



УДК 547.963

ДЕЙСТВИЕ АНТИФЕИНОВ НА ЭНДОГЕННОЕ ФОСФОРИЛИРОВАНИЕ БЕЛКОВ ХРОМАТИНА НЕЙРОНОВ ГОЛОВНОГО МОЗГА

КУЛИКОВА О. Г., БОГДАНОВА Н. А., РАЗУМОВСКАЯ Н. И.

Институт экспериментальной медицины АМН СССР, Ленинград

Стимулятор памяти этилнорантифенин (этимизол), активирующий синтез РНК в нейронах мозга, избирательно повышает уровень фосфорилирования негистоновых белков хроматина, экстрагируемых 0,35 М NaCl. Увеличение фосфорилирования происходит за счет низкомолекулярной фракции (~ 10 кД) с высокой электрофоретической подвижностью. Аналог этимизола—аллилнорантифенин, не оказывающий положительного действия на память и синтез РНК, не изменяет фосфорилирование белков хроматина. Показано, что этимизол активирует сАМР-независимую протеинкиназу II хроматина нейронов. Предлагается, что миестические эффекты антифеинов связаны с их действием на синтез РНК, опосредованным сАМР-независимой системой фосфорилирования хромосомных белков.

Моноциклические производные кофенна из группы антифеинов—этилнорантифенин (этимизол) и аллилнорантифенин противоположным образом действуют на долговременную память: этимизол стимулирует, а аллилнорантифенин нарушает ее. Нами было обнаружено и противоположное влияние этих препаратов на синтез РНК, активация которого является необходимым метаболическим этапом в процессе консолидации [1]. Действие этих веществ на синтез РНК наблюдалось как при их введении, так и в бесклеточных системах [1]. Стимулирующий эффект этимизола опосредован негистоновыми белками: их удаление из хроматина приводит к исчезновению эффекта [2]. Известно, что в регуляции генной экспрессии важную роль играет фосфорилирование ядерных белков [3]. Этот процесс может не только контролировать функциональную активность ЦНС, но и, по мнению ряда авторов, лежать в основе «долговременной модуляции нейрона» [4, 5]. Однако конкретные пути вовлечения ядерных протеинкиназ в процесс сохранения следа памяти, а также многие вопросы участия фосфорилирования белков хроматина в регуляции синтеза РНК все еще остаются открытыми. Выяснение их тесно связано с исследованием функциональной роли протеинкиназ нерв-

ной ткани при действии препаратов, обладающих определенными мнестическими эффектами. С этой целью в настоящей работе было предпринято изучение влияния этил- и аллилнорантифеина на интенсивность фосфорилирования белков хроматина.

Материалы и методы

Нейрональные клетки из коры головного мозга белых крыс-самцов массой 200—220 г получали по методу, описанному Витвицким [6]. Выделение ядер из нейронов проводили с использованием 0,5%-ного раствора тритона X-100; их идентификацию проводили согласно Lovl-gur-Rein, McEwen [7]. Препараты содержали в среднем 94% нейрональных ядер. Хроматин получали, как описано ранее [8]. Все среды выделения содержали 1 мМ фенилметилсульфонилфторида (ФМСФ). Экстракцию белков хроматина раствором, содержащим 0,35 М NaCl, 0,01 М трис-HCl (pH 7,6), 0,001 М MgCl₂, 0,001 М ФМСФ, проводили в течение 1 ч при 4° с последующим центрифугированием при 12000g 20 мин [9]. Белки, растворимые в 0,35 М NaCl, содержались в надосадочной жидкости. Для электрофоретического анализа проводили анализ этой фракции против деионизированной воды в присутствии 1 мМ ФМСФ, после чего белковый раствор лиофилизировали. В ряде случаев к 0,35 М NaCl-растворимым белкам добавляли ТХУ до конечной концентрации 2%, затем центрифугировали при 20000g 20 мин. Концентрацию ТХУ в полученной надосадочной жидкости доводили до 25% и вновь центрифугировали. Осадок, содержащий НМГ-белки, промывали ацетоном [10]. Для получения гистонов хроматин после удаления 0,35 М NaCl-растворимых белков дважды экстрагировали 0,4 М H₂SO₄ 30 мин при 4° с последующим центрифугированием при 20000 g 20 мин. Осадок, содержащий прочно связанные негистоновые белки, обрабатывали 5%-ной ТХУ при 90° 30 мин с последующим центрифугированием для удаления нуклеиновых кислот, а затем промывали смесью метанола-хлороформа для удаления липидов, конечный осадок растворяли в 2,5%-ном NaOH. Из полученных фракций отбирали аликваты для электрофоретического анализа, определения содержания белка и уровня фосфорилирования. О величине эндогенного фосфорилирования судили по уровню включения [³³P] в белки после инкубации хроматина в течение 1 мин при 30°. Инкубационная среда в объеме 0,5 мл содержала (в ммоль): трис-HCl (pH 8,0)—50; MgCl₂—10; дитиотреитол (ДТТ)—1; АТР(ГТР)—10; 0,74 МБк [³³P]АТР (ГТР) (У. А. 60—90 ПБк/моль), 0,1 мл хроматина (до 100 мг белка) и необходимые количества исследуемых препаратов. Контролем служили пробы, не содержащие антифеинов. Реакцию останавливали во льду добавлением равного объема 30%-ной ТХУ, содержащей 10%-ный РРi-Na, 0,5 мМ АТР (ГТР), и 0,2 мл 0,5%-ного раствора альбумина. Осадок промывали 3 раза 20%-ной ТХУ и растворяли в 2,5%-ном KOH. В опытах с фракционированием хро-

тина инкубационная среда содержала не менее 2 мг белка; реакцию останавливали во льду добавлением среды инкубации, содержащей 0,5 мМ АТР (GTP), с последующим центрифугированием. Осадок промывали дважды аналогичным способом, а затем экстрагировали белки, как описано выше. Радиоактивность подсчитывали в сцинтилляторе Брея на счетчике «Rack Beta» («ЛКВ», Швеция). Включение метки выражали в имп/мин/мг белка·мин или в пмоль/мг белка·мин.

Электрофоретический анализ белков проводили на вертикальных пластинах 18%-ного ПААГ (рН 8,8) в присутствии 0,1%-ного ДДС-Na по методу Laemmli [11], концентрирующий и разделяющий гели содержали мочевины (0,5 М) и ЭДТА (5 мМ) по модификации Bhogjee [12]. Для получения электрофоретических препаратов фракции белков суспендировали в растворе 0,065 М трис-HCl (рН 6,8), 2%-ного ДДС-Na, 5%-ного ДТТ, 3%-ной мочевины, 10%-ной сахарозы и выдерживали при 37° 18 ч. После электрофореза гели фиксировали в 70%-ном этаноле 18 ч, окрашивали 4 ч в растворе 0,1%-ного Кумасси голубого G-250, 0,9%-ной уксусной кислоты, 25%-ного этанола, 25%-ного изопропанола, а затем отмывали растворами 7%-ной уксусной кислоты и 10%-ного изопропанола. Гели денситометрировали при 570 нм на денситометре «Leitz Wetzlar», разрезали на участки по 2 мм и определяли радиоактивность в толуоловом сцинтилляторе. Окраску на гликопротенды проводили по методу Маурера [13]. Содержание белка определяли по Lowry и соавт. [14]. Статистическую обработку данных проводили с использованием критерия Стьюдента.

Результаты и обсуждение

В последние годы появились данные о том, что предпочтительным субстратом протеникиназ хроматина является группа белков с высокой электрофоретической подвижностью в ПААГ—HMG-белки, а степень их фосфорилирования выше в активном хроматине, чем в неактивном, что позволяет предполагать важную роль этого процесса в регуляции транскрипции [15, 16]. HMG-белки входят в состав негистоновых белков, растворимых в 0,35 М NaCl [15]. Мы показали, что при удалении этой фракции фосфорилирование белков хроматина из коры головного мозга крыс снижалось в 5 раз (с 51 ± 2 до $10 \pm 1,2$ пмоль/мг белка·мин). Стимулирующий эффект этимизола на синтез РНК также исчезал при экстракции белков 0,35 М NaCl. Поэтому мы сосредоточили основное внимание при изучении влияния антифеннов на фосфорилирование белков именно этой фракции. На долю белков, растворимых в 0,35 М NaCl, приходится 11% белков хроматина, а растворимые в 0,4 М H₂SO₄ (главным образом, гистоны) и прочно связанные белки составляли соответственно 47 и 42%. Наиболее высокой, как и следовало ожидать, оказалась степень фосфорилирования белков, экстрагируемых 0,35 М NaCl: она в 3 раза превышала фосфорилирование прочносвязанных белков и в 15 раз фосфорилирование гистонов (табл. 1). Изучение действия эти-

мизела на фосфорилирование различных фракций хроматина показало, что препарат, не влияя на интенсивность фосфорилирования гистонов и прочносвязанных белков, стимулирует этот процесс во фракции белков, экстрагируемых 0,35 М NaCl: при концентрации 10^{-5} М фосфорилирование достоверно возрастало на 25%.

Таблица 1

Действие этимизола на уровень эндогенного фосфорилирования белков хроматина нейронов головного мозга крыс в присутствии [32 P]АТР (приведены средние результаты 3 опытов)

Исследуемая фракция	Контроль	Уровень эндогенного фосфорилирования нм/мин·мг белка·мин· 10^{-6} . Этимизол, М		
		10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}
0,35 М NaCl-растворимые белки	$2,30 \pm 0,13$	$2,51 \pm 0,17$ $p > 0,05$	$2,85 \pm 0,15$ $p < 0,01$	$2,19 \pm 0,18$
0,4 М H_2SO_4 -растворимые белки	$0,150 \pm 0,006$	$0,160 \pm 0,005$	$0,160 \pm 0,008$	$0,160 \pm 0,007$
Прочносвязанные белки	$0,86 \pm 0,02$	$0,70 \pm 0,015$	$0,83 \pm 0,01$	$0,81 \pm 0,02$

С помощью электрофореза в ПААГ в присутствии ДДС-Na мы попытались определить, какие именно белки хроматина ответственны за стимуляцию процесса фосфорилирования при действии этимизола. Определение радиоактивности разных по электрофоретической подвижности белков исследуемых препаратов хроматина нейронов показала, что метка включается, главным образом, в наиболее высокоподвижные белки, а значительное снижение степени фосфорилирования при экстракции белков 0,35 М NaCl происходит, в основном, за счет именно этой фракции (рис. 1). Обнаружено, что, как и при разделении суммарных белков хроматина, низкомолекулярные белки (~ 10 кД) обладают наиболее высоким уровнем фосфорилирования (рис. 2). Этимизол увеличивал фосфорилирование белков хроматина также за счет этой высокоподвижной электрофоретической фракции на 12,5% (рис. 2, а). Как мы уже упоминали, часть белков, экстрагируемых 0,35 М NaCl, относится к группе НМГ-белков, характерными особенностями которых являются растворимость в 2%-ной ТХУ, низкая величина M_r , высокая подвижность при электрофорезе [15]. Анализ той части 0,35 М NaCl-экстрагируемых белков, которые растворимы в 2%-ной ТХУ, показал, что они наиболее отчетливо выявляются при электрофорезе в ПААГ на месте расположения высокоподвижной зоны (рис. 3). Интересно отметить и тот факт, что окраску на гликопротеиды дали белки этой же низкомолекулярной фракции (рис. 3), а в последнее время появились сведения, что НМГ-белки являются гликопротеидами [17]. Вопрос о возможной идентичности выявленных фракций с белками НМГ будет решен в ходе дальнейших исследований по выделению и изучению их аминокислотного состава.

Эндогенное фосфорилирование белков хроматина представляет собой суммарный процесс, осуществляемый сАМР-независимыми протеинкиназами (ПКазами) I и II [18]. Действительно, и в наших опытах сАМР ни в одной концентрации (10^{-6} — 10^{-3} М) не влиял на эндогенное фосфорилирование белков хроматина из нейрональных клеток коры

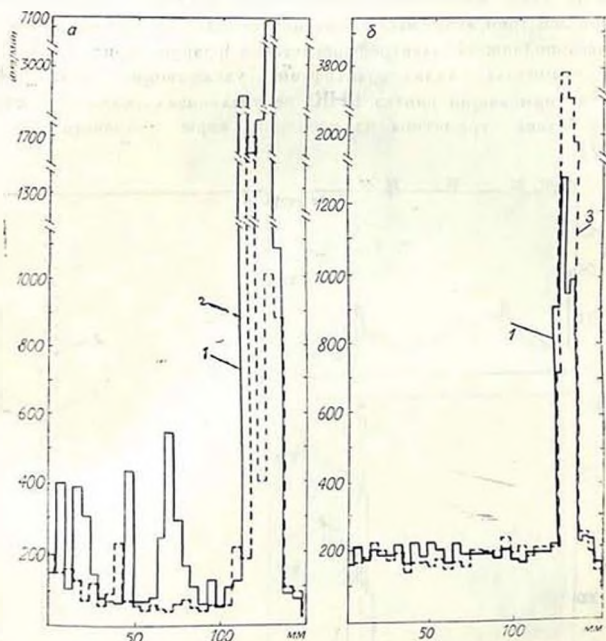


Рис. 1. Электрофоретическое разделение фосфорилированных белков хроматина из нейронов коры головного мозга крыс: а—в присутствии $[^{33}\text{P}]\text{АТР}$, б—в присутствии $[^{33}\text{P}]\text{ГТР}$. 1—хроматин (контроль); 2—хроматин после экстракции белков 0,35 М NaCl ; 3—хроматин после фосфорилирования в присутствии 10^{-5} М этимизола. По оси абсцисс—длина геля в мм. Представленные на рисунках результаты являются наиболее типичными в среднем из 3 независимых электрофоретических разделений каждого препарата

головного мозга крыс. ПКазы II, в отличие от ПКазы I, в качестве донора фосфата способна в равной степени использовать не только АТР, но и ГТР [19]. Чтобы выяснить, какая из этих ПКаз активировалась этимизолом, мы заменили в инкубационной среде $[^{33}\text{P}]\text{АТР}$ на $[^{33}\text{P}]\text{ГТР}$ (такие условия специфичны для измерения ПКазы II [19]). При этом стимулирующий эффект этимизола на фосфорилирование 0,35 М NaCl -растворимых белков возрос в $\frac{4}{3}$ раза: в концентрации 10^{-5} М он увеличивал интенсивность фосфорилирования на 90% (табл. 2). Столь значи-

тельное увеличение активации, вероятно, объясняется тем, что в присутствии АТР эффект этимизола мог в значительной степени маскироваться участием в фосфорилировании нечувствительной к препарату ПКазы I, активность которой в ткани мозга в 1,5 раза превышает активность ПКазы II [18]. Увеличение уровня фосфорилирования в присутствии ГТР при действии этимизола также происходило за счет низкомолекулярной высокоподвижной электрофоретической фракции (рис. 1, 2). В отличие от этимизола, аллилнорантифенин, ухудшающий долговременную память и тормозящий синтез РНК, не увеличивал скорость фосфорилирования белков хроматина из нейронов коры головного мозга крыс (табл. 2).

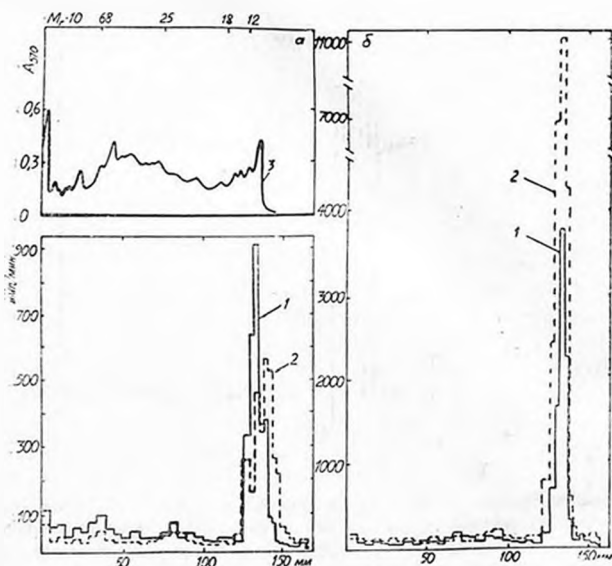


Рис. 2. Радиоактивность белковых электрофоретических компонентов 0,35 М NaCl-растворимой фракции после фосфорилирования хроматина нейронов: а—в присутствии $[^{33}\text{P}]\text{АТР}$, б—в присутствии $[^{33}\text{P}]\text{ГТР}$. 1—контроль (30 мкг белка); 2—влияние этимизола (10^{-5}); 3—денситограмма электрофореза (на верхней абсциссе величина M_r стандартных белков в кД): бычий сывороточный альбумин—68, химотрипсिनоген—25, миоглобин—17,8, цитохром—12,3.

Полученные результаты дают основание предполагать, что наиболее вероятной молекулярной мишенью действия этимизола на хроматин является ядерная ПКазы II, которая преимущественно фосфорилирует наиболее высокоподвижные белки группы HMG [15, 20]. Поскольку удаление из хроматина растворимых в 0,35 М NaCl белков полностью снимает стимулирующий эффект этимизола на его матричную активность,

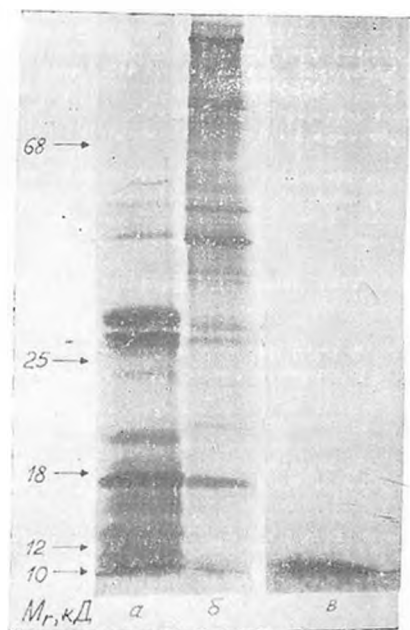


Рис. 3. Электрофореграмма белков 0,35 М NaCl-фракции, растворимых в 2%-ной ТХУ (а); 0,35 М NaCl-экстрагируемых белков хроматина (450 мкг белка) (б); окраска 0,35 М NaCl-растворимых белков на гликопротеиды (в). Цифры у стрелок—величина M_r маркеров

очевидно, этот эффект связан с активацией сАМР-независимой ПКазы II. Принято считать, что действие нейромедиаторов и других нейроактивных веществ на синтез РНК реализуется через сАМР- и сGMP-зависимое фосфорилирование белков хроматина [4]. Однако наши данные показывают, что активация синтеза РНК таким нейроактивным препаратом,

Таблица 2

Влияние антифенинов на эндогенное фосфорилирование 0,35 М NaCl-растворимой фракции белков хроматина нейронов в присутствии [³³P]GTP (приведены средние результаты 3 опытов; М±м)

Исследуемый препарат	Контроль	Уровень эндогенного фосфорилирования имп/мин/мг белка · мин · 10 ⁻⁶ , Этимизол, М		
		10 ⁻⁶	10 ⁻⁵	10 ⁻⁴
Этимизол	2,98±0,13	0,19±0,42* ÷41% p<0,05	5,63±0,71* ÷90% p<0,01	4,10±0,60* ÷38% p<0,05
Аллилнорантифеин	2,84±0,34	2,83±0,27	2,81±0,11	2,79±0,20

Примечание. *p<0,05.

как этимизол, стимулирующим память, может быть опосредован сАМР-независимой системой фосфорилирования хромосомных белков. Это может находить свое выражение и в изменении функциональной активности ЦНС, в частности в процессе сохранения следа памяти.

EFFECTS OF ANTIFEINES ON ENDOGENOUS PROTEIN PHOSPHORYLATION IN RAT BRAIN CHROMATIN

KULIKOVA O. G., BOGDANOVA N. A., RAZUMOVSKAYA N. I.

Institute of Experimental Medicine, Academy of Medical Sciences of the USSR, Leningrad

Stimulant of long-term memory ethylnorantifeine (ethymizol), that activates RNA synthesis in brain neurons, selectively increases the rate of endogenous phosphorylation of chromatin proteins soluble in 0,35 M NaCl. This increase was mainly due to the phosphorylation of low-M_r (10 kD) proteins with high electrophoretic mobility. Allyl-norantifeine, the analog of ethymizol, exerting no positive effects on memory or RNA synthesis, did not change the phosphorylation of chromosomal proteins. The activation of cAMP-independent chromatin protein kinase II of neurons by ethymizol has been demonstrated. It is proposed that memory effects of antifeines are related to their action on RNA synthesis occurring through cAMP-independent system of chromosomal protein phosphorylation.

ЛИТЕРАТУРА

1. Белявцева Л. М., Борисова Г. Ю., Рейхардт Б. А., Куликова О. Г.—В кн.: Актуальные вопросы фармакологии и токсикологии нейротропных средств, с. 16—19, Рига, РМИ, 1986.
2. Белявцева Л. М., Куликова О. Г., Разумовская Н. И., Бородин Ю. С. Докл. АН СССР, т. 283, с. 490—492, 1985.
3. Северин Е. С., Кочеткова М. Н. Роль фосфорилирования в регуляции кластерной активности, с. 1—287, М., Наука, 1985.
4. Микеладзе Д. Г. Циклические нуклеотиды, кальций и протеинкиназные реакции в нервной ткани, с. 1—183, Тбилиси, Мецниереба, 1983.
5. Nestler E. G., Greengard P. Nature, v. 305, p. 583—588, 1983.
6. Витвицкий В. Н. Журн. общ. биол., т. 64, с. 83—93, 1983.
7. Løvtrup-Rein H., McEwen B. J. Cell Biol., v. 30, p. 405—415, 1966.
8. Куликова О. Г., Белявцева Л. М., Разумовская Н. И., Бородин Ю. С. Нейрохимия, т. 4, с. 3—9, 1985.
9. Буракова Т. А., Корж В. П., Шостак Н. А., Нейфах А. А. Молекуляр. биология, т. 14, с. 922—927, 1980.
10. Sahyoun N., LeVine H., Bronson D., Cuatrecasas P. J. Biol. Chem., v. 259, p. 9341—9344, 1984.
11. Laemmli U. K. Nature, v. 227, p. 680—685, 1970.
12. Bhorjee J. S. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, Biol. Sci., v. 78, p. 6944—6948, 1981.
13. Маурер Г.—В кн.: Диск-электрофорез (под ред. Е. Д. Левина, с. 94—95, М., Мир, 1971.
14. Lowry O. H., Rosebrough J. N., Farr A. L., Randall R. J. J. Biol. Chem., v. 193, p. 265—275, 1951.
15. HMG chromosomal proteins (ed. E. W. Johns), p. 1—257, London—N. Y., Academic Press, 1982.
16. Saffer J. D., Glazer R. I. J. Biol. Chem., v. 257, p. 4655—4663, 1982.
17. Reeves R., Chang D. J. Biol. Chem., v. 258, p. 679—687, 1983.
18. Yutani Y., Tei Y., Yukioka M., Inoue A. Arch. Biochem. and Biophys., v. 218, p. 409—420, 1982.
19. Friedman D. L., Kleiman N. J., Cuppen F. E. Biochim. et biophys. acta, v. 847, p. 165—176, 1985.
20. Linnala-Kankkunen A., Palvimo J., Maenpää P. H. Biochim. et biophys. acta, v. 799, p. 122—127, 1984.

Поступила 17. XII 1987