



УДК 577.113.3:[577.112.7:577.352.3]

ВЛИЯНИЕ сАМР-ЗАВИСИМОГО ФОСФОРИЛИРОВАНИЯ
НА СВЯЗЬ КАЛЬМОДУЛИНА С МЕМБРАНАМИ
МОЗГА НОРМАЛЬНЫХ И ОБЛУЧЕННЫХ КРЫС

ТОМАЧИНСКАЯ А. И., ВАСИЛЬЕВ А. Н., КУЧЕРЕНКО Н. Е.

Кафедра биохимии Киевского государственного университета

Внутриклеточное распределение кальмодулина имеет существенное значение в регуляции Ca^{2+} -зависимых процессов в клетке [1]. Одним из механизмов, контролирующим транслокацию кальмодулина в клетке, является сАМР-зависимое фосфорилирование мембран [2].

В ранее проведенных нами исследованиях установлено, что рентгеновское облучение влияет на содержание кальмодулина в мембранах серого вещества головного мозга крыс [3, 4]. В связи с этим представляло интерес изучить влияние сАМР-зависимого фосфорилирования на связь кальмодулина с мембранами после тотального рентгеновского облучения животных.

Опыты проводили на белых беспородных крысах массой 150—200 г. Животных облучали на установке РУМ-13 рентгеновскими лучами в дозе 0,21 Кл/кг при условиях, описанных ранее [5]. Через 1 ч после облучения животных декапитировали. Исследования проводили на головном мозгу крыс. Кальмодулин выделяли по методу Schreiber и соавт. [6], фосфодиэстеразу сАМР получали по методу Лазаревич, Ткачук [7]. Для оценки чистоты препаратов кальмодулина был использован метод градиентного электрофореза (4% и 30%) в ПААГ в присутствии 2% ДДС-На [8]. Препараты электрофоретически гомогенного кальмодулина метилил N-сукцинимидилом [$2,3\text{-}^3\text{H}$] пропионатом ($3,7 \cdot 10^6$ Бк, «Amersham», Англия) в среде, описанной Bolton, Hunter [9], с последующим нанесением на колонку с акрилексом Р-6. Удельная радиоактивность меченых препаратов кальмодулина составляла 50000 имп/пмоль. Мембраны клеток серого вещества головного мозга крыс выделяли по методу Chasin и соавт. [10]. Опыты по связыванию с мембранами проводили в инкубационной среде объемом 0,1 мл при 37°, содержащей 40 нМ [^3H] кальмодулина ($3,3 \cdot 10^3$ Бк), 20 мМ трис-НСl, рН 7,4, 5 мМ MgCl_2 , 0,2%-ный альбумин сыворотки человека. Препараты сАМР-зависимых протеинкиназ из серого вещества головного мозга крыс вы-

деляли по модифицированному методу Greengard и соавт. [11, 12], активность определяли по методу Uno и соавт. [12].

Было изучено влияние сАМР-зависимого фосфорилирования на освобождение кальмодулина из фосфорилированных мембран клеток серого вещества головного мозга крыс в условиях острого лучевого воздействия.

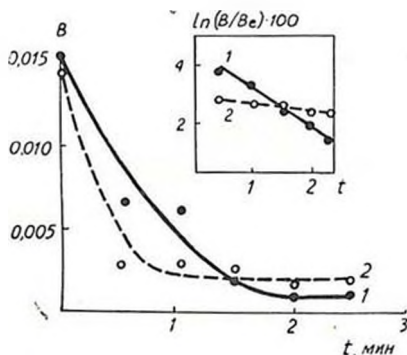


Рис. Диссоциация комплекса кальмодулин—мембраны при сАМР-зависимом фосфорилировании: 1—контроль, 2—1 ч после облучения; В—пмоль кальмодулина/мг белка

В наших условиях метод, описанный Gnegy и соавт. [2], из-за недостаточной чувствительности не позволил определить кинетические параметры, характеризующие процесс высвобождения кальмодулина из мембраносвязанного состояния и перемещения его в цитозоль. Мы применили более чувствительный метод, с помощью которого в условиях *in vitro* можно было анализировать диссоциацию комплекса [^3H] кальмодулин—мембраны.

Комплексы [^3H] кальмодулин—мембраны подвергали фосфорилированию сАМР-зависимыми протеникиназами в условиях, которые были оптимальными для фосфорилирования мембран мозга гомологичной сАМР-зависимой протеникиназой [12]. Фосфорилирование комплексов [^3H] кальмодулин—мембраны проводили при 30° в инкубационной среде объемом 0,1 мл, содержащей 10^{-6} М сАМР, $50 \cdot 10^{-6}$ М АТР, 6 мг/мл белка мембран, 0,2 мг/мл белка сАМР-зависимой протеникиназы. Радиоактивность проб определяли на β -спектрометре «Delta-300» (США). Содержание белка в исследуемых препаратах определяли по методу Lowry и соавт. [13].

Отсутствие кальмодулина в препаратах сАМР-зависимой протеникиназы было доказано в опытах, в которых использовали фермент, подвергнутый термической обработке при 100° в течение 5 мин для последующей активации кальмодулинзависимой формы ФДЭ сАМР. Препараты термически инактивированной сАМР-зависимой протеникиназы не

обладали способностью активировать ФДЭ. В экспериментах по активации ФДЭ нижний предел чувствительности определения кальмодулина составлял 12 нМ. Кроме того, контролем служили в одном случае пробы без протеникиназы, в другом—без АТР.

В результате проведенных исследований установлено, что сАМР-зависимое фосфорилирование вызывает диссоциацию комплекса $[^3\text{H}]$ кальмодулин—мембраны, характеризующуюся высокой скоростью процесса как в контроле, так и через 1 ч после тотального облучения рентгеновскими лучами в дозе 0,21 Кл/кг. В обоих случаях диссоциация комплекса $[^3\text{H}]$ кальмодулин—мембраны после его фосфорилирования сАМР-зависимой протеникиназой завершается в пределах 1,5—2,0 мин (рисунк). Следует также отметить, что глубина диссоциации комплекса как в контроле, так и через 1 ч после облучения не является тождественной. Используя линейный график зависимости диссоциации комплекса от времени инкубации (рис. 1, а), были определены константы скорости диссоциации исследуемых комплексов (K_{-1}). В контроле K_{-1} составила 0,1 мин⁻¹, а через 1 ч после облучения—0,44 мин⁻¹ (таблица). Таким образом, скорость диссоциации комплекса $[^3\text{H}]$ кальмодулин—мембраны, компоненты которого выделены через 1 ч после облучения животных, в 4,4 раза превышала таковую в контроле. Вместе с тем, количество кальмодулина, высвободившегося из комплекса в результате фосфорилирования (V_{max}), незначительно отличалось по сравнению с контролем. Так, значения V_{max} в контроле и после облучения составили 0,020 и 0,013 пмоль кальмодулина/мг белка мембран соответственно (таблица).

Таблица

Некоторые кинетические характеристики диссоциации комплекса мембраны—кальмодулин, стимулированной сАМР-зависимым фосфорилированием

Состояние	K_{-1} , мин ⁻¹	r	V_{max} пмоль/мг белка	r
Контроль	0,10	0,99	0,020	0,85
Облучение	0,44	0,96	0,013	0,75

r —коэффициент регрессии

Полученные данные свидетельствуют, что в условиях рентгеновского облучения сАМР-зависимое фосфорилирование бномембран влияет на компартментализацию кальмодулина в клетках мозга крыс. Чувствительность процесса диссоциации комплекса к действию сАМР-зависимой протеникиназы усиливается через 1 ч после тотального облучения животных.

EFFECT OF cAMP-DEPENDENT PHOSPHORYLATION ON BINDING OF CALMODULIN WITH BRAIN MEMBRANES IN CONTROL AND X-RAYED RATS

TOMACHINSKAYA L. I., VASILJEV A. N., KUCHERENKO N. E.

State University, Kiev

It was found that cAMP-dependent phosphorylation of [3 H] calmodulin complex with rat brain membranes stimulates release of protein activator from membranes. This process is enhanced 1 h after total X-ray irradiation (0,21Ci/kg); K_{-1} of the complex is 4,4-fold higher in X-rayed animals than in control ones.

ЛИТЕРАТУРА

1. Kaktuchi S., Yamazaki R., Teshima T., Uneshi K., Yasuda S., Kashiha A., Sobue K., Oshima M., Nakayama T. Adv. Cyclic. Nucl. Res., v. 9, p. 253—264, 1978.
2. Gnegy M. F., Nathanson I. A., Uzunov P. Biochim. et biophys. acta, v. 497, № 1, p. 75—85, 1977.
3. Васильев А. Н., Пархомец Т. И., Мельник Г. Г., Томачинская Л. И. Радиобиология, т. 23, вып. 2, с. 224—226, 1983.
4. Васильев А. Н., Мельник Г. Г., Пархомец Т. И., Томачинская Л. И., Кучеренко Н. Е. Докл. АН УССР, сер. «Б», № 11, с. 62—66, 1981.
5. Васильев А. Н., Гаврилей В. И., Гринчук Д. В. и др. Радиобиология, вып. 6, т. 22, с. 816, 1982.
6. Schreiber W. F., Sasagawa T., Titani K. Biochemistry, v. 20, № 13, p. 5239—5245, 1981.
7. Лазаревич В. Г., Ткачук В. А. Докл. АН СССР, т. 246, с. 492—495, 1979.
8. Сопин Г. Е., Данилова В. М. Укр. биохим. журн., вып. 54, № 5, с. 507—514, 1982.
9. Bolton A. F., Hunter W. M. Biochemistry J., v. 133, № 3, p. 529—539, 1973.
10. Chasin M., Mamrak F., Samanito S. G. J. Neurochem., v. 22, № 5, p. 1031—1038, 1974.
11. Ueda T., Greengard P. J. Biol. Chem., v. 252, № 14, p. 5155—5163, 1977.
12. Uno I., Ueda T., Greengard P. J. Biol. Chem., v. 252, № 14, p. 5164—5174, 1977.
13. Lowry O. H., Rosenbrough N. J., Farr A. L., Randal R. J. J. Biol. Chem., v. 193, № 2, p. 265—275, 1951.

Поступила 19. III 1987