

УДК 547.963

ДЕЙСТВИЕ НОРАДРЕНАЛИНА НА ФОСФОРИЛИРОВАНИЕ
ЯДЕРНЫХ БЕЛКОВ ГОЛОВНОГО МОЗГА

МИКЕЛАДЗЕ Д. Г., ФРАПКИНА Т. Я.

Показано, что норадреналин (НА) снижал активность формы 1 сАМР-зависимой протеникиназы (ПКазы) в цитозоле и увеличивал ее в ядрах клеток головного мозга крыс.

Изучено также фосфорилирование эндогенных субстратов ядерных ПКаз мозга. Обнаружено 4 фракции фосфорилирующихся белков, одна из которых обладала РНК-полимеразной активностью. Одним из механизмов действия НА на фосфорилирование ядерных белков в нервной ткани может быть транслокация цитоплазматической сАМР-зависимой ПКазы в ядро. Показано, что влияние НА на генетический аппарат нервной ткани может быть опосредовано сАМР.

Эффекты сАМР реализуются, в основном, через активацию протеникиназ (ПКаз), катализирующих фосфорилирование белков [1]. Реакции фосфорилирования—дефосфорилирования белков, по-видимому, являются одним из важных механизмов, регулирующих функциональную активность клетки [2]. В последнее время интенсивно исследуют ядерные ПКазы и их участие в процессах транскрипции и депрессии генома [3]. Показано, что в ядро транслоцируется каталитическая субъединица ПКаз, и ее специфическое воздействие на акценторные участки хроматина сопровождается фосфорилированием ядерных белков [4—6]. Появились сведения о возможной миграции свободных регуляторной и каталитической субъединиц, а также комплекса холофермент—сАМР из цитоплазмы в ядро [7]. Взаимодействие сАМР с регуляторной субъединицей сАМР-зависимой ПКазы может стимулировать не только фосфорилирование белков, но и процессы транскрипции по типу стероид-рецепторных комплексов [8].

В нервной, как и в других тканях, ПКазы опосредуют эффекты сАМР в ответ на действие гормонов или нейромедиаторов, фосфорилируя белки синаптических мембран, ферменты, участвующие в синтезе нейромедиаторов и т. д. [9]. Согласно модели, предложенной Williams [10], фосфорилирование ядерных белков в нервной ткани, осуществляемое ядерными ПКазами, может принимать участие в депрессии генома и контролировать таким образом функциональную активность ЦНС. Однако в механизме действия нейромедиаторов и сАМР на фосфорилирование ядерных белков мозга многое еще остается неясным.

Настоящая работа была посвящена изучению механизма действия НА на фосфорилирование ядерных белков и активность ядерных ПКаз, а также выявлению эндогенных субстратов указанных ферментов в нервной ткани.

Материалы и методы

Опыты были проведены на белых крысах массой 100—150 г. Активность ПКазы определяли по методу Chuang и др. [11]. Инкубационная среда содержала: 50 мМ трис-НСI (рН 6,5), 8 мМ MgCl₂, 2,5 мМ теофиллина, 550 мкМ γ -³²P-АТР (2—5×10⁵ имп/мин в пробе), 6,2% глицерина, 0,6 мг/мл суммарного гистона и 25—40 мкг фермента. Инкубацию проводили при 30° в течение 15 мин. Реакцию начинали добавлением фермента и останавливали охлаждением инкубационной смеси до 4°. К реакционной смеси добавляли 50 мкл 50%-ной ТХУ, содержимое пробирки наносили на смоченный стандартный диск диаметром 24 мм из бумаги Whatman 3 ММ, пробирку промывали 200 мкл 25%-ной ТХУ. Фильтры промывали 4 мл 10%-ной ТХУ, 4 мл раствора солевой смеси (10 мМ NaH₂PO₄, 10 мМ Na₄P₂O₇, 10 мМ Na₂WO₄), далее 4 мл смеси спирт-ацетон (1:1) и, наконец, 2 мл ацетона. Высушенные фильтры заливали 10 мл толуольного сцинтиллятора и измеряли радиоактивность на жидкостно-сцинтилляционном счетчике «Intertechnique-SL-30» (Франция).

Определение активности РНК-полимеразы проводили по методу, описанному Hirsch, Marielo [12]. Инкубационная смесь в объеме 50 мкл содержала в мкмоль: трис-НСI—2 (рН 7,9), АТР, GTP, CTP—по 0,3; MnCl₂—0,1, ¹⁴C-УТР (1—2×10⁶ имп/мин в пробе)—0,018, (NH₄)₂ SO₄—2,6; ДНК тимуса—20 мкг (в контрольную пробу ДНК не добавляли) и белковый раствор—10—15 мкг. Инкубацию проводили 10 мин при 37°, после чего инкубационную смесь охлаждали до 0° и наносили на смоченный 5%-ной ТХУ стандартный диск диаметром 24 мм из бумаги Whatman 3 ММ. В дальнейшем такой фильтр промывали на воронке с водоструйным насосом 4 раза по 5 мл охлажденной 5%-ной ТХУ и один раз 10 мл охлажденного 95%-ного этанола. Высушенные фильтры помещали в сцинтилляционные флаконы и измеряли радиоактивность.

Срезы готовили на микротоме (d=0,4 мм) из замороженного мозга. Инкубацию срезов с НА в концентрации 500 мкМ [13] проводили согласно Reddington и соавт. [14]. Инкубационная среда содержала в мМ: NaCl—128; KCl—6,3; CaCl₂—2,8; MgSO₄—1,3; трис-НСI (рН 7,4)—25; глюкозы—10; АТР—5. Инкубацию проводили при 37° в течение 15 мин из расчета 5 мл инкубационной смеси на 1 г срезов. В контроле срезы инкубировали без НА в тех же условиях. После инкубации смесь охлаждали и центрифугировали 10 мин при 11 000 г.

Ядра из срезов мозга крысы получали по методу, описанному Majumder [15]. Для получения ядерных белков ядра суспендировали в буфере, содержащем 1 М NaCl; 0,02 М трис-НСI (рН 7,5); и гомогенизировали в стеклянном гомогенизаторе с тефлоновым пестиком. Далее к го-

могенату добавляли 1,5 объема 0,02 М трис-НСl (рН 7,5) и оставляли на 30 мин. Суспензию центрифугировали 1 ч при 20 000 g. Супернатант анализировали в течение ночи против 0,4 М NaCl, 0,02 М трис-НСl (рН 7,5). Все процедуры проводили при 4°.

Для получения цитозольной фракции белков срезы после инкубации суспендировали в трех объемах 0,32 М сахарозы, центрифугировали 45 мин при 20 000 g и собирали надосадочную жидкость. Далее проводили хроматографию ядерных и цитоплазматических белков на колонке с ДЭАЭ-целлюлозой (0,9×30). Элюцию осуществляли в градиенте NaCl (0—0,4 М) со скоростью 20 мл/ч, собирали фракции по 2 мл, в элюатах определяли активность ПКаз. Содержание белка в пробах определяли по методу Lowry и др. [16].

В работе были использованы: γ -³²-P-АТР „Amersham“ (Англия), ¹⁴C-АТР, ¹⁴C-УТР „UBBR“ (Чехословакия), АТР, GTP, CTP „Reanal“ (Венгрия), суммарный гистон „Sich“ (Польша), сефадекс G-200, G-50, „Pharmacia“ Швеция, тритон X-100 „Schuchardt“ (ФРГ), ДЭАЭ-32-целлюлоза „Whatman“ (Англия), ДНК тимуса „Олайн“ (г. Рига), нордреналин „Koch-Light“ (Англия).

Результаты и обсуждение

Действие НА на активность ядерных и цитоплазматических ПКаз мозга. Большинство исследователей придерживается гипотезы, согласно которой присутствие ПКаз в ядрах клеток является результатом опосредованной сАМР транслокации регуляторной или каталитической субъединицы фермента из цитоплазмы в ядро [6]. Другая точка зрения предполагает присутствие в ядрах собственно ядерных сАМР-зависимых ПКаз; в пользу этого мнения в литературе представлено мало работ [17, 18].

Ранее нами в мягких условиях очистки также была выделена сАМР-зависимая ПКаз из ядер клеток мозга крыс, диссоциирующая на регуляторную и каталитическую субъединицы в присутствии сАМР [19]. Полученные данные свидетельствовали в пользу того, что одним из механизмов действия сАМР на фосфорилирование ядерных белков является, возможно, непосредственный эффект циклического нуклеотида на ядерный фермент.

В настоящей работе транслокация сАМР-зависимых ПКаз из цитоплазмы в ядро в нервной ткани была исследована в опытах по изучению действия НА на активность ядерных и цитоплазматических ПКаз в срезах мозга крыс. На рис. 1 представлены данные, указывающие на изменения ПКазной активности в растворимой фракции мозга под действием НА. При хроматографии цитоплазматических белков из срезов мозга на ДЭАЭ-целлюлозе в градиенте NaCl было получено две формы ПКазы, что согласуется с литературными данными о том, что в цитозоле клеток различных тканей присутствуют две формы сАМР-зависимых ПКаз: I и II [20]. После инкубирования срезов мозга с НА в цитозоле уменьшалась активность обеих форм ПКаз (рис. 1).

При хроматографии ядерных белков из срезов мозга на ДЭАЭ-целлюлозе в градиенте NaCl были получены три формы ПКаз (рис. 2). НА вызывал увеличение активности формы I ПКазы в ядре. Возможно, увеличение ПКазной активности в ядрах мозговой ткани, сопровождавшееся уменьшением активности фермента в цитозоле, было обусловлено транслокацией сАМР-зависимой ПКазы из цитоплазмы в ядро под действием НА. Ранее было установлено [6], что увеличение ядерной ПКазной активности может быть результатом транслокации сАМР-зависимых ПКаз из цитоплазмы в ядро.

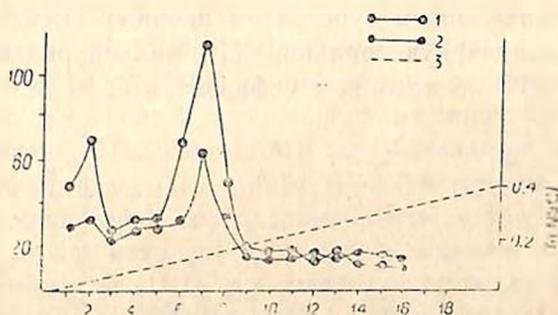


Рис. 1. Хроматография на ДЭАЭ-целлюлозе цитоплазматических белков из срезов мозга, инкубированных с норадреналином. На оси абсцисс—номера проб, на оси ординат—активность протеинкиназы (пмоль ^{32}P в пробе). Условные обозначения: 1—контроль (срезы инкубировались в отсутствие норадреналина); 2—срезы инкубировались в присутствии норадреналина; 3—градиент NaCl

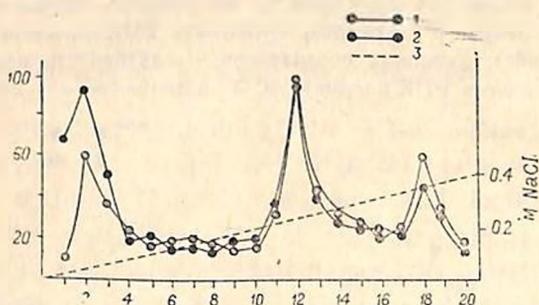


Рис. 2. Хроматография на ДЭАЭ-целлюлозе ядерных белков из срезов мозга, инкубированных с норадреналином; обозначения те же, что и на рис. 1

Таким образом, было выявлено два механизма регуляции активности ядерных ПКаз в нервной ткани: непосредственный эффект сАМР на собственно ядерную ПКазу и транслокация сАМР-зависимой ПКазы из цитоплазмы в ядро под действием НА.

Фосфорилирование эндогенных субстратов ядерных ПКаз мозга.

При изучении эндогенных субстратов ядерных ПКаз в нервной ткани вызывает интерес фракция, элюирующаяся в свободном объеме колонки при гель-фильтрации ядерного экстракта из мозга крысы на сефадексе G-200 [19], так как в некоторых тканях ядерные ПКазы могут

быть ассоциированы с высокомолекулярными белками, в частности, с РНК-полимеразой [21]. На рис. 3 дан профиль элюции ядерного экстракта из мозга крысы на сефадексе G-200.

Оказалось, что указанная выше фракция ядерной ПКазы мозга обладает РНК-полимеразной активностью. Мы предположили, что она ассоциирована с РНК-полимеразой, связь с которой не разрушается при мягких условиях выделения и фракционирования. РНК-полимераза может быть субстратом для ядерных ПКаз в некоторых тканях [22, 23], однако в литературе нет сведений о ее фосфорилировании в мозгу. В связи с этим была поставлена задача выяснить, может ли РНК-полимераза служить эндогенным субстратом ядерных ПКаз мозга. С этой целью высокомолекулярную фракцию ПК инкубировали с γ - ^{32}P -АТР. После удаления АТР на колонке с сефадексом G-50 дальнейшее разде-

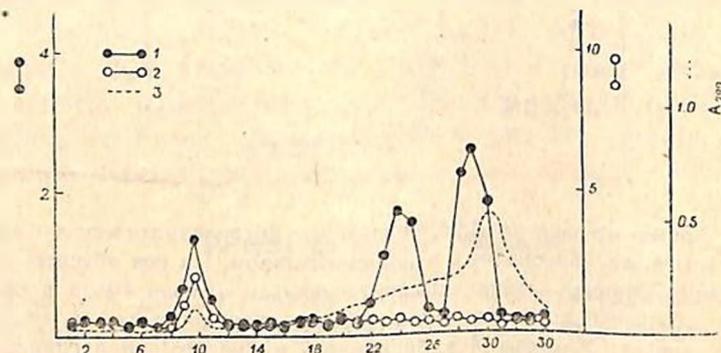


Рис. 3. Гель-фильтрация ядерного экстракта из мозга крысы на сефадексе G-200. На оси абсцисс—номера проб, на оси ординат—активность протенин-киназы (10^{-2} пмоль ^{32}P в пробе), активность РНК-полимеразы ($10^{-3} \times$ имп/мин в пробе). Условные обозначения: 1—активность протенинкиназы, 2—активность РНК-полимеразы, 3—поглощение при 280 нм

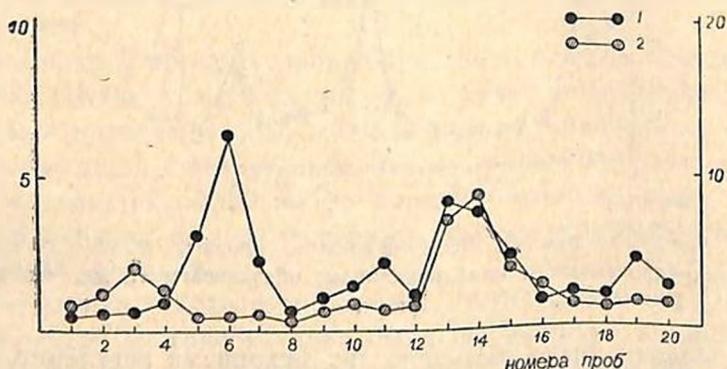


Рис. 4. Разделение фракций белков, фосфорилируемых ядерной протенин-киназой мозга, хроматографией на ДЭАЭ-целлюлозе. На оси абсцисс—номера проб, на оси ординат—включение ^{32}P (10^{-3} ^{32}P), активность РНК-полимеразы ($10^{-3} \times$ ^{14}C в пробе). Условные обозначения: 1—включение ^{32}P , 2—активность РНК-полимеразы

ление смеси проводили хроматографией на ДЭАЭ-целлюлозе в градиенте NaCl . В элюатах из колонки было обнаружено 4 эндогенные фракции белков, фосфорилируемых ядерной ПКазой (рис. 4), одна из которых

(третья по счету) обладала РНК-полимеразной активностью. Эта фракция элюировалась в свободном объеме колонки с сефадексом G-200, что свидетельствовало о ее высокой М; полученные данные согласуются с литературными, так как показано, что М РНК-полимеразы мозга составляет 480—520 кД [24].

Таким образом, удалось установить, что одна из эндогенных фракций белков, фосфорилируемых ядерной ПКазой в нервной ткани, обладает РНК-полимеразной активностью. По всей видимости, РНК-полимераза является эндогенным субстратом ядерной ПКазы мозга. Что же касается остальных трех эндогенных фракций белков, фосфорилируемых ядерной ПКазой мозга, то их природа неизвестна.

На основании полученных данных можно заключить, что эффекты НА на генетический аппарат в нервной ткани могут быть опосредованы циклазной системой. Действие сАМР осуществляется либо через участие собственно ядерных ПКаз, либо транслоцирующих из цитоплазмы ферментов, фосфорилирующих ядерные белки, в том числе и РНК-полимеразу. Это может находить свое выражение и в изменениях функциональной активности ЦНС, в частности в процессе обучения животных. Так, интракраниальное введение крысам структурных аналогов сАМР—ингибиторов активности ПКаз ядер головного мозга сопровождалось ухудшением обучаемости животных [25].

EFFECT OF NOREPINEPHRINE ON THE PHOSPHORYLATION OF BRAIN NUCLEAR PROTEINS

MIKELADZE D. G., FRAIKINA T. Ya.

I. S. Beritashvili Institute of Physiology, Georgian Academy of Sciences, Tbilisi

The effect of norepinephrine (NE) on the nuclear and cytosol protein kinase activity has been studied in rat brain slices. NE increased protein kinase activity (form 1) in nuclei and decreased it in cytosol. NE may affect the phosphorylation of nuclear proteins in nervous tissue by translocation of the cytosol cAMP-dependent protein kinase into nucleus and by direct effect on the nuclear protein kinase. The phosphorylation of endogenous substrates of brain nuclear protein kinase has been studied. One of the four fractions of phosphorylated proteins was shown to possess the RNA polymerase activity. It is concluded that biogenic amines may act on nervous tissue genome via cAMP and nuclear protein kinase activation.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Greengard P. Science, 199, 4325, 146—152, 1978.
2. Huttner W. B., De Gennaro L. J., Greengard P. J. Biol. Chem., 256, 1482—1488, 1981.
3. Kurosawa A., Galdotti A., Costa E. Mol. Pharmacol., 15, 115—130, 1979.
4. Costa E., Kurosawa A., Galdotti A. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 73, 1058—1062, 1976.

5. *Spielvogel A. M., Mednicks M. L., Eppenberger U., Jungmann R. A.* Eur. J. Biochem., **73**, 199—212, 1977.
6. *Jungmann R. A., Kranias E. G.* Int. J. Biochem., **8**, 12, 819—830, 1977.
7. *Cho-Chung Y. S., Archibald D., Clair T.* Science, **205**, 1390—1392, 1979.
8. *Doskeland S. O., Ogreid D.* Int. J. Biochem., **13**, 1, 1—19, 1981.
9. *Greengard P.*—In: Cyclic Nucleotides, Phosphorylated Proteins and Neuronal Function, N. Y., Raven Press, 1978.
10. *Willtams M.* Trends Biochem. Sci., **4**, 2, 25—28, 1979.
11. *Chuang D. M., Hollenbeck R. A., Costa E. J.* Biol. Chem., **252**, 8365—8373, 1977.
12. *Hirsch J., Martelo O. J.* Biol. Chem., **251**, 5408—5413, 1976.
13. *Willtams M.* Brain Res., **109**, 190—195, 1976.
14. *Reddington M., Rodnight R., Williams M.* Biochem. J., **132**, 475—482, 1973.
15. *Majumder G. C.* Biochem. J., **165**, 469—477, 1977.
16. *Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. I.* J. Biol. Chem., **193**, 265—275, 1951.
17. *Castagna M., Palmer W. R., Walsh P. A.* Eur. J. Biochem., **55**, 193—199, 1975.
18. *Neumann J. R., O'Meara A. R., Herrmann R. L.* Biochem. J., **171**, 123—135, 1978.
19. *Фрайкина Т. Я., Микеладзе Д. Г.* Сообш. АН ГССР, **93**, 697—700, 1980.
20. *Corbin J. D., Keely S. L., Park C. R.* J. Biol. Chem., **250**, 218—225, 1975.
21. *Hirsch J., Martelo O.* Biochem. J., **169**, 355—359, 1978.
22. *Martelo O., Hirsch J.* Biophys. Biochim. Res. Commun., **58**, 1008—1015, 1974.
23. *Jungmann R. A., Kranias E. G.*—In: Advances in Biochem. Psychopharmac., N. Y., p. 413—428, 1976.
24. *Yamamoto H., Takanashi Y.* J. Neurochem., **342**, 255—260, 1980.
25. *Фрайкина Т. Я., Микеладзе Д. Г.* Изв. АН ГССР, Сер. Биол., **6**, 3, 223—300, 1980.

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

Поступила 26. II 1982