

УДК 577.1:547.96+612.822.1:547.96

ВНУТРИЯДЕРНОЕ РАСПРЕДЕЛЕНИЕ НЕЙРОСПЕЦИФИЧЕСКОГО БЕЛКА S-100 В МОЗЖЕЧКЕ БЫКА

КАПРАЛОВ А. А., СМЕРЧИНСКАЯ Л. С., БЕЛИК Я. В., ТЮЛЕНЕВ В. И.

Методом иммунодиффузии изучали наличие нейроспецифического белка S-100 во фракциях, образующихся при дифференциальной экстракции изолированных ядер мозжечка быка. Наличие белка обнаружено в ядерном соке и ядерной мембране. Белок S-100 не выявлен в исходном препарате хроматина и его фракциях, полученных методом хроматографии на гидроксипатите. Обсуждаются возможные механизмы действия белка S-100 в реализации генетической информации.

С помощью иммуногистохимических методов установлено наличие нейроспецифического белка S-100 в ядрах нейронов и отсутствие его в ядрах глиальных клеток [1—4]. Обнаружены также специфические участки связывания этого белка в изолированных ядрах [5]. Показано, что белок S-100 может стимулировать активность РНК-полимеразы [6]. На возможную роль этого белка в процессах регуляции экспрессии генома указывает также его способность увеличивать включение ^{32}P в ядерные белки при его добавлении к препаратам ядерной протеникиназы [7]. В то же время фосфорилирование как негистоновых белков [8], так и гистонов [9] имеет важное значение в регуляции активности генов.

Для выяснения функции белка S-100 в клеточных ядрах и механизма его действия необходимо знание его субъядерной локализации, что и являлось целью настоящей работы.

Материалы и методы

Ядра выделяли из 50 г серого вещества мозжечка быка и проводили дифференциальную экстракцию белков, в основном, по методу Burdman [10]. Изолированные ядра суспендировали в 30 мл раствора, содержавшего 0,14 М NaCl, 0,02 М трис-HCl и 0,005 М MgCl_2 (pH 7,5). После 30-минутного экстрагирования надосадочную фракцию отделяли центрифугированием при 27 000 г в течение 20 мин; осадок экстрагировали последовательно дважды таким же объемом 0,35 М NaCl. Осадок после извлечения растворимых белков дважды суспендировали в 30 мл 2 М NaCl и энергично перемешивали с помощью магнитной мешалки 60 мин с последующим центрифугированием в течение 30 мин при 27 000 г. Оба гелеобразных экстракта рассматривали как

фракции дезоксирибонуклеопротенов (ДНП). Остаток ядерной фракции, нерастворимый в 2 М NaCl и представленный, главным образом, ядерными мембранами и, видимо, ядрышками и элементами рибонуклеопротеидной сети, экстрагировали в 10 мл 0,05 н. NaCl (щелочерастворимая фракция 1) с последующим центрифугированием. В части опытов из остатка ядерной фракции получали экстракт с помощью 0,2%-ного раствора дигитонина. Осадок обозначали как остаточную фракцию. Для дальнейшего разделения белков ДНП фракции экстракт, полученный с помощью 2 М NaCl, диализировали против 13 объемов охлажденной воды 15—16 ч и центрифугировали при 20000 g 20 мин. Надосадочную фракцию (фракцию ДНП, растворимую в 0,14 М NaCl) исследовали отдельно, а осадок последовательно обрабатывали 10 мл 0,25 н. HCl и 0,1 н. NaOH и получали соответственно кислоторастворимую фракцию и щелочерастворимую фракцию 2.

В отдельных опытах из фракции ядер получали хроматин методом, предложенным Bloom, Anderson [12]. Хроматин фракционировали при помощи хроматографии на гидроксипатите, используя последовательно растворы: 0,35 М NaCl, 1 М NaCl, 2 М NaCl и 2 М NaCl с 5 М мочевиной. Все растворы готовили на 0,8 М натрий-фосфатном буфере (pH 7,0). Гидроксипатит готовили по методу Siegelman и соавт. [13].

Ядрышки получали, в основном, по методу Busch [14]. При этом ядра суспендировали в растворе 0,25 М сахарозы, озвучивали в течение 3 мин при 15 кГц и центрифугировали 15 мин при 4500 g, наслоив их на 30%-ный раствор сахарозы. Осадок ресуспендировали в 0,25 М сахарозе и еще два раза очищали подобным образом.

Мембраносвязанный белок S-100 экстрагировали 5%-ным пентанолом [15, 16] из осадка ядер, отмытых раствором, содержащим 0,14 М NaCl, 10 мМ трис-HCl (pH 8,0), 1 мМ MgCl₂.

Все полученные субъядерные фракции исследовали методом иммунодиффузии по Ouchterlony в модификации Гусева и Цветкова [17]. В этих исследованиях была использована специфическая кроличья антисыворотка, полученная к бычьему белку S-100 [18].

Электрофорез белковых фракций проводили в 7%-ном геле в системе геля № 1 по Мауреру [19] с добавлением ЭДТА и 2-меркаптоэтанола (1 мМ) или с использованием 1%-ного додецилсульфата натрия [20].

Результаты и обсуждение

Согласно данным электронной и световой микроскопии, полученные препараты ядер не содержали цитоплазматических загрязнений, и их морфологическая структура была сохранена (рис. 1). Отношение белок/ДНК в них составляло 4,6, что соответствует чистым ядрам по критериям, предложенным Busch [21].

Вначале ядра фракционировали по модифицированному нами методу Michetti и соавт. [22]. При использовании метода двойной иммунодиффузии в геле (рис. 2) белок S-100 был обнаружен в растворимой

фракции, экстрагируемой при последовательном применении растворов 0,14 М NaCl и 0,35 М NaCl. Из двух последовательных экстрактов ДНП только первый взаимодействовал с иммунной сывороткой в иммунодиффузионных опытах. Фракция ДНП, образующаяся в результате понижения концентрации соли до 0,14 М NaCl, также взаимодействовала с антисывороткой к белку S-100. Иммунодиффузионным методом белок S-100 не был выявлен во фракциях кислот- и щелочерастворимых ядерных белков. Четкое взаимодействие со специфической антисывороткой в иммунодиффузионном тесте было обнаружено для фракции, экстрагируемой щелочью или дигитонином из остатка ядер после экстракции 2 М NaCl.

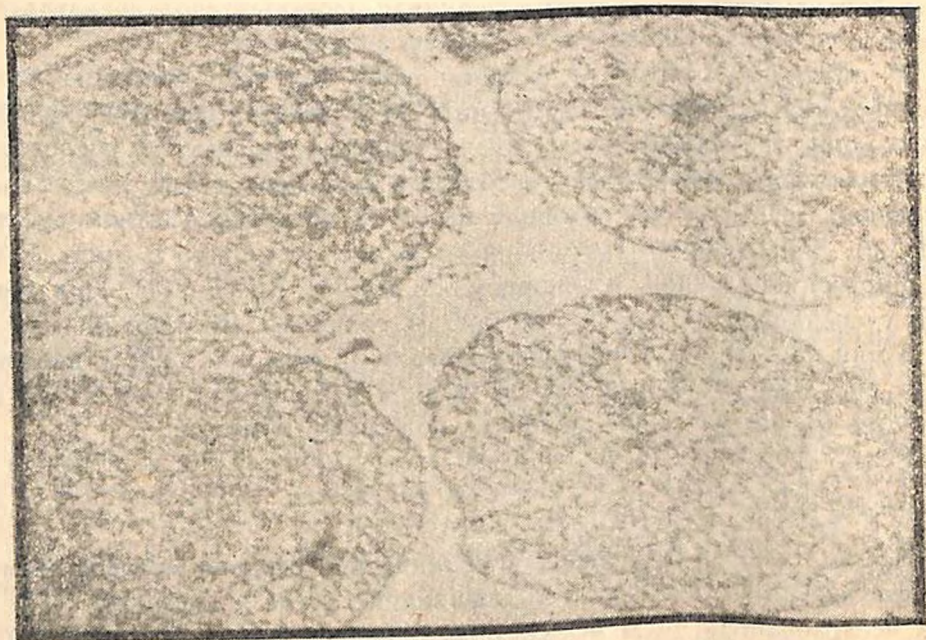


Рис. 1. Электронномикроскопическое изображение ядер мозжечка;
× 20 000 раз

На рис. 3 представлены результаты электрофореза полученных субъядерных фракций в 7%-ном ПААГ. Необходимо отметить, что существенная часть материала всех фракций оставалась на старте и не входила в разделяющий гель. Значительная часть белка мигрировала с бромфеноловым синим, примененным в качестве маркера фронта. Эта же зона белка, но выраженная гораздо слабее по сравнению с таковыми других субъядерных фракций, имеется также в щелочерастворимой фракции 2, экстрагируемой из ДНП. Очевидно, эта белковая зона не содержит белка S-100, хотя нельзя исключить того, что он может терять иммунологическую активность в результате воздействия химических агентов.

Полученные результаты в целом как будто бы согласуются с данными, согласно которым белок S-100 был обнаружен в растворимой

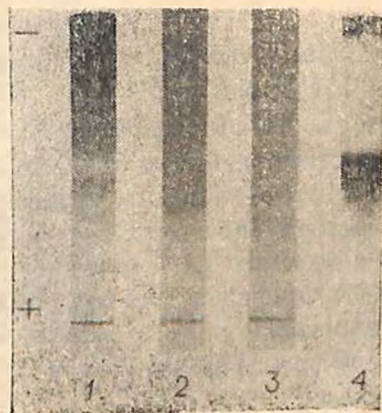
фракции ядер, ДНП комплексе и остаточной фракции [20]. Однако из двух последовательных экстрактов ДНП с иммунной сывороткой взаимодействовал только первый. Белок S-100, обнаруженный в ДНП комплексе, полностью переходит в надосадочную фракцию после снижения концентрации NaCl до 0,14 М. Кроме того, электрофоретические спектры белков растворимой фракции ядер и белков, переходивших в раствор при днализе ДНП фракции, были подобны. На основании этих фактов сделано предположение о возможном взаимозагрязнении растворимой фракции ядер и ДНП при выделении. Поэтому далее была модифицирована схема фракционирования ядерных белков путем увеличения объема и количества применяемых отмывок и использования метода хроматографии на гидроксипатите.



Рис. 2. Иммунодиффузионный анализ суб-фракций ядер. 1—растворимые белки ядер; 2—фракция ДНП; 3—щелочерастворимая фракция 2; 4—щелочерастворимая фракция 1; 5—фракция ДНП, растворимая в 0,10 М NaCl; 6—белок S-100

Необходимо было выяснить вопрос, содержится ли белок S-100 в хроматине и на какой стадии получения последнего он может экстрагироваться. Во избежание взаимозагрязнения получаемых фракций на каждом этапе получения хроматина ядра экстрагировали небольшими объемами соответствующих растворов ($1/3$ от веса ткани), центрифугировали и в надосадочной фракции после днализа и концентрирования методом иммунодиффузии определяли присутствие белка S-100. Полученные осадки экстрагировали еще 3—4 раза объемом раствора, рав-

Рис. 3. Диск-электрофореграммы белков субъядерных фракций. 1—растворимые белки ядер; 2—фракция ДНП, растворимая в 0,14 М NaCl; 3—щелочерастворимая фракция 1; 4—щелочерастворимая фракция 2



ным исходному весу ткани. Препараты хроматина имели следующие характеристики: $E_{230}/E_{260} = 1,1$, $E_{260}/E_{320} = 13$, что является свидетельством его чистоты [23]. В суммарном хроматине, полученном таким образом, белок S-100 не обнаруживался. Используя метод иммунодиффузии, было показано (рис. 4), что он полностью экстрагировал из ядер уже первым раствором, который применяется для получения хроматина и

содержит 80 мМ NaCl, 20 мМ ЭДТА (рН 6,5). Предполагая, что белок S-100 может связываться с другими белками и ДНК и поэтому не диффундировать в геле, было проведено фракционирование хроматина с использованием гидроксипатита. Во фракциях белка, полученных при отмывке гидроксипатита растворами с возрастающими концентрациями NaCl и мочевиной, белок S-100 также не обнаруживался (рис. 4), хотя во всех фракциях, образовавшихся как при очистке хроматина, так и при его фракционировании была выявлена белковая полоса, мигрирующая вместе с фронтом бромфенолового синего в 10,5%-ном ПААГ с додецилсульфатом натрия (рис. 5).

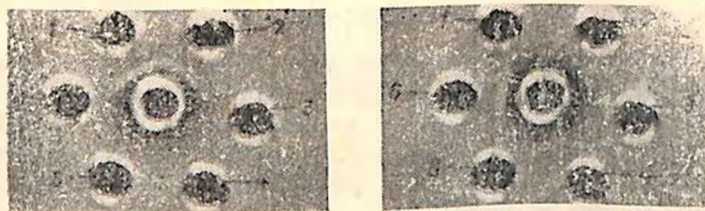


Рис. 4. Иммунодиффузионный анализ экстрактов, образующихся при выделении хроматина (а) и его фракционировании на гидроксипатите (б). а) 1—белок S-100; 2—экстракт исходных ядер раствором 80 мМ NaCl, 20 мМ ЭДТА; 3—экстракт раствором 0,15 М NaCl, 10 мМ трис-HCl, 1 мМ ЭДТА (рН 7,0); 4—экстракт раствором 1,5 мМ NaCl, 0,15 мМ цитрата натрия (рН 7,0); 5—исходный хроматин; 6—физиологический раствор б) 1—экстракт хроматина раствором 0,35 М NaCl, 80 мМ фосфата натрия (рН 7,0); 2—экстракт раствором 1 М NaCl, 80 мМ фосфата натрия (рН 7,0); 3—экстракт раствором 2 М NaCl, 80 мМ фосфата натрия; 4—экстракт раствором 2 М NaCl, 5 мМ мочевины, 80 мМ фосфата натрия (рН 7,0); 5—экстракт раствором 2 М NaCl, 5 М мочевины, 0,5 М фосфат натрия (рН 7,0); 6—белок S-100

При последовательном применении для экстракции ядер растворов 0,14 М NaCl (рН 7,0), 0,14 М NaCl (рН 8,0), 0,3 М NaCl (рН 8,0) объемы которых превышали вес исходной ткани в 5; 1,5 и 1,5 раза соответственно, белок S-100 обнаруживался в каждом из этих экстрактов (рис. 6). Первым раствором проводили одну экстракцию, вторым и третьим—по три. Однако при применении второго раствора в больших объемах (в 7 раз превышавшем вес взятой ткани) белок S-100 экстрагировался только первыми двумя растворами. Белок S-100 был обнаружен также в осадке, образовавшемся после обработки ядер этими растворами; в этом случае он экстрагировался 5%-ным пентанолом.

Можно сделать вывод, что белок S-100 не входит в состав хроматина, а локализуется в нуклеоплазме и на ядерной мембране. Подобные результаты были получены и с использованием иммунофлуоресцентной техники [11, 24]. Не исключено, что белок S-100, локализующийся в нуклеоплазме, образует два различных пула, так как раствором 0,14 М NaCl при рН 7,0 экстрагируются ядерные рибосомы, а пр

pH 8,0—ядерные РНП и некоторые другие белки [25]. Обнаружение белка S-100 в составе хроматина [22], по-видимому, можно объяснить недостаточной отмывкой последнего от белков нуклеоплазмы.

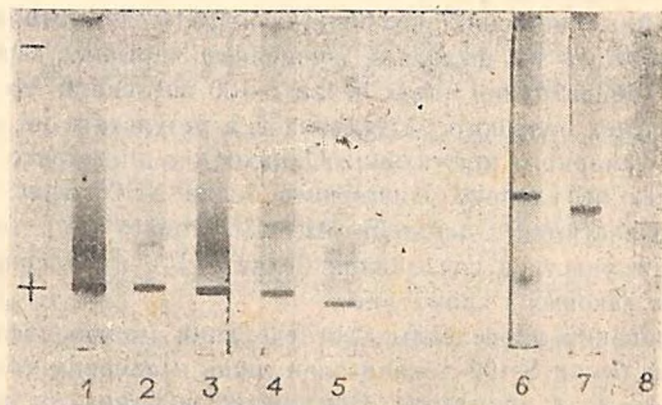


Рис. 5. Диск-электрофореграммы белковых фракций, полученных при выделении хроматина и фракционировании его на гидроксипатите (электрофорез фракций 1—5 проводили в течение 3 ч, а фракций 6—8—2,5 ч). 1—фракция, экстрагируемая из ядер раствором 80 мМ NaCl, 20 мМ ЭДТА (pH 6,5); 2—фракция, экстрагируемая из ядер раствором 1,5 мМ NaCl и 0,15 мМ цитрата натрия (pH 7,0); 3—хроматин; 4—фракция, экстрагируемая из хроматина раствором 0,35 М NaCl и 80 мМ фосфата натрия (pH 7,0); 5—фракция, экстрагируемая раствором 1 М NaCl и 80 мМ фосфата натрия (pH 7,0); 6—фракция, экстрагируемая раствором 2 М NaCl, и 80 мМ фосфата натрия (pH 7,0); 7—фракция, экстрагируемая раствором 2 М NaCl, 5 М мочевины, 80 мМ фосфат натрия (pH 7,0); 8—фракция, экстрагируемая раствором 2 М NaCl, 5 М мочевины, 0,5 М фосфата натрия (pH 7,0)



Рис. 6. Иммунодиффузионный анализ экстрактов при фракционировании ядер. 1—фракция, экстрагируемая из ядер раствором 0,14 М NaCl, 10 мМ трис-HCl, 1 мМ $MgCl_2$ (pH 7,0); 2—фракция, экстрагируемая 0,14 М NaCl, 10 мМ трис-HCl, 1 мМ $MgCl_2$ (pH 8,0); 3—фракция, экстрагируемая 0,3 М NaCl, 10 мМ трис-HCl, 1 мМ $MgCl_2$ (pH 8,0); 4—фракция, экстрагируемая 0,3 М NaCl, 10 мМ трис-HCl, 1 мМ $MgCl_2$ (pH 8,0) после интенсивной экстракции раствором 0,14 М NaCl, 10 мМ трис-HCl, 1 мМ $MgCl_2$ (pH 8,0); 5—фракция, экстрагируемая 5% пентанолом; 6—ядрышки

Была предпринята попытка выяснить, содержится ли белок S-100 в ядрышках. Учитывая способность белка S-100 увеличивать актив-

ность РНК-полимеразы I [6], можно предположить, что его функции связаны именно с этой структурой. В работах с использованием иммуофлуоресценции получены как данные о том, что белок S-100 входит в состав ядрышка [3, 4, 27], так и что он там отсутствует [1, 2, 26]. Полученные в наших условиях препараты хроматина содержали ядрышки, поэтому мы выделили очищенные ядрышки, так как в случае низких концентраций в них белка S-100 последний мог бы маскироваться за счет большого разведения и в результате не определяться в составе суммарного хроматина. Однако и в препарате изолированных ядрышек не удалось обнаружить белка S-100 (рис. 6). Эти результаты согласуются с данными Michetti, Donato [27], которые показали наличие участков связывания белка S-100 на ядерной мембране и отсутствие таковых в хроматине.

На основании проведенных исследований можно сделать вывод, что ядерный белок S-100 локализован лишь в ядерном соке и ядерной мембране, но не в хроматине. Следовательно, вряд ли он может непосредственно принимать участие в регуляции генетической активности клетки на уровне транскрипции. Однако, оказывая влияние на фосфорилирование ядерных белков и, возможно, на другие процессы в ядре, белок S-100 может опосредованно изменять степень экспрессии генома, а также участвовать в посттранскрипционной регуляции на этапах процессинга и транспорта РНК.

INTRANUCLEAR DISTRIBUTION OF NEUROSPECIFIC PROTEIN S-100 IN BOVINE CEREBELLUM

KAPRALOV A. A., SMERCHINSKAYA L. S., BELIK Ya. V., TJULENEV V. I.

A. V. Palladin Institute of Biochemistry, Ukrainian Academy of Sciences, Kiev

The presence of neurospecific protein S-100 has been studied by means of Ouchterlony immunodiffusion technique in the fractions obtained on differential extraction of isolated nuclei from bovine cerebellum. The protein was discovered in the nuclear juice and membrane. S-100 was not detected in the initial chromatin preparation and its fractions. When all chromatin fractions were subjected to SDS gel electrophoresis a protein zone had been detected that comigrated with bromphenol blue and didn't crossreact with antiserum against S-100. A possible mechanism of S-100 involvement in the realization of genetic information is discussed.

ЛИТЕРАТУРА

1. Hyden H., Mc Ewen B. C. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 55, 354—358, 1966.
2. Hansson H. A., Hyden H., Ronbäck L. Brain Res. 98, 349—352, 1975.
3. Корочкин Л. Н., Свиридов С. М., Иванов В. Н., Малецкая Е. И., Бахтина Т. К., ДАН СССР, 204, 468—470, 1972.
4. Свиридов С. М., Корочкин Л. Н., Иванов В. Н., Малецкая Е. И., Бахтина Т. К. J. Neurochem., 19, 713—719, 1972.
5. Donato R., Michetti F. J. Neurochem., 36, 1698—1705, 1981.

6. Miani N., Michetti F., De Renzis G., Caniglia A. *Experientia*, 29, 1499—1501, 1973.
7. Perumal A., Rapport S. *Life Science*, 22, 363—368, 1978.
8. Уманский С. Р. *Успехи биол. химии*, 17, 26—44, 1976.
9. Jonson J. D., Douvas A., Bolker J. *Int. Rev. Cyt.*, 4, 273—361, 1979.
10. Burdman J. A. *J. Neurochem.*, 19, 1459—1469, 1972.
11. Soudek D., Beneš L. *Folia Biol. (Prague)*, 1, 261—267, 1955.
12. Bloom N. S., Anderson J. N. *J. Biol. Chem.*, 253, 4446—4450, 1978.
13. Siegelman H. W., Wleczorek G. A., Turhern B. C. *Anal. Biochem.*, 402—404, 1965.
14. Busch H.—In: *Methods of Enzymol.*, 12, p. A. (Ed. by L. Grossman, K. Moldave), New York—London, Acad. Press, p. 421—448, 1967.
15. Rusca G., Calissano P., Alema S. *Brain Res.*, 49, 223—227, 1973.
16. Haglid K. G., Stavrou D. J. *J. Neurochem.*, 20, 1523—1532, 1973.
17. Гусев А. А., Цветков В. С. *Лабор. дело*, № 2, 43—45, 1961.
18. Смерчинська Л. С., Белік Я. В., Сироватська Л. П., Бірилло Г. М. *Укр. біохім. ж.*, 48, 609—614, 1976.
19. Маурер Г. *Диск-электрофорез. Теория и практика электрофореза в полиакриламидном геле*, М., Мир, 1971.
20. Laemmli U. K. *Nature*, 227, 680—685, 1970.
21. Busch H.—In: *Methods of Enzymol. v. 12*, p. A. (Ed. by L. Grossman, K. Moldave). New York—London, Acad. Press., p. 448—467, 1967.
22. Michetti F., Miani N., De Renzis G., N., Caniglia O., Correr S. *J. Neurochem.*, 22, 239—244, 1974.
23. Shaw M. M. J., Huang R. Ch. C. *Biochemistry*, 9, 4530—4542, 1970.
24. Tabuchi K., Kirsch M., Nakane P. K. *J. Neurol. Sci.*, 28, 65—76, 1976.
25. Георгиев Г. П., Самарина О. П. *Успехи биол. химии*, 10, 5—63, 1969.
26. Coechia D. *Neurosci. Lett.*, 13, suppl № 3, 158, 1979.
27. Michetti F., Donato K. *J. Neurochem.*, 36, 1706—1711, 1981.

Институт биохимии
им. А. В. Палладина
АН УССР, Киев

Поступила 15. VI 1982