



УДК 612.8.015

ВЛИЯНИЕ СЕРОТОНИНА И ДИБУТИРИЛ-сАМР НА УРОВЕНЬ
ФОСФОРИЛИРОВАНИЯ БЕЛКОВ В СРЕЗАХ ГИППОКАМПА

АФОНИН Ю. Н., ОТМАХОВ П. А.

Институт биологической физики АН СССР, г. Пущино

Действие серотонина (5×10^{-5} М) на переживающие срезы гиппокампа морской свинки приводит к изменению фосфорилирования белков синантосом (грубой митохондриальной фракции) поля CA_3 . Изменения имеют двухфазный характер: в течение первых 10 мин наблюдается возрастание уровня фосфорилирования на 8,2%, а к 20 мин—снижение до 15% по сравнению с контрольным уровнем; к 60 мин происходит возвращение к контрольному уровню. Основной вклад в такую динамику фосфорилирования вносили белки с M_r 67, 76, 80 и 86 кД. Воздействие дибутирил-сАМР в течение 2—60 мин вызывает увеличение общего уровня фосфорилирования белков. Различия динамики изменений указывают на неодинаковую природу воздействия этих веществ на процессы фосфорилирования и дефосфорилирования в синансах.

Установлено, что в процессе консолидации временных связей принимают участие серотонинергические системы мозга [1]. В качестве возможного механизма действия серотонина (5-ОТ), как и других моноаминов, предполагается длительное следовое облегчение синаптической передачи на меманоаминергических входах нейронов [2, 3]. Однако в большинстве работ, проведенных на различных структурах мозга, описано лишь кратковременное облегчение [4—6] или снижение электрического ответа нейронов, вызванного стимуляцией несеротонинергических афферентных путей, при электрофоретическом подведении к исследуемой структуре 5-ОТ, а также стимуляции серотонинергических волокон [7]. Недавно на переживающих *in vitro* срезах гиппокампа морских свинок показана возможность длительного, до 40 мин, следового облегчения эффективности мшистых волокон, оканчивающихся на пирамидных нейронах поля CA_3 , после введения в инкубационную среду 5-ОТ [8, 9]. Авторы высказывают предположение о возможном включении под влиянием 5-ОТ каких-то метаболических процессов, обеспечивающих длительное облегчение. Это может быть, в частности, связано с фосфорилированием и дефосфорилированием белков—важным регуляторным механизмом клетки и одним из возможных механизмов, обеспечивающих пластичность на нейронном уровне [3, 10—12].

Для проверки этого предположения была проведена данная работа, целью которой было исследование влияния 5-ОТ и дибутирил-сАМР на уровень фосфорилирования белков в срезах гиппокампа.

Материалы и методы

Реактивы и оборудование. В работе использовали серотонин-креатинисульфат, дибутирил-сАМР, реактивы для электрофореза в ПААГ («Reanal»), γ -АТР-Р³² (ВО «Изотоп»). Для создания градиентных телей, гомогенизации, нанесения проб, электрофореза и денситометрии применяли оборудование из комплекта для микробиохимического анализа, разработанного Санталовым в нашей лаборатории и Ларшиным в СКБ БП АН СССР [13]. Авторадиографию проводили на пленке «X-ray Kodak».

Приготовление проб. Поперечные срезы гиппокампа морской свинок толщиной 0,5 мм получали по методу, описанному ранее [8, 9]. Инкубацию каждого из трех срезов проводили в отдельной камере, представляющей собой стеклянную пробирку, разделенную на два вертикальных отсека перфорированной перегородкой из оргстекла. В больший отсек на капроновую сеточку, укрепленную на расстоянии 3 мм от дна пробирки, помещали срез. В меньшем отсеке осуществляли непрерывное пропускание через инкубационный раствор смеси газов (95% O₂ и 5% CO₂). Такое устройство камер обеспечивало постоянное перемешивание инкубационного раствора и насыщение его газовой средой при сохранении среза в состоянии покоя. Сразу после приготовления все срезы преникубировали в течение 1 ч в 0,98 мл среды (рН 7,2), содержащей (в мМ): 124 NaCl; 26 NaHCO₃; 5 KCl; 2,4 CaCl₂; 1,24 KH₂PO₄; 1,3 MgSO₄ и 10 глюкозы при 35,5°. По истечении 1 ч в две камеры добавляли по 20 мкл раствора серотонин-креатинисульфата или дибутирил-сАМР в конечной концентрации $5 \cdot 10^{-5}$ М, приготовленного на бидистиллированной воде. В третью камеру добавляли 20 мкл бидистиллированной воды. Через 2, 5, 10, 20, 40 или 60 мин инкубации из срезов выделяли поле SA₃ и гомогенизировали при 0°.

Фракционирование. Центрифугированием гомогената 5 мин при 900 g осаждали ядра, супернатант отделяли и центрифугировали 45 мин при 12000 g. Полученный осадок содержал преимущественно синапсомы и митохондрии.

Фосфорилирование. Осадок (~2 мкг белка) разводили в 10 мкл среды, содержащей 50 мМ CH₃COONa и 10 мМ Mg Cl₂ (рН 6,5), преникубировали 5 мин при 30° и инкубировали 2 мин γ -АТР-Р³² (конечная концентрация 5 мкМ). Реакцию останавливали добавлением 9 мкл солибилизирующей жидкости следующего состава: 10%-ный раствор додецилсульфата натрия, 14 М β -меркаптоэтанол, 30%-ный раствор сахарозы, 1 М трис-НСl (рН 6,8), 0,01% бромфенолового синего. Пробы выдерживали 2 мин при 100°.

Электрофорез и автордиография. Электрофорез проводили в градиентном ПААГ (7—15% акриламид) [15], длина разгонки 5 см, в ячейку наносили все 20 мкл пробы. Белки окрашивали 0.125%-ным Кумасен R-250, избыток красителя удаляли электрофоретически. Снимали денситограмму спектра белков. Для определения M_r использовали в качестве маркеров цитохром с (M_r 12,4 кД), миоглобин (M_r 18,8 кД), яичный альбумин (M_r 45 кД), человеческий альбумин (M_r 69 кД), фосфоорилазу А (M_r 94 кД).

Гель сушили на целлофановой подложке и экспонировали 2 недели на рентгеновской пленке; проявленные автографы денситометрировали. Площади пиков денситограмм определяли при помощи цифрового интегратора И-02, согласованного с выходными характеристиками денситометра. Зависимые совокупности сравнивали и вычисляли средние разности по всем парам вариант контроль-опыт [16].

Результаты и обсуждение

При помощи электрофореза в ПААГ белки грубой митохондриальной фракции, выделенной из поля Ca_3 гиппокампа морских свинок, были разделены на 30 групп. На рис. 1 представлены денситограмма белкового спектра и автордиография включения P^{32} одной и той же электрофореграммы белков контрольного препарата. Расчет проводили как по суммарному количеству включенной метки, так и по группам белков. В таблице указаны белки, фосфорилирующиеся экзогенным γ -АТФ- P^{32} , и группы, в которые они объединены для удобства расчетов.

Таблица
Белки грубой митохондриальной фракции, фосфорилирующиеся экзогенным γ -АТФ- P^{32} :

Группа белков с M_r (кД)	Белки, фосфорилирующиеся γ -АТФ- P^{32} , с M_r (кД)
240—140	200, 180, 150
140—88	98
84—54	86, 80, 76, 67, 57
54—35	54, 51, 47, 41
35—27	35, 33
27—20	—
20—15	19, 16
15—6	12
менее 6	—

Показано, что белковый спектр и величины M_r фосфорилирующихся белков морских свинок примерно совпадают с аналогичными данными для крыс, описанными в литературе [14, 17—19].

Основные полученные результаты приведены на рис. 2. Группы белков с M_r 35—27, 27—20, 15—6 и меньше 6 кД на рисунке не показаны, поскольку у них не обнаружено различий между опытом и контролем.

При воздействии 5-ОГ наблюдалось увеличение общего уровня фосфорилирования синапсомных и митохондриальных белков пирамидных

нейронов поля CA_3 гиппокампа примерно до 10 мин (максимально до 8,2% к контролю). При более продолжительном воздействии 5-ОТ (20 мин) общий уровень фосфорилирования белков понижался на 15% по сравнению с контролем и возвращался к норме к 60 мин. Основной вклад в изменение общей картины внесла группа белков с M_r 88—54 кД: через 10 мин после введения в среду 5-ОТ в ней наблюдалось максимальное увеличение фосфорилирования (до 10%), а через 20 мин—снижение (—20%); эти белки включали около 10% всей связавшейся

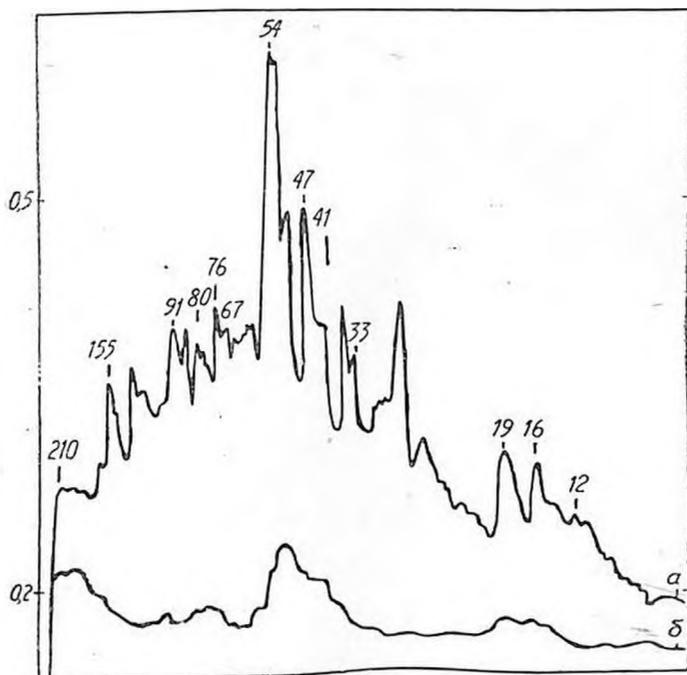


Рис. 1. Денитограмма (контроль) белкового спектра грубой митохондриальной фракции, выделенной из клеток поля CA_3 гиппокампа морской свинки (а) и автордиография включения γ -АТР- P_{32} (б). Цифры над пиками— M_r белков (кД), по оси ординат—оптическая плотность (ед.)

метки. Группы белков с M_r 140—88, 54—35, 20—15 кД в общем повторяли эту картину, но изменения их фосфорилирования не были столь значительны. Только белки с большей величиной M_r (240—140 кД) практически не изменяли уровень фосфорилирования.

При воздействии дибутрил-сАМР общее увеличение уровня фосфорилирования белков достигало максимума (+10,3%) к 20 мин, после чего он монотонно снижался, возвращаясь к норме. Достоверных изменений уровня фосфорилирования под действием дибутрил-сАМР в отдельных группах обнаружено не было.

Таким образом, воздействие 5-ОТ на переживающие срезы гиппокампа вызывает двухфазное изменение общего уровня фосфорилирования синапсомных и митохондриальных белков поля CA_3 , что хоро-

шо коррелирует с электрофизиологическими данными, полученными с использованием этого препарата [8, 9]. В этих исследованиях установлено, что введение 5-ОТ в инкубационную среду вызывает у части пирамидных нейронов поля CA₃ гиппокампа в начальной фазе (до 10 мин) торможение фоновых электрических разрядов и ответных разрядов клетки на стимуляцию несеротонинергических афферентных волокон (мшистых волокон). При продолжении введения 5-ОТ в среду начальная фаза торможения сменяется длительным возрастанием фо-

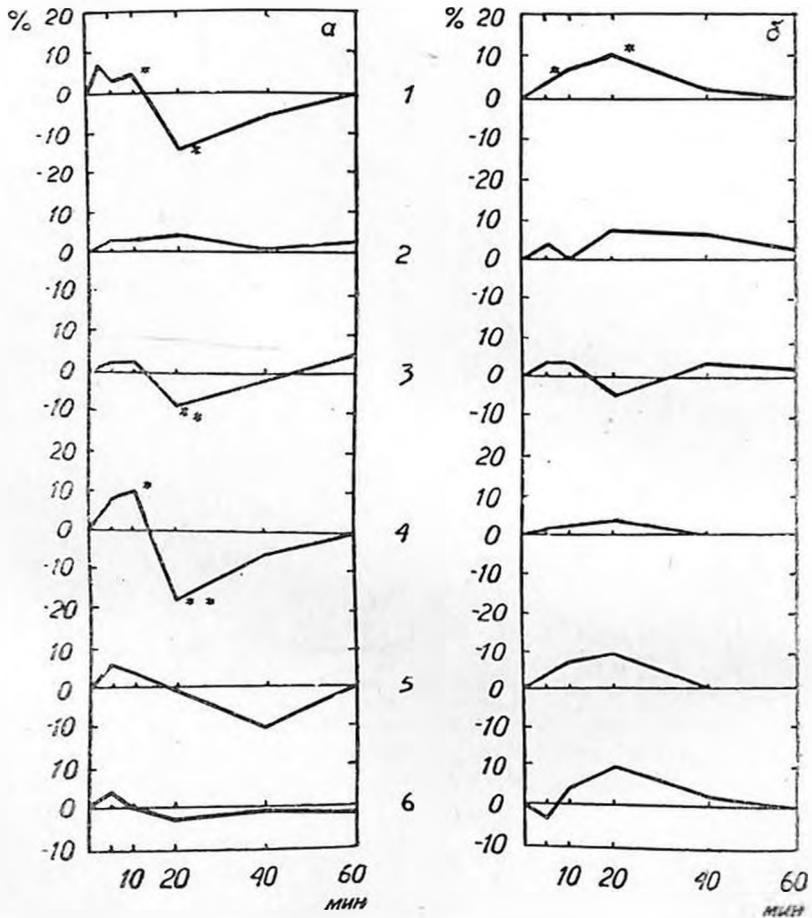


Рис. 2. Изменение уровня фосфорилирования белков в клетке после введения: а—серотонина; б—дибутирил-сАМР. Изменение общего уровня фосфорилирования (1) и фосфорилирования в группах белков с M_r : 210—140 кД (2), 140—88 кД (3), 88—54 кД (4), 54—33 кД (5), 20—15 кД (6); по оси ординат—% отклонения от контроля (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$), по оси абсцисс—время в мин.

новой активности и облегчением вызванного ответа, превосходящем контрольный уровень. Торможение активности клеток гиппокампа при воздействии 5-ОТ вызывается увеличением проводимости калиевых каналов [20, 21]. Возможно, что наблюдаемая первая фаза возраста-

ния уровня фосфорилирования белков частично отражает фосфорилирование и вследствие этого открытие K^+ -каналов. В таком случае в течение второй фазы сильного и длительного дефосфорилирования может происходить дефосфорилирование 5-ОТ-активируемых калиевых каналов, и вследствие этого длительная деполяризация мембраны нейрона, а значит, возрастание его фоновой активности и облегчение вызванного ответа нейрона.

Воздействие на срезы гиппокампа дибутирил-с-АМР вызывает однофазное увеличение общего уровня фосфорилирования белков в клетке, достигающего максимума к 20 мин и постепенно возвращающегося к норме (60 мин). Таким образом, первая фаза действия 5-ОТ—возрастание уровня фосфорилирования белков—может быть следствием увеличения уровня с-АМР в синапсе. Вторая фаза—длительное дефосфорилирование—обеспечивается, по-видимому, какими-то механизмами, не опосредуемыми возрастанием уровня с-АМР. Следует отметить, что, поскольку измерялась интенсивность фосфорилирования по фракциям, отдельные входящие в них белки могли иметь реальные уровни от нулевого до весьма высоких. Кроме того, даже незначительное, на 10—15%, изменение фосфорилирования белков, критических для функции синапсов (рецепторы, ферменты синтеза или гидролиза медиатора), может существенно изменять проводимость синапса, например, за счет встраивания дополнительных рецепторов в постсинаптическую мембрану.

EFFECT OF SEROTONIN AND DIBUTIRYL-c-AMP UPON THE LEVEL OF PROTEIN PHOSPHORYLATION IN HIPPOCAMPAL SLICES

APHONIN Yu. N., ОТМАКHOV N. A.

Institute of Biological Physics, USSR Academy of Sciences, Poustchino

Superfusion of hippocampal slices of guinea pig with serotonin (5×10^{-5} M) exerts a biphasic effect upon phosphorylation of synaptosomal proteins in the field CA₃ (crude mitochondrial fraction). During the first 10 min of superfusion the level of phosphorylation increased for 8.2%, after 20 min it decreased to 15% of control level, coming back to control level in one hour. Proteins with molecular weight 86, 80, 76 and 67 KDa contribute to such a dynamics of phosphorylation. Dibutiryl-c-AMP, applied for 2—60 min, increased the level of phosphorylation. Different dynamics of changes point to a different nature of serotonin and c-AMP effects on phosphorylation and dephosphorylation processes in synapses.

Л И Т Е Р А Т У Р А

- 1 Кругликов Р. И. Нейрохимические механизмы обучения и памяти. М., Наука, 1981.

2. *Matties H.*—In: Memory and transfer of information (ed. H. P. Zippel), p. 531—548, Plenum Press, 1973.
3. *Розанов С. И.*—В кн.: Физиологические и биохимические исследования памяти, с. 145—155, Пушкино, 1977.
4. *De France J. U., McGrea K. A., Joshihara H.* *Exptl. Neurol.*, 48, 352, 1978.
5. *Assaf S. Y., Miller I. J.* *Brain Res.*, 151, 3, 587—592, 1978.
6. *Jahnsen H.* *Brain Res.*, 197, 1, 83—91, 1980.
7. *Segal M.* *Brain Res.*, 91, 1, 115—131, 1975.
8. *Отмахов Н. А.* *Нейрофизиология*, 14, 4, 410—417, 1982.
9. *Otmakhov N. A., Bragin A. G.* *Brain Res.*, 253, 1 2, 173—183, 1982.
10. *Williams M., Rodnight R.*—In: Progress in Neurobiology, 8, 193—250, 1977.
11. *Weller M.* Protein Phosphorylation, p. 378—444, Printed in Great Britain, 1979.
12. *Routtenberg A.* Progress in Neurobiol., 12, 85—113, 1979.
13. *Ларин В. Т., Сикталов Б. Ф., Хохлов А. М., Розанов С. И.*—В кн.: Описание научных принципов устройства новых приборов и методики пользования ими, с. 14—28, Пушкино, 1981.
14. *Mitrius I. C., Morgan A. R., Routtenberg A.* *Brain Res.*, 212, 67—81, 1981.
15. *Laemmlı U. K.* *Nature*, 227, 630—635, 1970.
16. *Ашмарин Н. П., Васильев Н. Н., Албросов В. А.* Быстрые методы статистической обработки и планирование экспериментов, Л., Наука, 1975.
17. *De Blas A. L., Wang I. J., Sorensen K., Mahler H. K. J.* *Neurochem.*, 33, 647—659, 1979.
18. *Rodnight R.* *Neurochem. Int.*, 2, 113—122, 1980.
19. *Berman R. F., Hüllihan I. P., Kinnier W. J., Wilson J. E. J.* *Neurochem.*, 34, 2, 431—437, 1980.
20. *Segal M. J.* *Physiol.*, 303, 423—439, 1980.
21. *Segal M., Gutnich M. J.* *Brain Res.*, 195, 339—401, 1980.

Поступила 3. XI 1983.