. 1370—1373, 1968.
19. Худен Х., Ланге П. В. *Журн. эволюц. биохим. и физиол.*, т. 5, № 2, с. 145—157, 1969.
20. Hyden H., Lange P. W. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, v. 65, № 4, p. 898—904, 1970.
21. Бяловская Е. А., Малун Т. К., Свиридов С. М. *Докл. АН СССР*, т. 225, № 5, с. 1194—1197, 1975.
22. Иммуносорбенты и их использование в биотехнологии (под ред. С. В. Прозоровского), М., Наука, 1986.

Поступила 17. IV 1983