



УДК 612.8.017.1

ИЗУЧЕНИЕ ЭНДОГЕННЫХ БЕЛКОВЫХ ЛИГАНДОВ
МОЗГОСПЕЦИФИЧЕСКИХ БЕЛКОВ ГРУППЫ S-100

ПОЛЕТАЕВ А. Б., ГРУДЕНЬ М. А.

Институт нормальной физиологии им. П. К. Анохина АМН СССР, Москва

Обнаружены и частично идентифицированы около 20 белков нервной ткани, способных специфически взаимодействовать с иммобилизованными препаратами фракции мозгоспецифических белков группы S-100. Взаимодействие имеет выраженный Ca^{2+} -зависимый характер. Среди белковых лигандов S-100 идентифицированы тубулин, Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРаза, щелочная фосфатаза, бутирилхолинэстераза, МАО, карбоксильная протениназа, кислая глюкоксидаза, β -галактозидаза. Среди лигандов S-100 найден ряд неидентифицированных гликопротенинов и ДНК-связывающих белков. Обнаружение и функциональная идентификация указанных лигандов позволяют по-новому оценить роль белков группы S-100 в регуляции метаболических процессов, характерных для нервной ткани.

В настоящее время большое внимание уделяют выделению и изучению мозгоспецифических белков (МСБ), непосредственно участвующих в молекулярном обеспечении основных нейрофизиологических механизмов [1—3]. Особое внимание исследователей привлекают МСБ группы S-100, имеющие отношение к механизмам обучения и памяти [4], общего эмоционального состояния [5], регуляции страха [6] и агрессивного поведения [7], связанные с патогенезом ряда нервно-психических заболеваний [8, 9]. В то же время конкретные молекулярные механизмы участия белков группы S-100 в регуляции функций мозга остаются неизученными.

Ранее предполагали, что одним из наиболее конструктивных подходов к пониманию их роли в механизмах специфических функций нервных клеток и мозга в целом является изучение тех конкретных молекулярных процессов и идентификация тех определенных видов молекул, во взаимодействии с которыми реализуется функциональная активность белков группы S-100 [10, 11]. В литературе имеются сообщения о модулирующем влиянии белка S-100 на активность РНК-полимеразы I [12] и фосфорилирование ряда белковых субстратов мозга [13]. Было установлено, что в физиологических условиях белки группы S-100 подвергаются Ca^{2+} -зависимому взаимодействию с достаточно широким кругом белков нервной ткани (среди них уда-

лось идентифицировать тубулины [10]), специфически сорбируют ряд неидентифицированных эндогенных олигопептидов, обладающих выраженной «поведенческой» активностью [6]. Эти данные углубили понимание функциональной значимости белков группы S-100 и подтвердили перспективность подобного функционального подхода к изучению их роли в обеспечении специфических функций первых клеток.

Целью настоящего исследования являлась идентификация других (помимо тубулина) белковых лигандов белка S-100, присутствующих в экстрактах мозга.

Материалы и методы

Получение белков группы S-100 и их иммобилизация описаны ранее [14]. Для выделения белковых S-100-лигандов использовали 10 кг свежесзамороженного мозга быков (гомогенизация в 0,01 М трис-HCl буфере pH 7,5; центрифугирование 60 мин при 18000g). Экстракты наносили на 100-мл колонку ДЕАЕ-сефарозы («Pharmacia», Швеция), уравновешенную тем же буфером. Белки, не сорбировавшиеся на ионообменнике, закисляли до pH 5,0 и наносили на 100-мл колонку КМ-сефарозы с тем же значением pH. После отмывки колонок от несвязавшегося материала кислые и щелочные белки элюировали с них 2 М NaCl, концентрировали ультрафильтрацией на фильтрах UM-10 («Amicon», США), диализовали против 0,1 М трис-HCl буфера pH 7,5 с 5 мМ CaCl₂ и использовали для выделения фракций кислых и щелочных гликопротеинов (специфически сорбирующихся на колонках конканавалинА-сефарозы и элюирующихся 0,3 М α -метилгликозидом).

Полученные фракции кислых и щелочных белков и соответствующих гликопротеинов мозга пропускали через 50-мл преколонки с сефарозой 6 В, а затем через колонки S-100-сефарозы (10 мл геля, содержащего по 5 мг белка/мл). После отмывки колонок 0,5 М NaCl на 0,1 М трис-HCl буфере pH 7,5, специфически сорбированные белковые лиганды S-100 элюировали тем же буфером с 10 мМ ЭДТА-Na₃. Для предотвращения агрегации и протеолиза получаемых белков все использовавшиеся растворы содержали 0,01%-ный тритон X-100 и 0,5 мМ фенолметилсульфонилфторид. Все процедуры проводили при 2—4°.

Состав полученных лигандов S-100 анализировали электрофоретически в нативных условиях или в 0,1%-ном ДДС-Na и 8 М мочевины [15]. Гели после электрофореза окрашивали Кумасси G-250, алциновым синим или реактивом Шиффа [15, 16]. Величину M_r белков рассчитывали, используя калибровочную кривую, построенную по белковым стандартам («Pharmacia», Швеция).

Оценку содержания тубулина среди гликопротеинов, связывающихся с белком S-100, проводили путем вычисления разности в содержании суммарного белка фракции кислых гликопротеинов до и после пропускания 1 мг лигандов через 0,5-мл колонку иммобилизованных антитубулиновых антител (иммобилизация на CNBr-сефарозе), уравновешенную 0,01 М трис-HCl, pH 7,0. Тубулин получали по методу Подетаева и Мещеряковой [10]. Иммунизацию кроликов и выделение антитубулиновых антител из фракции γ -глобулинов проводили, как описано ранее [14].

Сродство к ДНК белковых лигандов S-100 определяли, используя ДНК-сефарозный сорбент [17] при элюции специфически связывающихся белков 2,0 М NaCl.

Качественное выявление АТРазной активности проводили после электрофоретического разделения лигандов S-100 в нативных условиях на нефиксированных гелях [18]. Идентификацию типа АТРазы, связывающейся с белком S-100, осуществляли, используя методы для выявления соответственно Na⁺, K⁺-АТРазы и H⁺-АТРазы [19, 20].

Протеолитическую активность определяли по методу Anson [21].

Активность щелочной и кислой фосфатаз оценивали по расщеплению п-нитро-фенилфосфата соответственно при pH 10,0 и 5,0 [22]. Определение ацетил- и бутирихолинэстеразной активности проводили по методу Kohnovsky и Roots [23], кислой α -глюкооксидазы—по методу Johnsson и соавт. [24]. Выявление активности β -галактозидазы проводили с использованием в качестве субстрата 4-метилумбеллиферил-L-D-галактопиранозид [25]. Активность MAO определяли по Glenner и соавт. [26], тирозингидроксилазную активность—по Nagatsa и соавт. [27], каталазную и пероксидазную активности—с использованием о-данилизидина, 3,3-диамино-бензидина и 5-аминосалициловой кислоты [28].

Результаты и обсуждение

Ранее было установлено, что все эндогенные белковые лиганды МСБ S-100 для связывания с последними требуют наличия в среде Ca^{2+} . Сформированные молекулярные ассоциаты распадаются в присутствии ЭДТА или ЭГТА, тогда как вклад ионных или гидрофобных взаимодействий незначителен [10, 11]. Эти данные явились основополагающими при выборе условий сорбции-десорбции на колонках S-100-сефарозы и получили дополнительное подтверждение в проведенных экспериментах. Представление о том, насколько разные по



Рис. 1. Белковые лиганды мозгоспецифических белков группы S-100.

своим характеристикам белковые молекулы способны связываться с иммобилизованными препаратами белка S-100, дает рис. 1. Отметим, что ни с самим матриксом, ни с другими иммобилизованными на сефарозе белками (белки сыворотки кролика) белковые лиганды белка S-100 подобных комплексов не формировали.

Какой же физический смысл имеет термин « Ca^{2+} -зависимое взаимодействие» применительно к разнообразным лигандам белка S-100? Известно, что в зависимости от концентрации Ca^{2+} в среде молекулы белка S-100 способны весьма значительно менять свою пространственную структуру; что проявляется, в частности, в изменении их спектрально-оптических характеристик [29]. По некоторым

данным, молекулы белков S-100 содержат до 8 центров связывания Ca^{2+} [29]. Можно предположить, что Ca^{2+} -зависимое взаимодействие белка S-100 с различными белковыми лигандами сводится к его способности иметь большое число Ca^{2+} -обусловливаемых стабильных конформационных состояний (конформеров), причем в разных из них белки S-100 оказываются стерически комплементарны акцепторным участкам молекул разных лигандов. Ионы кальция, по-видимому, выступают в роли своеобразного аллостерического регулятора, обуславливающего способность молекул S-100 специфически взаимодействовать с теми или иными лигандами (рис. 2). Кроме того, следует учитывать и данные о молекулярной гетерогенности белков группы S-100 [11], что расширяет круг белковых молекул в нервной ткани, с которыми они могут взаимодействовать.

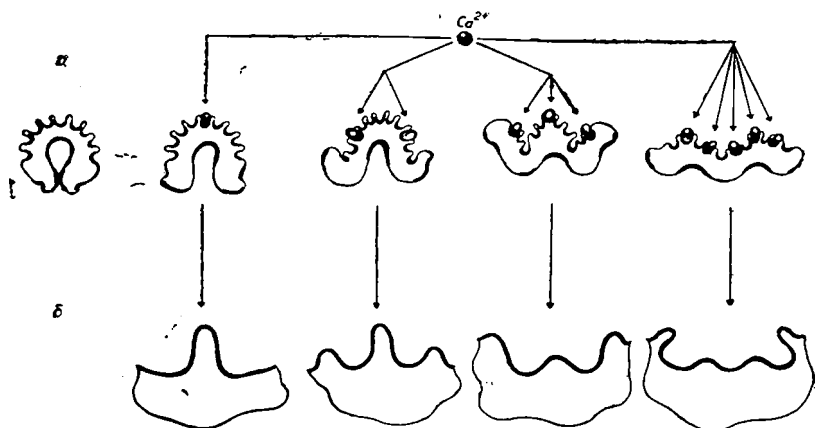


Рис. 2. Возможные механизмы, обуславливающие Ca^{2+} -зависимую комплементарность белка S-100 нервной ткани к его лигандам. а— Ca^{2+} -модифицируемые конформационные состояния белка S-100, б—акцепторные участки белковых лигандов мозгоспецифических белков группы S-100

С МСБ группы S-100 специфически связываются кислые белки с величиной M_r 300, 280, 260, 170, 100, 75, 50, 45, 30, 17 и 10 кД и щелочные, имеющие M_r 350, 300, 280, 220, 120, 70, 45 и 30 кД. Большая часть белковых лигандов белка S-100 представлена конканавалин-позитивными гликопротеинами мозга. Интересно отметить, что гликопротеины печени, выделенные по аналогичной схеме, практически не сорбируются на иммобилизованных препаратах белка S-100. Возможно, это свидетельствует об органичной (тканевой) специфичности гликопротеиновых лигандов белка S-100. Такое предположение согласуется с ранее полученными данными о присутствии в ткани мозга, но не печени, группы белков, способных к Ca^{2+} -зависимому взаимодействию с белком S-100 [11].

Данные электрофоретического анализа позволили выявить среди кислых гликопротеиновых лигандов белка S-100 3 главных и 4 минорных компонента с M_r 100, 75, 72 (тубулин) и 300, 170, 45, 30 кД соответственно. Среди щелочных гликопротеинов, связывающихся с белком S-100, было обнаружено 3 основных (120, 45 и 30 кД) и 2 минорных (280, 70 кД) компонента. Обработка выделенных гликопротеинов раствором 2-β-меркаптоэтанола не приводила к заметным изменениям их электрофоретического спектра, что свидетельствует о незначительном вкладе дисульфидных связей в образование четвертичной структуры изучаемых молекул.

Методом иммуносорбции с использованием иммобилизованных антитубулиновых антител было установлено, что около 20% суммарного белка кислых гликопротеиновых лигандов белка S-100 приходится на долю тубулина. В этой фракции были обнаружены также ферментативные активности, связанные с метаболизмом растворимых гликопротеинов, а именно β-галактозидазная и глюкооксидазная активности.

Идентификацию некоторых других компонентов фракции связывающихся с белком S-100 гликопротеинов проводили, исходя из следующих соображений: в предварительных экспериментах было установлено, что белки группы S-100 весьма существенно влияют на общий уровень окислительно-восстановительных процессов в клетках НС моллюсков (прижизненная спектрофотометрия—данные В. П. Никитина). С другой стороны, имеются сообщения о связи белка S-100 с механизмами трансмембранного переноса ряда ионов и аминокислот [4]. Это давало основание полагать, что среди молекул, взаимодействующих с белком S-100, могут присутствовать те или иные виды АТРаз. Оказалось, что среди медленно мигрирующих (электрофорез в нативных условиях; $R_f = 0,2$) компонентов кислых гликопротеинов была обнаружена фракция, обладающая АТРазной активностью. Детальный анализ позволил установить, что эта фракция может быть отнесена к группе Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРаз. Таким образом, предполагаемая связь белков S-100 с регуляцией энергетического метаболизма и энергезависимым транспортом ионов в нервных клетках получила конкретное обоснование на молекулярном уровне. Щелочные гликопротеиновые лиганды белка S-100 не обладали АТРазной активностью, но среди них обнаруживалась значительная активность «щелочной фосфатазы», что позволяет думать о наличии среди них ферментов, связанных с фосфорным обменом.

Основанием для попыток идентификации еще одной группы молекул, взаимодействующих с белком S-100, послужили косвенные данные о существовании функционально-метаболических взаимодействий между белками группы S-100 и рядом известных [30] и неидентифицированных «поведенчески активных» олигопептидов [6], а также гипотетические предположения о прямом или опосредованном участии белка S-100 в механизмах биосинтеза ряда нейропептидов [31]. Это

позволило нам предпринять попытки выявления ферментов, обладающих протеолитической активностью среди лигандов белка S-100. Во фракции кислых гликопротеинов было показано наличие протеолитической активности с оптимумами pH в кислой и нейтральной областях (pH 1,8 и 7,0) и нечувствительной к действию ингибитора трипсино- и химотрипсиноподобных протеаз—фенилметилсульфонилфторида. Другие фракции лигандов белка S-100, как и сам белок S-100, протеолитической активности не проявляли. О специфичности связывания обнаруженной протеолитической активности с иммобилизованными белками группы S-100 свидетельствует отсутствие ее взаимодействия с иммобилизованными белками сыворотки крови кролика. Естественно, что предположение о связи кислой и нейтральной протеназ, ассоциирующихся с белком S-100, с биосинтезом тех или иных нейропептидов является предварительным и нуждается в специальных исследованиях.

Имеющиеся данные о влиянии белка S-100 на обмен ряда нейромедиаторов, в частности АХ, ГАМК, катехол- и индоламинов [32], явились основанием для поисков среди белковых лигандов белка S-100 ферментов обмена соответствующих нейромедиаторов. Среди гликопротеиновых лигандов была обнаружена бутирилхолинэстеразная активность (но не ацетилхолинэстеразная). Если учесть, что бутирилхолинэстераза является преимущественно главным ферментом, а также способность глии поглощать АХ, то можно допустить опосредованное влияние белка S-100 на катаболизм этого медиатора посредством регуляции активности бутирилхолинэстеразы. Имеющиеся в литературе данные об изменениях в обмене норадреналина и серотонина в мозгу животных, получавших инъекции белка S-100 [32], а также наши результаты о присутствии среди белковых лигандов S-100 белка, обладающего активностью МАО, также свидетельствуют о возможной связи белка S-100 с обменом многих нейромедиаторов.

Ранее была обнаружена способность белка S-100 влиять на активность генетического аппарата нервных клеток, в частности, за счет модуляции этими белками активности РНК-полимеразы I и уровня фосфорилированности ряда белков хроматина [12, 13]. Полученные данные о присутствии среди кислых белковых лигандов белка S-100 идентифицированных ДНК-связывающихся белков (элюируются с ДНК 2 М NaCl; составляют 10—15% от общего пула кислых лигандов белка S-100), являются дополнительной информацией для понимания природы связей белков S-100 с регуляцией активности генома нервных клеток.

Отметим, что при направленном поиске среди белковых лигандов МСБ группы S-100 активности каталазы, пероксидазы, Na^+ , K^+ -АТФазы, H^+ -АТФазы, «кислой фосфатазы», АХЭ, тирозингидроксилазы указанных ферментов обнаружено не было.

Природа части лигандов белков группы S-100 (особенно щелочных гликопротеинов) остается неустановленной и требует дальнейших исследований. Вероятно, для этого следует исходить из данных о

связи белков группы S-100 с регуляцией фосфорилирования ряда ядерных и цитоплазматических белков нервной ткани [13], которое, возможно, реализуется посредством Ca^{2+} -зависимого взаимодействия этих МСБ с определенными видами протениназ и фосфотенинфосфатаз. Отдельные данные позволяют предполагать связь белка S-100 с клеточноспецифической (глиальной) регуляцией транскрипции и трансляции [33]. В этой связи представляются оправданными работы по поиску и выделению белков-регуляторов соответствующих процессов, способных акцептировать молекулы белка S-100. Наконец, много неясного остается в молекулярных механизмах участия белка S-100 в регуляции синтеза и распада нейромедиаторов. Возможно, имеется значительно больше ферментов, способных взаимодействовать с белками группы S-100 и связанными с медиаторным обменом, чем это было выявлено в данной работе.

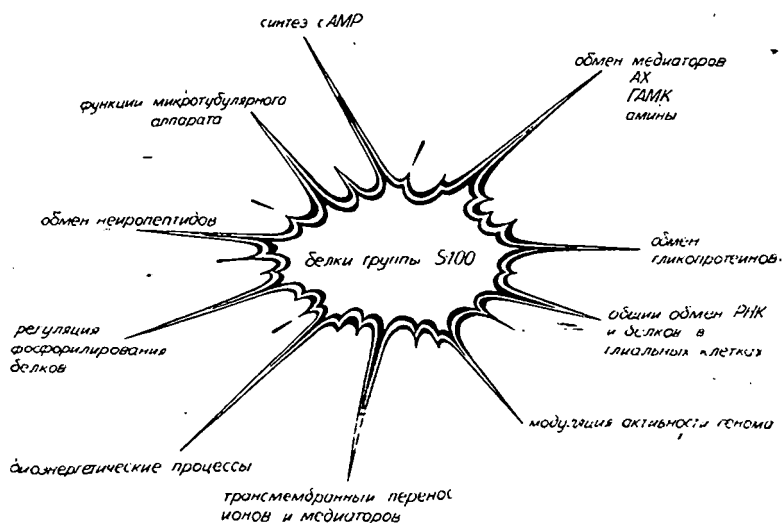


Рис. 3. Предполагаемые функционально-метаболические сферы влияния мозгоспецифических белков группы S-100

На основании литературных и собственных экспериментальных данных нам представляется возможным высказать ряд обобщенных и поддающихся экспериментальной проверке соображений, касающихся роли МСБ группы S-100 в регуляции метаболизма клеток нервной ткани. Вероятно, они, как и близкий к ним по физико-химическим свойствам другой Ca^{2+} -связывающий белок—кальмодулин (органо- и тканеспецифичный в отличие от белка S-100), являются своеобразными макромолекулярными модуляторами, способными прямо или косвенно влиять практически на все ведущие метаболические процессы в нейронах и глиальных клетках (рис. 3). Влияние белка S-100,

возможно, опосредуется по типу аллостерической регуляции активности многих мембранных, цитоплазматических и ядерных ферментов и других регуляторных белков. Способность белка S-100 взаимодействовать с акцепторными участками молекул весьма различных лигандов обусловлена его конформационным состоянием, которое, в свою очередь, зависит от локальной концентрации Ca^{2+} в том или ином компартменте клетки (рис. 2). Можно допустить, кроме того, что молекулы белков группы S-100 имеют несколько разных функциональных центров (подобно молекулам иммуноглобулинов), каждый из которых способен связываться с определенными лигандами. Молекулярная гетерогенность этих МСБ существенно увеличивает число возможных Ca^{2+} -обуславливаемых конформеров и расширяет их регуляторные возможности.

Интересной особенностью белков группы S-100 является их способность экспортироваться в небольших количествах из глии в нейроны [33], где они выполняют соответствующие регуляторные функции. Это дает основание рассматривать МСБ группы S-100 не только в качестве регуляторов множества внутриклеточных процессов, но и как своеобразные межклеточные макромолекулярные мессенджеры, обеспечивающие функциональное единство клеточных компонентов нейроно-глиальных комплексов.

Имеющиеся экспериментальные данные и гипотетические соображения, высказанные на их основе, имеют, по существу, качественный характер и нуждаются в большой работе по количественной детализации и уточнению, однако постановка соответствующих вопросов представляется весьма полезной для развития некоторых аспектов молекулярной нейробиологии.

ENDOGENOUS PROTEIN LIGANDS OF BRAIN-SPECIFIC PROTEIN OF S-100 GROUP

POLETAYEV A. B., GRUDEN M. A.

P. K. Anichin Institute of Normal Physiology, USSR Academy of Medical Sciences, Moscow

About 20 nervous tissue proteins specifically interacting with the immobilized preparation of S-100 protein major fraction have been detected and partially identified. The interaction is Ca^{2+} -dependent. Among ligands of S-100 tubulin, Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase, alkaline phosphatase, butyrylcholinesterase, MAO, carboxyl protease, acid glucose oxidase, β -galactosidase have been identified. Among non-identified ligands are some glycoproteins and DNA-coupling proteins. Data obtained point to the importance of S-100 proteins in the regulation of nervous tissue metabolism.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Bock E. J. Neurochem., v. 30, № 1, p. 7—14, 1978.
2. Долгов О. Н., Поletaев А. Б., Шерстнев В. В. Успехи физиол. наук, т. 11, № 3, с. 47—65, 1980.
3. Moore B. W.—In: Proteins of the nervous system, p. 1—13, N. Y., Raven Press, 1973.
4. Hyden H.—In: Biological Psychiatry Today, p. 177—188, Amsterdam, Elsevier, 1979.
5. Долгов О. Н.—В сб.: IX Всесоюзн. конф. по биохимии нервной системы, с. 277—278, Ереван, 1983.
6. Шерстнев В. В., Кочетков Н. В., Беляев С. В., Лысова Н. П., Долгов О. Н. Поletaев А. Б. Нейрохимия, т. 2, № 3, с. 319—322, 1983.
7. Рылов А. Л.—В сб.: IX Всесоюзн. конф. по биохимии нервной системы, с. 313, Ереван, 1983.
8. Jankovic B. D., Jakulic S., Horvat J. J. Biol. Psychiatry, v. 17, № 6, p. 687—698, 1982.
9. Поletaев А. Б., Селифанова О. П., Бова Н. Я. Иммунология, т. 4, № 2, с. 75—76, 1984.
10. Поletaев А. Б., Мецзякова О. Д. Биохимия, т. 47, № 11, с. 1835—1838, 1982.
11. Поletaев А. Б., Беляев С. В., Лысова Н. П. Биохимия, т. 47, № 8, с. 1349—1353, 1982.
12. Michetti F., Renzis G., Donato R., Miani N. Brain Res., v. 105, № 2, p. 372—375, 1976.
13. Тюленев В. И., Капранов А. А., Белик Я. В.—В сб.: IX Всесоюзн. конф. по биохимии нервной системы, с. 25—26, Ереван, 1983.
14. Беляев С. В., Куприяненко Т. И., Лысова Н. П., Поletaев А. Б. Биохимия, т. 46, № 12, с. 2193—2201, 1981.
15. Остерман Л. А. Исследование биологических макромолекул, М., Наука, 1982.
16. Гааль Э., Медведи Г., Верекеи Л. Электрофорез в разделении биологических макромолекул, М., Мир, 1982.
17. Зеров Ю. П., Аверьянов А. В., Козлов К. А., Чеснокова Л. С. Биохимия, т. 48, № 2, с. 292—296, 1983.
18. Парс Э. Гистохимия, М., Иностранная литература, 1962.
19. Nakao T., Nakao M., Fujita M. J. Biochem., v. 73, № 3, p. 609—616, 1973.
20. Sandt A., Woichech A., Ernsten A.—In: Intervertebral reactions in electrons and iron transfer in mitochondrions, p. 197—202, Amsterdam, Elsevier, 1981.
21. Anson M. L. J. Gen. Physiol., v. 22, p. 79—81, 1932.
22. Beissey O. A. Biol. Chem., v. 164, № 1, p. 321—329, 1946.
23. Karnovsky M. J., Roots L. J. Histochem. Cytochem, v. 12, p. 219—221, 1964.
24. Johnsson R. B., Libby R. M., Nakamura R. M. J. Immunassay, v. 1, p. 27—37, 1980.
25. Knox W. E. Enzyme patterns in fetal, adult and neoplastic rat tissues. Basel, S. Karger Publs., 1972.
26. Glenner G. G., Burtner H. J., Brown G. W. J. Histochem. Cytochem, v. 5, p. 591—600, 1957.
27. Nagatsu T., Levitt M., Udenfriend S. Anal. Biochem., v. 2, p. 122—125, 1964.
28. Kaissi E. A., Mostratos A. J. Immunol. Meth., v. 58, p. 127—132, 1983.
29. Старостина М. В., Свиридов С. М. Молекуляр. биол., т. 12, № 2, с. 372—376, 1978.
30. Шерстнев В. В. Вестн. АМН СССР, № 2, с. 47—52, 1982.
31. Вартамян Г. А., Гальдинов Г. В., Репин В. С. Физиол. человека, т. 1, № 6, с. 1011—1020, 1975.
32. Маслова Н. В., Шевченко Н. В., Бабыкина Н. Д., Хоменко В. В., Шерстнев В. В., Поletaев А. Б., Долгов О. Н.—В сб.: IX Всесоюзн. конф. по биохимии нервной системы, с. 296—297, Ереван, 1983.
33. Поletaев А. Б., Мияки Н., Микетти Ф., Донато Р. Биохимия, т. 48, № 11, с. 1820—1824, 1983.

Поступила 28. V 84.