



УДК 577.612.015

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ БИОГЕННЫХ АМИНОВ НА СИНТЕЗ ГЛИКОПРОТЕИНОВ В НЕЙРОНАЛЬНОЙ КУЛЬТУРЕ МОЗГА КУРИНЫХ ЭМБРИОНОВ

СОЛОМОНИЯ Р. О., КОНДРАТЬЕВ А. Д., МАДЕРШПАХ К.

Институт физиологии им. И. С. Бериташвили АН ГССР, Тбилиси

"Институт прикладной молекулярной биологии Министерства
здравоохранения СССР, Москва

"Институт биохимии Биологического научно-исследовательского центра
АН ВНР, Сегед

Было изучено влияние низких концентраций (10^{-10} М) биогенных аминов при кратковременных интервалах (1—5 мин) инкубации на синтез гликопротеинов в культуре нейронов из переднего мозга куриных эмбрионов. Норадреналин во всех исследуемых случаях оказывает долговременное стимулирующее действие на этот процесс. Серотонин обуславливает временно зависимое ингибирование синтеза гликопротеинов в течение 1 ч после инкубации. За последующий час наблюдается стимулирование этого процесса. В случае дофамина ингибирующий эффект выражен только при 5-минутной инкубации без последующего увеличения скорости реакции гликозилирования. С помощью специфических лигандов к рецепторам биогенных аминов [(+)-L-алпренолол, мianserin, (-)-сульпирид] выявлено участие в процессах регуляции синтеза гликопротеинов соответственно β -адренорецепторов, 5_1 -серотониновых и D_1 -дофаминовых рецепторов. 12-О-тетрадеканол-13-ацетат и дибутирил-3-5-аденозинмонофосфорная кислота оказывают долговременное стимулирующее действие на синтез гликопротеинов.

Известно, что большинство синаптических белков нейронов являются гликопротеинами, которым отводится ведущая роль в детерминации и регулировании эффективности образования синаптических контактов [1, 2]. Показано, что фиксация следов памяти в головном мозгу сопровождается усиленным синтезом гликопротеинов [4—7]. Этот факт объясняется тем, что синаптическое ремоделирование считается одной из основных клеточных реакций, происходящих при консолидации следов долговременной памяти [8]. Поскольку гликозидная связь имеет аномерную конфигурацию и обладает способностью образовывать разветвленные структуры, предполагается, что олигосахаридные цепи несут на 3 порядка больше информации на единицу веса, чем белки и нуклеиновые кислоты [9].

Одним из актуальных вопросов метаболизма гликопротеинов является выяснение нейротрансмиттерной регуляции синтеза этих белков. При

изучении действия дофамина на реакции фукосилирования в срезах гиполокампа крыс было показано, что активирующее влияние биогенного амина проявляется лишь на 30-й день постнатального развития, что объясняется поздним онтогенетическим «созреванием» рецепторных участков [10]. С другой стороны, выявлено участие β -адренорецепторсвязанной аденилатциклазы в стимулировании N-гликозилирования белков в крысиных ацинарных, C₆-глиальных клетках, в фибробластах человека и в капиллярных эндотелиальных клетках [11—13]. Однако во всех этих случаях стимулирование в гликозилировании белков достигалось лишь после 1-часовой инкубации клеток с высокими концентрациями (10^{-5} М) изопротеренола [11—13].

Если регуляция синтеза гликопротеинов через β -адренорецепторы имеет определенную физиологическую роль, то следовало ожидать, что низкие концентрации норадреналина также вызовут аналогичный эффект. Это предположение поддерживается нашей ранней работой, где показано, что кратковременная инкубация (1—5 мин) первичной нейронально-глиальной культуры из мозга куриных эмбрионов с 10^{-10} М норадреналина приводит к заметному увеличению уровня cAMP [14]. Использование низких концентраций нейротрансмиттеров позволяет устранить проблему возможной десенситизации соответствующего рецептора.

В настоящей работе изучается влияние низких концентраций (10^{-10} М) биогенных аминов на синтез гликопротеинов в первичной культуре нейронов из переднего мозга куриных эмбрионов.

Материалы и методы

Первичную клеточную культуру нейронов получили с переднего мозга 8-дневных куриных эмбрионов с помощью механической диссоциации, проведением ткани через специальные сита с размерами пор 48 μ М [15] и засеванием на чашки Петри (диаметр 2,5 см), покрытых поли-L-лизинном, с частотой 5×10^5 клеток на чашу [16]. Клетки держали в минимальной среде Игла (2,5 мл на чашу), содержащей 15% телячьей фетальной сыворотки («Flow», Англия). В этих культурах практически не наблюдается присутствия глиальных клеток. Опыты проводились на пятый день культивирования.

Перед опытом с чашек Петри отбирали среду и добавляли ту же самую среду в объеме 0,5 мл. Конечные концентрации биогенных аминов и специфических лигандов к соответствующим рецепторам биогенных аминов составляли 10^{-10} М. В случае 12-О-тетрадеканонил-форбол-13-ацетата (ТРА) и дибутирил-3-5-аденозинмонофосфорной кислоты (дб-сАМР) конечные концентрации соответственно равнялись 10^{-5} , 10^{-9} и 10^{-7} , 10^{-8} М. Время инкубации составляло 1, 3 и 5 мин. После инкубации культуру тщательно промывали раствором Тироди и добавляли остаточную насыщенную среду в объеме 0,5 мл. Меченую L-6-[3 H]-фукосу (удельная радиоактивность 27 Кб/мМ, «Amersham», Англия) в количестве 0,5 μ Ки добавляли сразу же после отмывки или 1 ч спустя. В обоих случаях время:

мечения клеток составляло 1 ч. После мечення радиоактивной фукозой клеточную культуру тщательно промывали раствором Хенкса, клетки соскребали, суспендировали и гомогенизировали в буфере 50 мМ трис-HCl, рН 7,4, содержащего 1 мкМ фенилметилсульфонилфторида (0,5 мл буфера на 1 чашу Петри). Включенную радиоактивность определяли следующим образом: к 150 мкл гомогената добавляли равный объем 20%-ной ТХУ и фильтровали на фильтрах CF/F («Whatman», Англия). Фильтры промывали 50 мл 10%-ной ТХУ и 5 мл этанола и просчитывали в толуальном сцинтилляторе. Белок определяли по методу Bradford [17]. Значение включенной радиоактивности определяли как количество импульсов на мг белка.

С каждой чашки Петри количество белка и включенной радиоактивности определяли двумя параллельными измерениями. Количество экспериментов было не меньше 12. Результаты обрабатывали статистическим методом неравноточных измерений. Достоверность различия и уровень значимости определяли по распределению Стьюдента для малых выборок. Уровень значимости во всех специально не отмеченных случаях $p < 0.001$.

Результаты и обсуждение

Влияние норадреналина на включение фукозы в ТХУ нерастворимую фракцию нейрональных клеток показано на рис., а, из которого видно, что даже 1-минутная стимуляция β -адренорецепторов 10^{-10} М норадреналином увеличивает синтез гликопротеинов на 45%. 3- и 5-минутная стимуляция увеличивает этот процесс соответственно на 197 и 300% по сравнению с контролем. Представляется интересным то, что 3- и 5-минутная стимуляция нейрональных клеток норадреналином оказывает долговременный эффект на реакцию гликозилирования. В последнем случае, то есть в интервале 1—2 ч после стимулирования, синтез гликопротеинов выше контрольного уровня соответственно на 59 и 55%. Равные концентрации (—)-L-алпронолола (кроме одного случая: 5-минутная инкубация, временной интервал 1—2 ч) достоверно уменьшают стимулирующий эффект норадреналина, свидетельствующий об участии β -адренорецепторов в этом процессе. Можно предположить, что при долговременной инкубации (5 мин) нейрональных клеток с норадреналином происходит также частичная активация α -адренорецепторов.

Серотонин в отличие от норадреналина оказывает четкий ингибирующий эффект на синтез гликопротеинов в интервале времени 0—1 ч (рис., б). В зависимости от времени инкубации серотонин ингибирует этот процесс соответственно на 29, 41 и 49%. Однако ситуация полностью меняется в интервале времени 1—2 ч, когда скорость реакции гликозилирования восстанавливается до нормального уровня и при 5-минутной инкубации статистически достоверно ($p < 0.05$) превосходит контроль. Для серотонина и серотонин+миансерина эти величины соответственно равняются 23 и 28%. Таким образом, через определенный интервал времени после активации серотонинового рецептора происходит компенсаторное увеличение синтеза гликопротеинов в нейрональных клетках. Доба-

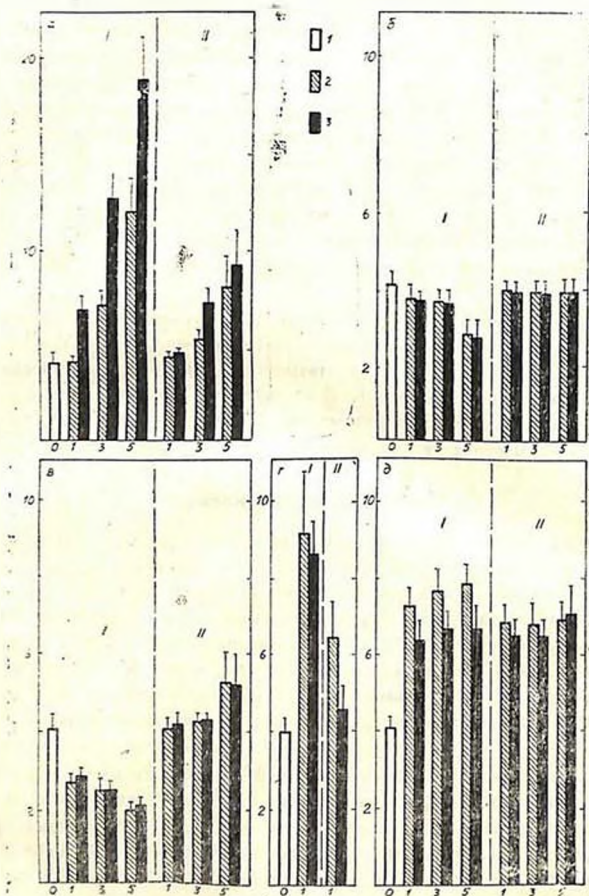


Рис. Включение L-6-[3 H]-фукозы в ТХУ нерастворимую фракцию нейрональных клеток мозга куриных эмбрионов после инкубации с норэпинефрином (а), серотонином (б), дофамином (в), ТРА (г), db-cAMP (д). Время мечения радиоактивной фукозой во всех случаях—1 ч. Включение L-6-[3 H]-фукозы сразу же после инкубации (интервал времени 0—1 ч)—I и через 1 ч после инкубации с различными аффекторами (интервал времени 1—2 ч)—II. По оси абсцисс—время инкубации с различными аффекторами (мин), по оси ординат—включение L-6-[3 H]-фукозы, $\text{имп.} \times 10^{-4} / \text{мг белка}$: 1—контрольные клетки, 2—обработка 10^{-10} М норэпинефрином и 10^{-10} М алпренололом, 3—обработка 10^{-10} М норэпинефрином; б: 1—контрольные клетки, 2—обработка 10^{-10} М серотонином и 10^{-10} М мiansергином, 3—обработка 10^{-10} М серотонином; в: 1—контрольные клетки, 2—обработка 10^{-10} М дофамином и 10^{-10} М сульпинидом, 3—обработка 10^{-10} М дофамином; г: 1—контрольные клетки, 2—обработка 10^{-8} М ТРА, 3—обработка 10^{-8} М ТРА; д: 1—контрольные клетки, 2—обработка 10^{-7} М db-cAMP, 3—обработка 10^{-8} М db-cAMP

ление вместе с серотонином мiansерина не меняет результата действия серотонина, указывающего на участие в этом процессе S_1 -серотониновых рецепторов. Как известно, этот субтип рецепторов опосредует активирование аденилатциклазной системы, хотя недавно появились данные о существовании уникальных S_1 -серотониновых рецепторов, связанных с фосфоинозитольным обменом [18]. Требуются дополнительные исследования для выяснения вопроса о том, какой из вторичных мессенджеров опосредует обнаруженный нами эффект серотонина.

Влияние дофамина на реакцию фукозиллирования имеет менее выраженный характер по сравнению с норадреналином и серотонином (рис., в). 1- и 3-минутная инкубация клеток с дофамином ведет к слабому, статистически недостоверному ($p < 0.2$) ингибированию этого процесса в интервале времени 0—1 ч. Лишь 5-минутная инкубация вызывает достоверное ($p < 0.01$) ингибирование. Добавление совместно с дофамином специфического антагониста D_2 -дофаминовых рецепторов (—)супиприда не элиминирует эффект дофамина, указывающий на предположительное участие в этом процессе D_1 -дофаминовых рецепторов, которые активируют аденилатциклазную систему. В интервале времени 1—2 ч после инкубации синтез восстанавливается до нормального уровня, но компенсаторного увеличения этого процесса, как в случае серотонина, не происходит (рис., в). По-видимому, низкой плотностью дофаминовых рецепторов или их эмбриональной «незрелостью» можно объяснить тот факт, что в наших экспериментах 1- и 3-минутная инкубация с дофамином не оказывают влияния на этот процесс. К сожалению, на сегодняшний день данные о наличии дофаминовых рецепторов на нейрональных клетках куриных эмбрионов отсутствуют.

Было исследовано также влияние низких концентраций ТРА и дб-сАМР на синтез гликопротеинов. Как 10^{-5} М, так и 10^{-9} М ТРА оказывает длительное стимулирующее действие на синтез гликопротеинов даже при 1-минутной стимуляции (рис., г). 1-, 3- и 5-минутная инкубация с 10^{-7} М и 10^{-8} М дб-сАМР также вызывает длительный стимулирующий эффект на включение меченой фукозы в белковую фракцию нейрональных клеток (рис., г).

Как видно из полученных результатов, довольно низкие концентрации биогенных аминов при кратковременных инкубациях с культурой первичных нейрональных клеток дают глубокие и долговременные изменения в метаболизме гликопротеинов, подтверждая тем самым правильность поставленной задачи. Надо отметить, что для осуществления этих долговременных эффектов необходимым является проведение эксперимента в насыщенной нейрональной среде (см. «Материалы и методы»), указывающего на важную роль выделяемых нейрональными клетками трофических и других факторов, необходимых для поддержания и функционирования сформировавшейся нейрональной сети на высоком интегративном уровне.

Изменения синтеза гликопротеинов могут отразить изменения общего синтеза белка или специфическую активацию ферментов гликозиллирования. В случае норадреналина, по литературным данным, предпочтение

отдается второму пути [11]. Однако требуется дальнейшее уточнение этого вопроса с одновременным применением специфических меченых предшественников синтеза белка и гликопротеинов.

Долговременное увеличение синтеза гликопротеинов является обязательным звеном для консолидации следов памяти. Этот процесс должен быть специфичным для памяти, так как даже при долговременной посттетанической потенциации, которая рассматривается как физиологический субстрат памяти, не наблюдается достоверного усиления реакции гликозилирования [11]. Полученные нами результаты могут указывать на специфическую роль норадреналина как триггера для долговременного увеличения синтеза гликопротеинов. Обнаруженный феномен следует учитывать при изучении биохимических основ долговременной памяти.

STUDY OF THE EFFECT OF BIOGENIC AMINES ON GLYCOPROTEIN SYNTHESIS IN NEURONAL CULTURE FROM CHICK EMBRYO BRAIN

R. O. SOLOMONIA, A. D. KONDRATIEV*, and K. MADERSPACH**

Beritashvili Institute of Physiology, Georgian Academy of Sciences,
Tbilisi, USSR.

*Institute of Applied Molecular Biology, Moscow, USSR and Institute of

**Biochemistry, Biological Research Center, Hungarian Academy of
Sciences, Szeged, Hungary

We studied the effect of brief incubations (1–5 min) with low concentrations of biogenic amines (10^{-10} M) on glycoprotein synthesis in neuronal cultures from chick embryo forebrain. Noradrenalin in all cases induces long-term stimulation of glycoprotein synthesis. Exposure to serotonin inhibits glycoprotein synthesis in a time dependent fashion during the first hour. During subsequent hour stimulation of this process is observed. Dopamine inhibits the glycosylation reaction only after 5 min of incubation, without subsequent recovery. Experiments with specific ligands interacting with biogenic amine receptors ((–)-L-alprenolol, mianserin, (–)-sulpirid) demonstrate the involvement of beta-adrenoreceptors, 5_1 -serotonin and D_1 -dopamine receptors in the regulation of glycoprotein synthesis. 12 O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate and dibutyryl-2-5-adenosine monophosphoric acid induce long-term stimulation of glycoprotein synthesis.

ЛИТЕРАТУРА

1. Barondes S. H. — In: The Neurosciences; Second Study Program (ed. F. O. Schmitt), p. 747–760, Rockefeller University Press, New-York, 1970.
2. Irwin L. N. — In: Review of Neuroscience (eds. S. Ehrenpreis, J. I. Kopin), p. 137–179, Raven Press, New-York, 1974.
3. Kelly P. T., Cotman C. W. J. Biol. Chem., v. 252, № 3, p. 786–794, 1977.
4. Sukumar R., Rose S. P. R., Burgane R. D. J. Neurochem., v. 34, № 4, p. 1000–1006 1980.

5. Popov N., Sulhzeck S., Pohle W., Matthies H. *Neuroscience*, v. 52, p. 161—167, 1980.
6. Rose S. P. R., Harding S. *Neuroscience*, v. 12, № 3, p. 663—667, 1984.
7. Pohle W., Acosta L., Ruthrich H., Krug M., Matthies H. *Brain Res.*, v. 410, № 2, p. 245—256, 1987.
8. Rose S. P. R. *Neuroscience*, v. 12, № 4, p. 811—821, 1981.
9. Cook G. M. *J. Cell Science*, v. 4, suppl., p. 45—71, 1986.
10. Lobner B., Iork R., Matthies H.—In: *Molecular basis of neuronal function* (eds. S. Tucek, S. Stipek, F. Stasny, J. Krivanek), p. 404. Prague, 1986.
11. Banerjee D. K., Kousvelari E. E., Baum B. J. *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, v. 126, № 1, p. 123—129, 1985.
12. Kousvelari E. E., Grant S. R., Baum B. J. *Proc. Nat. Acad. Sci., USA, Biol. Sci.*, v. 80, № 20, p. 7146—7150, 1986.
13. Banerjee D. K., Kousvelari E. E., Baum B. J. *Federat. Proc.*, v. 45, № 6, p. 1681, 1986.
14. Maderspach K. *Cell. Mol. Biol.*, v. 26, № 2, p. 335—340, 1980.
15. Booher J., Sensenbrenner M. *Neurobiology*, v. 2, № 1, p. 95—105, 1972.
16. Sensenbrenner M., Maderspach K., Letskovits L., Juros G. G. *Devel. Neurosci.*, v. 1, p. 90—101, 1978.
17. Brudford M. *Anal. Biochem.*, v. 72, № 2, p. 248—254, 1976.
18. Conn P. J., Sanders-Bush E., Hoffman B. J., Hartig P. R. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA, Biol. Sci.*, v. 83, № 12, p. 4085—4089, 1986.

Поступила 11. IV 1988

Клиническая нейрохимия. Под ред. Н. S. Bachelard, G. G. Lunt и С. D. Marsden. Изд. Academic Press, Лондон, Англия, 1986 г., т. 1, 286 с. и т. 2, 197 с.

Clinical Neurochemistry. Ed. by Н. S. Bachelard, G. G. Lunt and С. D. Marsden. Academic Press, London, England, 1986, v. 1, 268p; v. 2, 197p.

Многотомное издание работ по клинической нейрохимии публикует обзоры по неврологическим и психиатрическим расстройствам. Каждый обзор содержит научные и клинические данные и перспективные направления, излагаемые в тесном соавторстве клиницистами и учеными в области фундаментальных наук. В первом томе рассматриваются болезнь Хантингтона и мигрень, а второй том посвящен клинике и патофизиологии заболеваний, связанных с демиелинизацией.