



УДК 577.112:612.822.1

ВЛИЯНИЕ БЕЛКА S-100 НА ФОСФОРИЛИРОВАНИЕ ЯДЕРНЫХ БЕЛКОВ МОЗГА КРЫСЫ; УЧАСТИЕ ИОНОВ КАЛЬЦИЯ

КАПРАЛОВ А. А., БАЛКОВ Д. И., ТЮЛЕНЕВ В. И., БЕЛИК Я. В.
Институт биохимии им. А. В. Палладина АН УССР

В опытах *in vitro* показано, что Ca^{2+} в концентрациях 10^{-5} — 10^{-6} М уменьшает стимулирующее действие нейроспецифического белка S-100 на фосфорилирование ядерных белков мозга крыс. Прединкубация белка S-100 с Ca^{2+} (10^{-5} М) в течение 4 и 18 ч значительно увеличивает его стимулирующее действие на процесс фосфорилирования. Высказывается предположение, что действие белка S-100 на фосфорилирование обусловлено не изменением концентрации Ca^{2+} , а его взаимодействием с этим белком. Установлено, что для стимулирующего действия белка S-100 на процесс фосфорилирования необходима определенная концентрация Ca^{2+} .

Ранее нами было показано, что нейроспецифический белок S-100 увеличивает фосфорилирование определенной группы ядерных белков мозга, но не печени [1]. Известно, что добавление Ca^{2+} изменяет конформацию этого белка [2, 3]. При этом происходит образование дисульфидных мостиков между двумя из трех молекул цистеина, входящих в состав белка S-100 [4]; наблюдается перераспределение гидрофильных и гидрофобных фракций белка [5]; появляются дополнительные фракции при хроматографии белка на ДЭАЭ-целлюлозе [2, 6—8]. Учитывая способность белка S-100 связывать Ca^{2+} и участие этих ионов в регуляции внутриклеточных процессов [8], мы исследовали его действие на фосфорилирование ядерных белков в присутствии Ca^{2+} и некоторые механизмы этого процесса.

Материалы и методы

В опытах были использованы самцы белых крыс массой 150—200 г. Животных декапитировали, ядерную фракцию мозга выделяли по методу Buidman [9], ядра печени — по методу Тюленева и соавт. [10], белок S-100 получали из мозга быка по методу Stewart [7]; в опытах использовали белковую фракцию IC, которую идентифицировали методами иммунопреципитации и электрофореза. Полученные препараты белка S-100 выходили одним пиком при хроматографии на сефадексе G-100, мигрировали одной полосой при электрофорезе в 7,5 и 10%-ных ПААГ и давали единственную полосу преципитации в реакции иммунодиффузии. В гелях с большим содержанием акриламида белковый препарат распадался на несколько полос; в зависимости от

условий электрофореза количество полос изменялось, однако все они реагировали с антисывороткой к белку S-100. Используемая в этих опытах антисыворотка была идентична антисывороткам, полученным ранее [6]. Наши результаты по гетерогенности белка S-100 соответствуют литературным данным [7, 11]. Фосфорилирование ядерных белков исследовали в инкубационной смеси следующего состава: 50 мМ трис-HCl (pH 7.5), 25 мМ $MgCl_2$, 10 мкМ $[\gamma\text{-}^{32}P]\text{ATP}$ (удельная радиоактивность 1000 К_n (ммоль), 1 мг ядерных белков, 40 мкг белка S-100 [12]. Контролем служили пробы, содержащие, помимо указанных компонентов, ТХУ в конечной концентрации 5%. В зависимости от условий опыта в инкубационную среду добавляли 10^{-7} — 10^{-4} М Ca^{2+} или 10^{-7} — 10^{-4} М ЭГТА. Инкубацию проводили так, как описано ранее [1]. Для определения радиоактивности использовали нитроцеллюлозные фильтры «Синпор» № 8 (Чехословакия), которые помещали в сцинтилляционную жидкость ЖС-1 и измеряли радиоактивность исследуемых образцов, используя жидкостный сцинтилляционный счетчик SL-30 «Intertechnique» (Франция). Белок определяли по методу Whittaker [13]. О фосфорилировании судили по включению ^{32}P в имп/мин/мг белка. В некоторых случаях перед измерением радиоактивности из исследуемых образцов экстрагировали нуклеиновые кислоты и липиды. Нуклеиновые кислоты удаляли обработкой осадка 5%-ной ТХУ при 90° в течение 30 мин. Липиды экстрагировали, используя хлороформ-метанол [14]. После удаления нуклеиновых кислот и липидов абсолютные значения получаемых результатов уменьшались, однако соотношения между ними оставались прежними.

Результаты и обсуждение

Прежде всего было изучено влияние Ca^{2+} на белок S-100-зависимое фосфорилирование ядерных белков мозга. Для этого в инкубационную среду добавляли Ca^{2+} вместе с белком S-100. Обнаружено,

Таблица

Влияние Ca^{2+} и ЭГТА на стимулированное белком S-100 фосфорилирование белков ядерной фракции мозга

Условия опыта	Включенное ^{32}P (имп/мин/мг белка)	% к конт- ролю	p
Контроль (без белка S-100)	42038 ± 647 (n=13)	100	—
+белок S-100	56521 ± 689 (n=13)	136	<0,01
+белок S-100 + 10^{-5} М Ca^{2+}	50967 ± 829 (n=11)	121	<0,01
+белок S-100 + 10^{-6} М Ca^{2+}	41995 ± 1296 (n=5)	100	>0,5
+белок S-100, прединкубированный с ядерной фракцией + 10^{-5} М Ca^{2+}	45504 ± 3967 (n=10)	108	>0,5
+белок S-100 + 10^{-5} М ЭГТА	50616 ± 799 (n=5)	120	<0,05
+белок S-100, прединкубированный с Ca^{2+} в течение 18 ч	101118 ± 4434 (n=9)	204	<0,01
+белок S-100, прединкубированный с Ca^{2+} в течение 4 ч	76449 ± 6050 (n=6)	182	<0,01

что Ca^{2+} в концентрациях 10^{-6} и 10^{-5} М снижает стимулирующее действие этого белка на фосфорилирование белков ядерной фракции (таблица). Причем в присутствии 10^{-6} М Ca^{2+} фосфорилирование

снижается до уровня контроля. Это может быть обусловлено тем, что белок S-100, связывая ионы Ca^{2+} , находящиеся в среде, уменьшает их концентрацию, что вызывает увеличение фосфорилирования ядерных белков. Следовательно, добавление этих ионов должно снижать действие белка S-100, что мы и наблюдаем. То есть, уровень фосфорилирования определяется концентрацией Ca^{2+} , а белок S-100 играет лишь роль фактора, изменяющего ее. Кроме этого, Ca^{2+} , изменяя конформацию белка S-100 или структур, с которыми он взаимодействует, может создавать определенные затруднения для его действия на фосфорилирование, и, таким образом, сам белок S-100 влияет на этот процесс.

Учитывая, что Ca^{2+} , входящий в состав инкубационной среды, может изменять конформацию белка S-100 еще до его контакта с ядрами, мы несколько изменили условия эксперимента и стали добавлять белок в инкубационную среду вместе с ядерной фракцией, проинкубировав их перед этим совместно при 4° в течение 30 мин. В этом случае наблюдается еще большее ингибирование белок S-100-зависимого фосфорилирования ядерных белков. Этот эффект трудно объяснить, исходя из предположения о действии белка S-100 на фосфорилирование через изменение концентрации Ca^{2+} , так как в этом случае концентрация Ca^{2+} не изменяется.

Для более детального выяснения того, как Ca^{2+} сам по себе влияет на фосфорилирование ядерных белков, мы изучили его действие на этот процесс в изолированной ядерной фракции мозга. Одновременно для сравнения было изучено влияние Ca^{2+} на фосфорилирование белков в ядрах печени. Было обнаружено, что Ca^{2+} в концентрациях 10^{-6} — 10^{-3} М практически не влияет на включение ^{32}P в белки ядер мозга (рис. 1). Ядра печени при этих концентрациях Ca^{2+} недостоверно изменяют уровень фосфорилирования. Предположив, что отсутствие эффекта в этом случае может быть обусловлено ионами Ca^{2+} , находящимися в среде в отсутствие экзогенного Ca^{2+} , мы добавляли в инкубационную среду, содержащую 10^{-6} М Ca^{2+} , ЭГТА, который их связывает. Обнаружено, что в ядрах клеток мозга ЭГТА уменьшает фосфорилирование ядерных белков (рис. 2). Причем при меньших концентрациях ЭГТА в пробе этот эффект выражен сильнее. Следует отметить, что в ядерной фракции как мозга, так и печени наблюдается эффект ЭГТА на фосфорилирование. При низких концентрациях ЭГТА наблюдается ингибирование фосфорилирования, исчезающее при высоких концентрациях этого реагента. Полученные результаты позволяют высказать предположение о существовании двух зависимых от Ca^{2+} процессов, противоположно влияющих на фосфорилирование белков в ядрах. Интересно отметить, что подобные процессы могут протекать в ядерной фракции мозга и печени, что указывает на их неспецифический характер. Эти выводы подтверждаются одинаковым характером кривых в опытах, в которых исследовалось влияние различных концентраций Ca^{2+} на фосфорилирование на фоне 10^{-5} М ЭГТА

(рис. 1, 2). Можно полагать, что при физиологических концентрациях Ca^{2+} в реакциях фосфорилирования участвуют и другие факторы, которых недостаточно при добавлении экзогенного кальция. Это подтверждается литературными данными, свидетельствующими о том, что, например, в цитозоле мозга для Ca^{2+} -зависимого фосфорилирования необходим Ca^{2+} -зависимый регуляторный белок (кальмодулин) [15]. Подобные данные получены для ядер клеток печени [16] и мозга [17]. Обнаружено, что молекула белка S-100 имеет два места связывания Ca^{2+} с сильным сродством к нему и пять—со слабым [18]. Исходя из того, что величина M_r белка S-100 равна 20 кД, его концентрация в наших опытах составляет $0,6 \cdot 10^{-6}$ М. Оценить, сколько Ca^{2+} свя-

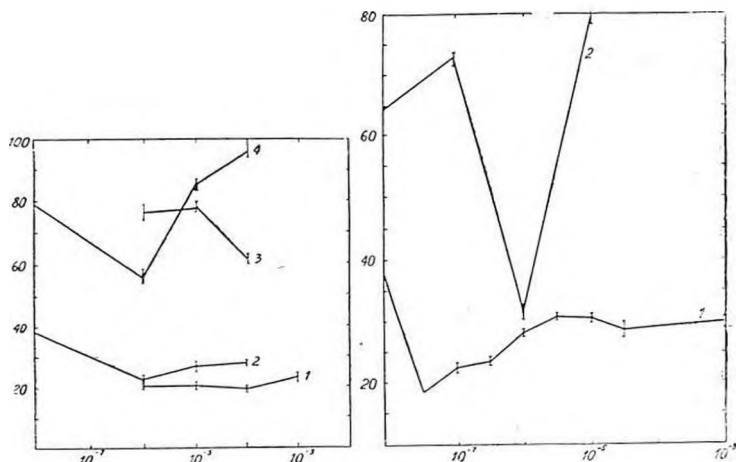


Рис. 1. Зависимость фосфорилирования белков ядерных фракций мозга и печени крыс от концентрации Ca^{2+} . 1. ядра мозга; 2. ядра мозга + 10^{-5} М ЭГТА; 3. ядра печени; 4. ядра печени + 10^{-5} М ЭГТА. По оси абсцисс—концентрация Ca^{2+} (М); по оси ординат—включение ^{32}P ($\text{нмп/мин/мг белка} \times 10^{-3}$ М)

Рис. 2. Зависимость фосфорилирования белков ядерных фракций мозга (1) и печени (2) крыс от концентрации ЭГТА. По оси абсцисс—концентрация ЭГТА (М); по оси ординат—включение ^{32}P ($\text{нмп/мин/мг белка} \times 10^{-3}$ М)

зывается в наших условиях, исходя из этих данных, трудно, так как равновесие наступает через 20—24 ч. Однако можно сделать заключение, что если бы белок S-100 действовал на фосфорилирование только за счет изменения концентрации Ca^{2+} , как это отмечается в случае ЭГТА, то при его добавлении к ядрам мозга происходило бы ингибирование этого процесса (рис. 2), хотя мы наблюдаем активирование (таблица). Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что наше предположение о действии белка S-100 на фосфорилирование ядерных белков путем изменения концентрации ионов Ca^{2+} не находит достаточного экспериментального подтверждения.

Таким образом, из полученных данных можно заключить, что белок S-100 стимулирует фосфорилирование ядерных белков только при определенной концентрации Ca^{2+} . При её изменении в большую или меньшую сторону действие белка S-100 на фосфорилирование ядерных белков уменьшается. Этот вывод можно сделать, исходя из того, что при добавлении в среду одновременно 10^{-5} М ЭГТА, связывающего Ca^{2+} , и белка S-100, фосфорилирование увеличивается в меньшей степени по сравнению с контролем, чем при добавлении одного белка (таблица). Маловероятно, что в этом случае белок S-100 и ЭГТА действует на разные, несвязанные между собой системы фосфорилирования, хотя полностью исключить эту возможность нельзя.

Учитывая, что используемый в наших опытах белок получается в отсутствие Ca^{2+} , а изменения его конформации происходят в течение достаточно длительного времени (до 24 ч) [19], мы прединкубировали белок S-100 в среде инкубации, содержащей Ca^{2+} в концентрации 10^{-5} М, в течение нескольких часов, после чего изучали его действие на фосфорилирование. Было обнаружено, что после прединкубации с Ca^{2+} в течение 4 ч белок S-100 увеличивает фосфорилирование ядерных белков на 46% по сравнению с непрединкубированным белком, а после прединкубации в течение 18 ч — на 68%. По сравнению с фосфорилированием в отсутствие белка S-100 это увеличение составляет соответственно 82 и 104% (таблица). Возможно, что именно этот эффект имеет место в нативном ядре, где белок S-100 постоянно находится в контакте с Ca^{2+} . При электрофорезе изменения конформации белка S-100 наблюдаются при концентрациях Ca^{2+} 10^{-6} — 10^{-8} М (при больших концентрациях Ca^{2+} полосы становятся более диффузными) [2]. Приблизительно такие же условия обнаружены в клетке, где концентрация Ca^{2+} составляет в состоянии покоя 10^{-8} — 10^{-6} М, а при возбуждении увеличивается до 10^{-5} М [20]. Исходя из данных литературы и наших результатов, можно предположить, что изменения концентрации Ca^{2+} при возбуждении нервной клетки имеют важное значение для регуляции действия белка S-100 на фосфорилирование ядерных белков. Подобный механизм обнаружен в синапсомозгах, деполяризация которых может вызывать фосфорилирование определенных белков посредством увеличения концентрации Ca^{2+} [21]. Не исключено, что белок S-100 может принимать участие в реализации подобных процессов в ядрах. Однако связать действие белка S-100 с какими-то определенными протенинказами в настоящее время пока не представляется возможным.

Интересно отметить, что в цитоплазме белок S-100 влияет на фосфорилирование определенных белков. Но в этом случае он, вероятно, действует путем изменения концентрации Ca^{2+} [22]. Действие белка S-100 можно сравнить с действием кальмодулина, который, в отличие от белка S-100, обнаружен в составе многих тканей и также участвует в процессах фосфорилирования белков. Не исключено, что физиологическое значение этих белков подобно. Показано присутствие

в мозгу кальмодулинзависимых протеникиназ [23], причем две из них фосфорилируют один и тот же специфический белок нервных окончаний в различных участках его молекулы [24]. В ядре также обнаружена Ca^{2+} -кальмодулинзависимая протеникиназа [16]. По аналогии можно предполагать, что в клетке имеются и белок S-100-зависимые протеникиназы.

По-видимому, механизмы действия кальмодулина на фосфорилирование белков несколько отличаются от механизма действия белка S-100. Так, кальмодулин способен активировать протеникиназу только в присутствии Ca^{2+} . В отсутствие этих ионов он не влияет на активность протеникиназ.

Таким образом, можно сделать вывод, что действие белка S-100 на фосфорилирование ядерных белков зависит от Ca^{2+} , что может иметь важное значение в регуляции этих процессов в физиологических условиях.

PARTICIPATION OF Ca^{2+} IN S-100 PROTEIN-DEPENDENT PHOSPHORYLATION OF PROTEINS OF RAT BRAIN NUCLEI

KAPRALOV A. A., BALKOV D. I., TYULENEV V. I., BELIK Ja. V.

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

It was shown that addition of Ca^{2+} (10^{-6} — 10^{-5} M) to the incubation mixture decreased stimulating action of neurospecific S-100 protein on phosphorylation of rat brain nuclear proteins. Preincubation of S-100 protein with Ca^{2+} for 4—18 hours increased significantly its stimulating action on the phosphorylation. It was suggested that S-100 protein's action depends on its interaction with Ca^{2+} . It was stated that certain concentration of Ca^{2+} maintained in nucleus was required for the stimulating action of S-100 protein.

ЛИТЕРАТУРА

1. Тюленев В. И., Капралов А. А., Смерчинская Л. С., Белик Я. В. Биохимия, т. 48, № 5, с. 827—831, 1983.
2. Calissano P., Moore B. W., Friesen A. Biochemistry, v. 8, № 11, p. 4818—4826, 1969.
3. Moore B. W.—In: Handbook of Neurochemistry, v. 6, p. 93—99, N. Y., Plenum Press, 1969.
4. Палладин А. В., Смерчинская Л. С. Укр. біохім. журн., т. 41, № 3, с. 398—406, 1971.
5. Старостина М. В., Свиридов С. М. Молекуляр. биология, т. 12, № 2, с. 372—376, 1978.
6. Смерчинська Л. С., Белик Я. В., Сироватська Л. П., Бірилло Т. М. Укр. біохім. журн., т. 48, № 5, с. 609—613, 1976.
7. Stewart J. A. Biochim. et biophys. acta, v. 263, № 1, p. 178—192, 1972.
8. Rasmussen H. Science, v. 170, № 3956, p. 404—412, 1970.
9. Burdman J. A. J. Neurochem., v. 19, p. 1459—1469, 1972.

10. Тюленев В. Н., Масюк А. И., Бердышев Г. Д. Биохимия, т. 44, № 8, с. 1441—1446, 1979.
11. Uyemura K., Vincendon G., Gombos G., Mandel P. J. Neurochem., v. 18, № 3, p. 429—438, 1971.
12. Perumal L. S., Rapport M. M. Life Sci., v. 22, № 9, p. 803—808, 1978.
13. Whittaker J. P., Granum P. E. Annual. Biochem., v. 109, № 1, p. 156—159, 1980.
14. Виркем Дж., Броукхьюз Р.—В кн.: Биохимическое исследование мембран, с. 227—254, М., Мир, 1979.
15. Yamauchi T., Fujisawa H. Biochem. and Biophys. Res. Commun., v. 90, № 4, p. 1172—1178, 1979.
16. Sikorska M., Mac Manus J. P., Walker P. R., Whitfield J. F. Biochem. and Biophys. Res. Commun., v. 93, № 4, p. 1196—1203, 1980.
17. Калакдадзе Н. В., Фрайкина Т. Я., Микеладзе Д. Т.—В сб.: Девятая Всесоюзная конференция по биохимии нервной системы, с. 58—59, Ереван, 1983.
18. Callssano P., Atema S., Fasella P. Biochemistry, v. 22, № 13, p. 4553—4560, 1974.
19. Rusca G., Callssano P. Biochim. et biophys. acta, v. 221, № 1, p. 74—85, 1970.
20. Cheung W. Y. Science, v. 207, № 4426, p. 19—27, 1980.
21. Krueger B. K., Forh J., Greengard P. J. Biol. Chem., v. 252, № 8, p. 2764—2773, 1977.
22. Patel J., Marangos P. J. Biochem. and Biophys. Res. Commun., v. 109, p. 1089—1093, 1982.
23. Yamauchi T., Fujisawa J. FEBS Lett., v. 116, № 2, p. 141—144, 1980.
24. Kennedy M. B., Greengard P. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, v. 78, № 2, p. 1293—1297, 1981.

Поступила 5. VIII. 1984