

УДК 547.963

ВЫДЕЛЕНИЕ И СВОЙСТВА ЯДЕРНОЙ Ca^{2+} -КАЛЬМОДУЛИНЗАВИСИМОЙ ПРОТЕИНКИНАЗЫ II ИЗ МОЗГА КРЫС

Каландадзе И.В., Дзнеладзе Д.Т., Микеладзе Д.Г.

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

Ca^{2+} -кальмодулинзависимая протеинкиназа II была выделена из нуклеоплазмы мозга крыс. С помощью хроматографирования ядерного экстракта на ионообменных колонках ДЭАЭ-ц и Моно-Q, аффинной хроматографии на кальмодулин-сепарозе и гель-фильтрации на ультрагеле АсА-34 был получен высокоочищенный препарат Ca^{2+} -кальмодулинзависимой протеинкиназы II. По сравнению с ядерным экстрактом получена 600-кратная очистка приблизительно с 7%-ным выходом и с активностью 0,5 мкмоль в мин/мг белка.

Гель-фильтрационный анализ показал, что фермент является олигомером с М, 480000, тогда как электрофоретический анализ этого белка выявил, что фермент состоит из 2 субъединиц с 62 и 53 кД соответственно.

Была изучена субстратная специфичность Ca^{2+} -кальмодулинзависимой протеинкиназы. Показано, что фермент с высокой скоростью фосфорилирует как кислые, так и основные белки. Хорошими субстратами являются гистоны, тубулин, основной белок миелина и др. Было также выяснено, что по сравнению с кальмодулином другие регуляторы (спермидин, сАМР, фосфатидилсерин и т.д.) не влияют на активность этой протеинкиназы.

* * *

Ионы кальция играют ведущую роль в функциональной активности нервной ткани. В нейронах они выполняют функцию внутриклеточного посредника и контролируют важнейшие процессы [1] посредством мультифункционального белка кальмодулина [2]. Множество из этих эффектов Ca^{2+} -кальмодулиновый комплекс осуществляет через фосфорилирование [3]. В разных лабораториях мира были идентифицированы различные типы Ca^{2+} -кальмодулинзависимых протеинкиназ: киназа легкой цепи миозина [4], киназа фосфорилазы [5], NAD-киназа [6], Ca^{2+} -кальмодулинзависимых протеинкиназа I, фосфорилирующая синапсин I [7], Ca^{2+} -кальмодулинзависимая протеинкиназа III, специфически фосфорилирующая белок с М, 100 кД [8] и Ca^{2+} -кальмодулинзависимой протеинкиназа II (Ca^{2+} -СаМ-зависимая ПК II). Последняя фосфорилирует синапсин, MAP-2, тубулин и другие белки [9,10]. Фермент существует как в связанной с мембранами, так и в растворимой форме. В последнее время в литературе появились данные, свидетельствующие о том, что растворимая Ca^{2+} -СаМ-зависимой ПК может либо связаться с тубулином

и включаться в цитоскелетный комплекс, либо находится в свободной форме [11].

Ранее нами было показано существование Ca^{2+} -CaM-зависимой ПК в ядрах нервной клетки, фосфорилирующей гистоны и имеющую большую величину M_r [12]. В настоящей работе описывается очистка этого фермента и показана его идентичность с Ca^{2+} -CaM-зависимой ПК.

Материалы и методы

Ядра выделяли по методу Chauveau и соавт. [13]. Тубулин выделяли по методу Jilson и соавт. [14], основной белок миелина по методу Chau и соавт. [15], а легкую цепь миозина по методу Matsuda и соавт. [16]. Кальмодулин получали с помощью аффинной колонки трифторперазин-сефарозы по методу Lin и соавт. [17], трифторперазин-сефарозу синтезировали по методу Charbonneau и Cormier [18], кальмодулин связывали с сефарозой 4В по методу Niggly [19]. Белок определяли по методу Bradford [20].

Протеинкиназную активность определяли в 200 мл среды, содержащей 50 мМ трис-НСl, pH 7,5, 10 мМ CaCl_2 , 2 мМ MgCl_2 , 25 мк $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ ($2\text{--}5 \cdot 10^6$ имп/мин в пробе), 0,6 мг/мл суммарного гистона (или других субстратов), $2\text{--}5$ мкг кальмодулина (или других активаторов), $0,5\text{--}20$ мкг белка.

Инкубацию проводили при 30° в течение 15 мин в водяной бане при непрерывном встряхивании. Реакцию начинали добавлением фермента и останавливали добавлением ТХУ (конечная концентрация ТХУ 25%). Смесь выстаивали в течение 10 мин и фильтровали на фильтрах Whatman 3 ММ (диаметр 24 мм) и промывали 15 мл 5%-ным раствором ТХУ, содержащим 5 мМ $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$, 5 мМ NaH_2PO_4 , 5 мМ Na_2WO_4 , после этого 1 мл этанола. Радиоактивность считали в толуольном сцинтиллаторе на жидкостно-сцинтилляционном счетчике SL-4000 «Intertec» (Франция). За единицу активности принимали количество ^{32}P , включенного в субстрат за 15 мин в стандартных условиях определения фосфотрансферной реакции.

В работе были использованы следующие реактивы: трис, АТР, сАМР и сGMP («Reanal», Венгрия), казеин, спермидин, фосфатидилсерин и фосфатидилхолин («Serva», ФРГ), суммарный гистон («Ciech», Польша), ФМСФ (фенилметилсульфотрифтормид), фракции гистонов H1, H2a, H2b, H3 («Sigma», США), гель-фильтрационную колонку калибровали набором стандартных белков MS-II («Serva», ФРГ).

Результаты и обсуждение

Экстракция ядерной протеинкиназы. Мозг животных (1,2 г каждый) выделяли, немедленно гомогенизировали в тefлоновом гомогенизаторе Поттера со скоростью 900 об/мин в 4 объемах 2,1 М сахарозы, 3 мМ $MgCl_2$, 0,2 мМ ФМСФ. После фильтрования через марлю ядра осаждали на 20000g в течение 40 мин. Изолированные ядра суспендировали в 0,3 М сахарозе, 3 мМ $MgCl_2$, 0,2 мМ ФМСФ, 20 трис-НСl, рН 7,5 и затем добавляли 1/4 объема 1,7 М NaCl, 15 мМ $MgCl_2$, 100 мМ трис-НСl рН 7,5, 25 мМ 2-меркаптоэтанол, 1 мМ ФМСФ до конечной концентрации NaCl, равной 0,35 М. После перемешивания в течение 30 мин при 4° смесь центрифугировали при 60000 g 30 мин и супернатант диализовали против 10 мМ трис-НСl, рН 7,5, 0,2 мМ ФМСФ, 0,05 мМ ЭГТА (буфер А).

Хроматография на ДЭАЭ-ц. Ядерный экстракт наносили на колонку (1,2×30 см), предварительно уравновешенную буфером А. Колонку промывали одним объемом буфера А и создавали линейный градиент 0-0,4М NaCl в буфере А. Фракцию, содержащую Ca^{2+} -СаМ-зависимую ПК активность, собирали и диализовали против 10 мМ Na^+ -ацетатного буфера рН 6,5 (буфер Б) в течение ночи.

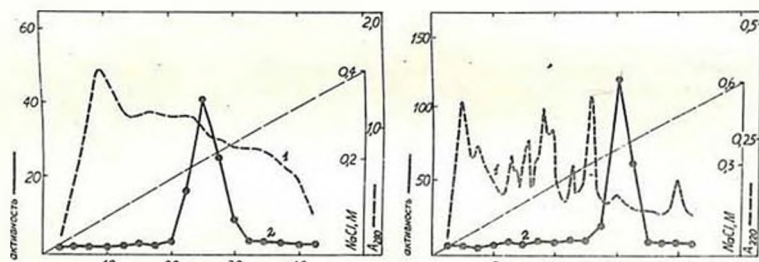


Рис.1. Хроматографирование белков 0,4 М NaCl-ядерного экстракта на ДЭАЭ-ц. 1—поглощение при 280 нМ, 2—протеинкиназная активность (нмоль/мин/мл)

Рис.2. Хроматография высокого давления белков, полученных после ДЭАЭ-целлюлозной колонки на Моно-Q. 1—поглощение при 220 нм, 2—протеинкиназная активность (пмоль ^{32}P /мин/ мл)

На рис.1 дана типичная картина разделения белков на ДЭАЭ-ц. Фракцию, содержащую Ca^{2+} -СаМ-зависимую ПК активность, элюировали при концентрации NaCl 0,15—0,20 М, что соответствует данным, полученным другими авторами при очистке цитозольной формы фермента [21].

Хроматография высокого разрешения на Моно-Q. Диализат наносили на колонку Моно-Q («Pharmacia», Швеция) с помощью 10 мл суперпетли. Колонка предварительно была уравновешена буфером Б. Колонку

промывали 5 мл буфера Б и элюировали 20 мл линейного градиента 0—0,6 М NaCl в буфере Б со скоростью 1 мл в мин. Фракцию, содержащую протеинкиназную активность, собирали и диализировали против буфера, содержащего 0,2 мМ CaCl_2 , 50 мМ NaCl, 1 мМ MgCl_2 , 40 мМ трис-HCl, pH 7,5 (буфер С), с 2-кратной его заменой.

На рис.2 дан профиль элюции с колонки Моно-Q. Элюирование Ca^{2+} -СаМ-зависимой ПК с колонки происходило при концентрации NaCl 0,3—0,35 М.

Аффинная хроматография на СаМ-сефарозе. Элюаты с Моно-Q, содержащие фосфотрансферазную активность, для дальнейшей очистки наносили на аффинную колонку кальмодулин-сефарозы (1×2 см), уравновешенную буфером С. Затем колонку промывали до тех пор, пока поглощение при 220 нм не опускалось до базовой линии. Ферментативно активную фракцию элюировали с колонки 1 мМ ЭГТА, 200 мМ NaCl, 1 мМ MgCl_2 , 40 мМ трис-HCl, pH 7,5, собирали и концентрировали на ультрафильтрационной ячейке «Атисон» (США) с использованием фильтра РМ-10 (рис.3).

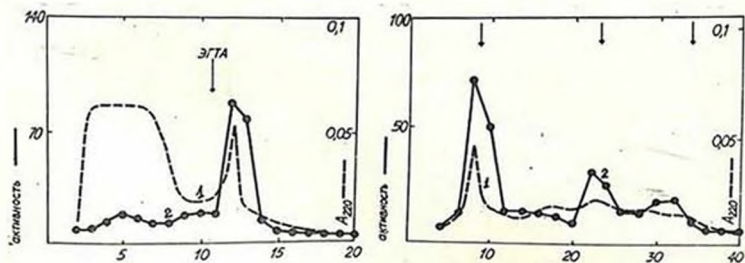


Рис.3. Хроматографирование Ca^{2+} -кальмодулинзависимой протеинкиназы на колонке кальмодулин-сефарозы. 1—поглощение при 220 нм, 2—протеинкиназная активность (пмоль ^{32}P /мин/мл)

Рис.4. Гель-фильтрация кальмодулинсвязывающих белков на Ультрагеле АсА-34. 1—поглощение при 220 нм, 2—протеинкиназная активность

Klee, Newton выдвинули предположение о возможной взаимосвязи кальмодулинсвязывающих белков [22]. Эти белки в больших количествах присутствуют в мозгу и взаимодействуют друг с другом, образуя сложные мультиферментативные комплексы, которые совместно очищаются на ионообменных колонках и СаМ-сефарозе. Исходя из вышесказанного, дальнейшую очистку Ca^{2+} -СаМ-зависимой ПК проводили на гель-фильтрационной колонке Ультрагеля АсА-34. Для этого очищенную на СаМ-сефарозе фракцию наносили на колонку Ультрагеля АсА-34 (0,9×30 см) «LKB» (Швеция), уравновешенную 50 мМ NaCl, 50 мМ трис-HCl, pH 7,5. Элюирование проводили тем же буфером со скоростью 4 мл в ч. Колонку

стандартизировали набором MS-11. В элюатах измеряли Ca^{2+} -зависимую ПК активность.

Следует отметить, что на всех стадиях очистки Ca^{2+} -СаМ-зависимой ПК сопутствовала и сАМР-зависимая протеинкиназная активность. Эти ферменты элюировали вместе с ДЭАЭ-целлюлозной колонки, с колонки Моно-Q и аффинной колонки СаМ-сефарозы, и лишь после экспозиции этого мультиферментного комплекса с ЭГТА отдельные ферменты разделяли по величине М, с помощью гель-фильтрации на Ультрагеле АсА-34. Как видно из рис.4, протеинкиназная активность выходит в виде двух пиков. Первый из них соответствует белку с М, 480 кД, а второй—180 кД. Чувствительность к кальмодулину проявляла лишь первая фракция протеинкиназы, а вторая активировалась сАМР.

Электрофорез 480 кД белка в ДДС-На ПААГ показал наличие двух фракций с М, 63 кД и 52 кД (рис.5).

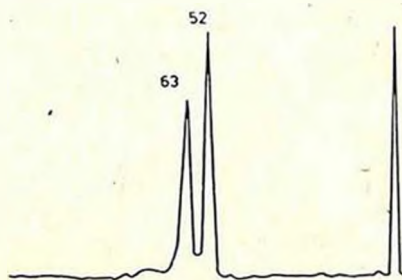


Рис.5. Электрофореграмма и денситограмма 480 кД белка в ДДС-На ПААГ

В последнее время Ca^{2+} -СаМ-зависимая ПК выделена из мозга разными исследователями [23—25]; показано, что величина М, холофермента колеблется от 460 до 650 кД и содержит по два белка с М, 50 и 60 кД. Полученный нами препарат фермента как по величине М, так и по субъединичному составу идентичен препаратам, полученным другими авторами.

Полученная с Ультрагеля АсА-34 Ca^{2+} -СаМ-зависимая ПК была очищена по сравнению с ядерным экстрактом в 600 раз с общим выходом 7% (табл.1). Очищенный фермент имел активность в предлах 0,5 мкмоль в мин/мг белка. Полученные результаты свидетельствуют, что этот фермент в мозгу, в частности в ядрах клеток мозга, имеется в большом количестве, поскольку лишь 500—600-кратная очистка необходима для получения его в гомогенном состоянии.

Таблица 1

Суммирующая таблица очистки ядерной Ca^{2+} -кальмодулинзависимой протеникиназы

Стадии очистки	Общий белок (мг)	Общая активность (нмоль в мин)	У. А. (нмоль в мин на мг белка)	Степень очистки	Выход (%)
1.0,35 М NaCl ядерный экстракт	55	51,2	0,93	1	100
2.Хроматографирование на ДЭАЭ-ц	3,5	11,5	3,28	3,5	23
3.Хроматографирование на Моно-Q	0,055	8,36	152	163	16
4.Хроматографирование на кальмодулин-сефарозе	0,022	6,0	273	293	11
5.Гель-фильтрация на Ультрагеле АсА-34	0,007	3,64	520	559	7

Примечание. Очистку проводили из 60-70 г мозга крыс.

Таблица 2

Субстратная специфичность Ca^{2+} -кальмодулинзависимой протеникиназы

Субстраты	Протеникиназная активность (%)
1.Тотальный гистон	100
2.Гистон H1	142
3.Гистон H3	112
4.Основной белок миелина	223
5.Тубулин	194
6.Регулярная субъединица сАМР-зависимой ПК	214
7.Казеин	85
8.Легкая цепь миозина	75
9.Протамин	95
10.Контроль	21

Примечание. В опытах использовали субстратные белки в концентрации 100 мкг/мл.

Выше было отмечено, что препараты Ca - CaM -зависимой ПК, полученные разными авторами, состоят из двух субъединиц с M_r 60 и 50 кД. Несмотря на то, что эти ферменты являются идентичными и представляют собой семейство одной протеникиназы, они проявляют разную субстратную специфичность и фосфорилируют множество разнообразных белков. Нами была изучена субстратная специфичность выделенного фермента (табл.2). Наиболее высокую активность фермент проявляет к тубулину, основному белку миелина, к гистонам. Кроме того, он хорошо фосфорилирует казеин,

легкую цепь миозина, протамин. Фермент не активируется ни сАМР, ни сGMP, ни полиаминами, ни фосфолипидами. На скорость реакции не влияют РНК и ДНК (табл.3).

Таблица 3

Зависимость Ca^{2+} -кальмодулинзависимой активности от различных регуляторов

Добавки	Протеинкиназная активность (%)
контроль	28
+ 250 нМ кальмодулина	100
+ 10 мкМ спермидина	25
+ 10 мкМ сАМР	32
+ 10 мкМ сGMP	29
+ 10 мкМ фосфатидилхолина	42
+ 10 мкМ фосфатидилсерина	38
+ 25 мкг/мл ДНК	20
+ 25 мкг/мл РНК	24

Примечание. За 100% активности принимали включение [^{32}P] в 10 мкг тотального гистона, катализировавшегося ферментом в присутствии 250 нМ кальмодулина — 475 нмоль/мин/мг.

Таким образом, из нуклеоплазмы нейронов мозга выделена свободная от цитоскелетных белков Ca^{2+} -CaM-зависимая ПК, близкая по своим каталитическим и физико-химическим свойствам цитоплазматическому ферменту. Учитывая, что Ca^{2+} -CaM-зависимая ПК обнаруживается также и в ядерном матриксе [26], можно предположить, что в ядрах, так же как и в цитоплазме, существуют две формы этого фермента: связанная с цитоскелетом и свободная.

ISOLATION AND PROPERTIES OF NUKLEAR Ca^{2+} -KALMODULIN-DEPENDENT PROTEINKINASE II FROM RAT BRAIN

Kalandadze I.V., Dzeladze D.T., Mikeladze D.G.

*Beritashvili Institute of Physiology,
Academy of Sciences of the Georgian SSR, Tbilisi*

Ca^{2+} -calmodulin-dependent protein kinase II was isolated from the soluble fraction of rat brain nuclei. Purification was achieved by chromatography of the nuclear extract on DEAE-cellulose and Mono-Q columns, affinity chromatography on Calmodulin-Sepharose and gel-filtration on an Ultrogel ACA-34 column. The enzyme was purified 600-fold as compared with the crude nuclear extract, the yield being equal to 7%. The activity of the final preparation was 0,5 $\mu\text{moles/min}$ per milligram protein.

Gel-filtration of the purified material has shown that the enzyme is an oligomer with molecular weight of 480 kDa containing two subunits with molecular weights of 62 kDa and 53 kDa as shown by gel electrophoresis.

The enzyme intensively phosphorylates acidic as well as basic proteins. Histones, tubulin and myelin basic protein serve as good substrates. Spermine, cAMP and phosphatidylserine do not affect the enzyme activity.

Ca^{2+} -calmodulin-dependent protein kinase II appears to play an important role in the nerve cell chromatin.

ЛИТЕРАТУРА

1. Cohen., Aitken A., Damuni Z., Nemmings B.A., Ingebritsen T.S., Parcer P.J., Picton C., Resink T., Steward A.A., Tonks N.K., Woodgett J. — In: Posttranslational covalent modification of proteins (ed. B.C. Johnson), p. 19—38, Acad. Press, N-Y, 1983.
2. Means A.R., Dedman J.R. *Mol. and Cell. Endocrin.*, v.19, p.215—227, 1980.
3. Schulman H., Greengard P. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA, Biol. Sci.*, v.75, p.5432—5436, 1978.
4. Dabrowski R., Sherry J.M.F., Aromatorio D.K., Hartshorne D.J. *Biochemistry*, v.17; p.253—258; 1978.
5. Cohen P., Burchell A., Foulkes J.G., Cohen P.T.W., Vanaman T.C., Nairn A.C. *FEBS Lett.*, v.92, p.287—293, 1978.
6. Anderson J.M., Cormier M.J. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v.84, p.595—602, 1978.
7. Huttner W.B., Schiebler W., Greengard P., De Camilli P., *J. Cell. Biol.*, v.96, p.1374—1381, 1983.
8. Nairn A.C., Bhagat B., Palfrey H.C. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA, Biol. Sci.*, v.82, p.7939—7943, 1985.
9. Fukunaga K., Yamamoto H., Matsui K., Higashi K., Miyamoto E. *J. Neurochem.*, v.39, p.1607—1617, 1982.
10. Yamauchi I., Fujisawa H. *Eur. J. Biochem.*, v.132, p.15—21, 1983.
11. Le Vine III H., Sahyoun N.E. *Brain Res.*, v.439, p.47—55, 1988.
12. Капицадзе И.В., Микеладзе Д.Г., Фрайкина Т.Я. *Известия АН ГССР*, т.10, N 1, с.44—48, 1984.
13. Chaveau J., Moule Y., Rouller *Exp. Cell Res.*, v.11, p.317—321, 1956.
14. Jilson J., Creswell K., Chin D. *J. Biochem.*, v.14, p.5586—5592, 1975.
15. Chau F.S., Chou J., Shapita R., Kibbles R.F. *J. Biol. Chem.*, v.251, p.2671—2679, 1976.
16. Matsuda G., Suzuyama Y., Maita T., Umegane T. *FEBS Lett.*, v.19, p.215—227, 1977.
17. Lin Y.M., Liu Y.P., Cheung W.Y. *J. Biol. Chem.*, v.249, p.4943—4952, 1974.
18. Charbonneau H., Cormier M.J. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v.90, p.1039—1047, 1979.
19. Niggli V., Pennison J.T., Carafoli E.J. *J. Biol. Chem.*, v.254, p.9955—9958, 1979.
20. Bradford M.M. *Anal. Biochem.*, v.72, p.248—254, 1976.
21. Miyamoto E., Fukunaga K., Matsui K., Iwasa Y. *J. Neurochem.*, v.37, N 5, p.1324—1330, 1981.
22. Klee C.W., Newton D.L. — In: Posttranslational covalent modifications of proteins (ed. B.C. Johnson), p.61—83, Acad. Press, N—Y, 1983.
23. Bennet M.K., Erondi N.F., Kennedy M.B. *J. Biol. Chem.*, v.258, p.12735—12741, 1983.
24. Lou L.L., Lloyd S.J., Schulman H. *Proc. Nat. Acad. Sci., USA, Biol. Sci.*, v.83, p.9497—9501, 1986.
25. Kuret J., Schulman H. *Biochemistry*, v.23, p.5495—5504, 1984.
26. Sahyoun N., Le Vine III H., Cuatrecasas P. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA, Biol. Sci.*, v.81, p.4311—4315, 1984.

Поступила 20.01.1989