

**ВЛИЯНИЕ КАЛЬПОНИНА И КАЛЬДЕСМОНА
НА СИЛУ СОКРАЩЕНИЯ ГЛАДКОЙ МЫШЦЫ И РЕГУЛЯЦИЯ
ЭТОГО ПРОЦЕССА КАЛЬЦИЙСВЯЗЫВАЮЩИМИ БЕЛКАМИ
S-100 И p67кДа КАЛЬЦИМЕДИНОМ**

А.Р.Алексанян, В.А.Агаджанян, Б.Ф.Поглазов, А.А.Галоян

*/Институт биохимии им. Г.Х. Бунятына НАН РА,
Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН/
375044 Ереван, ул. Севака, 5/1*

Ключевые слова: кальпонин, кальдесмон, p67кДа кальцимедин, белок S-100, гладкая мускулатура

Сокращение гладкой мускулатуры, индуцируемое повышением концентрации ионов кальция и обусловленное взаимодействием толстых и тонких филаментов, регулируется двумя основными путями. Первый — это миозиновый путь регуляции, обусловленный фосфорилированием легких цепей миозина Ca^{2+} -кальмодулинзависимой киназой легких цепей миозина [1–3]. Интерес ко второму регуляторному механизму был вызван открытием двух актинсвязывающих белков: кальдесмона [4] и кальпонина [5], которые ингибируют актинактивируемую АТФ-азную активность миозина [6–8]. Оба эти белка, расположенные на актиновом филаменте, взаимодействуют с тропомиозином и кальцийсвязывающими белками и способны кальцийзависимым образом регулировать взаимодействие актина с миозином. Регуляторная активность кальдесмона и кальпонина может модулироваться путем фосфорилирования. Исследования последних лет свидетельствуют о том, что эти белки могут фосфорилироваться под действием Ca^{2+} -кальмодулинзависимой протеинкиназы II типа, Ca^{2+} -фосфолипидзависимой протеинкиназы (протеинкиназы C), казеинкиназы II типа, сАМФ-зависимой протеинкиназы, сdc-киназы, а также других точно неидентифицированных протеинкиназ [7–15]. Однако накопилось большое количество фактов (в основном относительно кальпонина), свидетельствующих о том, что фосфорилирование не всегда обнаруживается в условиях *in vivo* при сокращении. Это навело исследователей на предположение, что наряду с регуляцией сокращения путем фосфорилирования этих актинсвязывающих протеинов возможно наличие другого пути регуляции, который и был обнаружен в дальней-

ших исследованиях. Так, кальпонин, как и кальдесмон, взаимодействует с кальцийсвязывающими белками [4,16–20], которые в определенных условиях могут обеспечивать частичную диссоциацию кальдесмона и кальпонины от нитей актина или из комплекса с тропомиозином [17,21,22]. Одним из таких кальцийсвязывающих белков является кальмодулин. Однако концентрация кальпонины в клетке в ~ 5 раз превышает концентрацию кальмодулина, и для устранения ингибирующего эффекта кальдесмона и кальпонины на АТФ-азную активность актомиозина необходимо добавлять большой избыток кальмодулина (не обнаруживающийся в условиях *in vivo*), что, по-видимому, означает, что кальмодулин не может непосредственно регулировать функционирование кальпонины [17,18,23]. Представленные данные позволили Marston и соотр. [17,24] высказать предположение, что опосредованная кальдесмоном кальцийзависимая регуляция взаимодействия актина с миозином осуществляется не кальмодулином, а другими кальцийсвязывающими белками. При исследовании способности некоторых кальцийсвязывающих белков взаимодействовать с кальдесмоном было обнаружено, что тропонин С и белок S-100 образуют прочные комплексы с кальдесмоном [18,19]. Более того, белок S-100 устранял ингибирующий эффект кальдесмона на АТФ-азную активность актомиозина при более низких концентрациях, чем кальмодулин [18].

S-100 протеины — это кислые кальцийсвязывающие белки с низкой молекулярной массой (10–12 кДа), присутствующие преимущественно в нервной ткани [29,30] в виде димеров. Из мозга были изолированы и описаны димерные изоформы: S-100 $\alpha\alpha$, S-100 α и S-100 β , отличающиеся друг от друга содержанием субъединиц ($\alpha\alpha$, $\alpha\beta$ и $\beta\beta$ димеры соответственно).

В последнее время было много сообщений, что S-100 протеины взаимодействуют с кальдесмоном и кальпонином, регулируя их активность, на основании чего некоторыми авторами было сделано предположение, что биологическая роль S-100 белков может быть опосредована кальдесмоном и кальпонином [31].

Другими кальцийсвязывающими белками, вовлекающимися в регуляцию активности кальдесмона и кальпонины, могут являться кальцимедины, кальций-фосфолипидсвязывающие белки, относящиеся к группе аннексинов. Об этом свидетельствуют накопленные факты, что в ряде клеток кальдесмон располагается вблизи плазматических мембран [25–28], т.е. в компартменте, богатом кальцийфосфолипидсвязывающими белками. Одним из этих белков является белок р67кДа, который также взаимодействует с кальдесмоном, тем самым вовлекаясь в регуляцию АТФ-азной активности гладкомышечного миозина [32].

Целью настоящей работы являлось изучение влияния белков S-100 из мозга и р67кДа кальцимедина на кальдесмон- и кальпониноопосредованную регуляцию силы сокращения гладкой мускулатуры.

Очистка кальпонины и кальдесмона. Кальпонин и кальдесмон были получены из гладких мышц аорты крупного рогатого скота методом, впервые предложенным М. Abe и соавт. [33]. Суть метода заключается в одновременной очистке этих белков, применяя термическую обработку, фракционирование сульфатом аммония (0–30% и 30–50%), КМ52 колоночную хроматографию (Whatman, Maidstone, UK) и гельфильтрацию (Ultrogel AcA44). Выход кальпонины и кальдесмона из 200 г аорты быка составил 15 и 30 мг соответственно.

200 г очищенных гладких мышц из свежей аорты быка кипятили при 95°C в кипящей водяной бане в течение 2 мин, затем охлаждали на льду и размельчали. Размельченные гладкие мышцы гомогенизировали дважды в 600 мл буфера (50 мМ имидазола/HCl, pH 6,9), содержащем 300 мМ KCl, 1 мМ ЭГТА, 1 мМ ДТТ, 0,5 мМ фенилметилсульфонилфлюорида (PMSF), 10 мкг/мл лейпептина и 1 мМ тетрагидрата натрия при высокой скорости в течение 1 мин. После центрифугирования со скоростью 12000 g в течение 10 мин супернатант рецентрифугировали со скоростью 150000 g в течение 30 мин. Кальдесмон, тропомиозин и кальпонин оставались в растворе после термической обработки. К супернатанту добавляли кристаллический $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ до 30% насыщения (16,4 г на 100 мл супернатанта) и затем взбалтывали в течение 30 мин. Преципитат был собран после центрифугирования при 12000g и затем в оставшемся супернатанте концентрация $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ была доведена до 50% насыщения дальнейшим добавлением кристаллического сульфата аммония (11,7 г на 100 мл супернатанта).

Преципитат был собран после центрифугирования в течение 30 мин при 12000 g. Преципитат, полученный фракционированием $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ при 0–30%, содержал кальпонин как основной компонент и при 30–50% — кальдесмон и тропомиозин. Полученные осадки белков были по отдельности растворены в 20 мМ натрий-ацетатном буфере (pH 5,6), содержащем 6 М мочевины, 0,5 мМ ДТТ и 0,1 мМ ЭГТА (буфер А), затем диализировали против трех литров буфера А в течение 8 ч. Каждый диализированный материал был центрифугирован со скоростью 150000g в течение 30 мин, после чего супернатанты были смешаны и пропущены через колонку КМ-52-целлюлозы, уравновешенную буфером А. Белки были элюированы линейным градиентом NaCl (0–0,5 М) в буфере А, 150 мл каждый.

Кальпонин и кальдесмон были элюированы между 0,15 и 0,23 М NaCl в виде одного пика. Полученные фракции на Ds-Na-электрофорезе в ПААГ образовали три полосы, содержащие кальпонин, кальдесмон и неизвестный белок соответственно. Элюированные кальпонин- и кальдесмонсодержащие фракции были собраны и концентрированы микрокконами (Model YM-10; Amicon, Danvers, M.A. USA) до ~ 3 мл и затем пропущены через колонку Ultrogel A44 (Pharmacia LKB, Bromma, Sweden,).

2.5х90 см), предварительно уравновешенную буфером (20 мМ имидазол/НСl, рН 7,2), содержащим 0,4 М NaCl, 0,5 мМ ДТТ и 0,1 мМ ЭГТА. Кальпонин и кальдесмон были эффективно разделены с 97–99% чистотой. Конечный выход кальпонины и кальдесмона из 200 г аорты быка составил 15 и 30 мг соответственно.

Выделение р67кДа кальцимедина. р67кДа белок был изолирован методом, описанным Моог [34], из 350 г мускульного желудка цыплят путем гомогенизации в 700 мл буфера (75 мМ NaCl/40 мМ Tris/НСl, рН 7,3), содержащего 0,1% NaN₃, 2 мМ ЭДТА, 0,1 мМ PMSF при температуре 4°C. Гомогенат был центрифугирован со скоростью 7000 об/мин в течение 20 мин. Супернатант был рецентрифугирован и профильтрован. Концентрация CaCl₂ была доведена до 1 мМ (сверх концентрации ЭДТА). Экстракт был центрифугирован снова со скоростью 14000 об/мин вслед за фильтрацией через стеклофильтр. Супернатант был хроматографирован на матриксе флуфеназин-сефарозе (1,5 х 6,5 см), предварительно уравновешенной буфером (75 мМ NaCl/ 40 мМ Tris/НСl, рН 7,3), содержащим 0,1% NaN₃ и 1 мМ CaCl₂. Затем колонка была промыта тем же буфером, отличающимся содержанием NaCl (0,5 М). Концентрация NaCl была вновь уменьшена до 75 мМ, и кальцийзависимосвязывающиеся белки были элюированы 1 мМ ЭГТА в буфере (75 мМ NaCl/40 мМ Tris/НСl, рН 7,3), содержащем 0,1% NaN₃. Белковый пик был собран и диализирован против 10 мМ имидазол/1 мМ ЭДТА буфера, рН 6,4 (трижды через каждые 4 часа), чтобы понизить содержание NaCl для ионообменной хроматографии на колонке ДЭАЭ-целлюлозы (Sigma, USA; 1,5 х 25 см), уравновешенной буфером (10 мМ имидазола, 10 мМ NaCl, 1 мМ ЭДТА, рН 6,4).

Белки были элюированы градиентом 10–120 мМ NaCl в буфере (10 мМ имидазола, 1 мМ ЭДТА, рН 6,4). Кальмодулин был отделен от кальцимединов на этом этапе, так как он не элюируется, пока концентрация NaCl не станет выше 0,25 М. Пик р67кДа белка (приблизительно при концентрации NaCl 80 мМ) был собран, концентрирован кальцийзависимым связыванием на колонке с фенил-сефарозой (Sigma, USA; 0,7 х 8,0 см) и диализирован в буфере ЭГТА/NaCl/Tris.

Выделение S-100 протеина из мозга быка. Белок S-100 был выделен из мозга быка в виде смеси трех димерных изоформ: S-100α_о, S-100α, S-100β методом, предложенным Isobe и соавт. [35], модифицированным Okasaki [36]. Свежий мозг быка был размельчен и гомогенизирован в холодных условиях (4°C) в буфере А (30 мМ Tris/НСl, рН 7,5, 1 мМ ЭГТА) и центрифугирован со скоростью 100 000g в течение 60 мин. К супернатанту был добавлен кристаллический (NH₄)₂SO₄ (около 85% насыщения), и рН был доведен до 4,7 соляной кислотой и снова центрифугирован. Преципитат был растворен и диализирован в буфере А. Экстракт был хроматографирован на ДЭАЭ-Сефадексе А-50 (Sigma, USA) градиентом 0–0,5 М NaCl. Фракции, содержащие белки с молекулярной массой 9 кДа и 10 кДа, были отделены. К каждой из фракций был добавлен

CaCl_2 (конечная концентрация 2 мМ). Полученные пробы были пропущены через колонку с фенил-сефарозой CL-4В (Sigma, USA) и элюированы буфером А. Фракция с белком 10 кДа была изолирована как отдельная фракция на Ds-Na-электрофорезе в ПААГ.

Метод приготовления демембранизированной мышцы из продольных мышечных тяжей подвздошной кишки морской свинки (*taenia coli*). Гладко-мышечные тяжи были получены из подвздошной кишки морской свинки массой 300–400 г. Животное было умерщвлено декапитацией, и мышцы отделены и демембранизированы тритоном X-100, как было описано ранее [37]. Препарат был сохранен в растворе глицерина при температуре -15°C до проведения эксперимента. Механическую активность гладкой мышцы изучали в изотоническом режиме с помощью двухфазного диодного механотрона типа 6МХХ2Б. Для записи механограммы использовали самописец (ENDIM). Величина исходной нагрузки составляла 1 г. Исследовались мышечные тяжи длиной 5–7 мм и диаметром 0,1–0,2 мм. Раствор содержал 30 мМ TES (N-трис-(гидроксиметил)метил-2-аминоэтансульфоновая кислота), 2 мМ Mg^{2+} , 3,2 мМ Mg-АТФ, 12 мМ ЭГТА, 1 мМ NaN_3 и 0,5 мкМ кальмодулина. В расслабляющем растворе концентрация свободных ионов Ca^{2+} составляла 10^{-9} М (рСа 9,0), а в сокращающем растворе $10^{-4,5}$ М (рСа 4,5). Сокращающий и расслабляющий растворы смешивались в соответствующих количествах для получения промежуточных концентраций Ca^{2+} . Ионная сила раствора была доведена KCl до 150 мМ, а pH – КОН до 6,9. Кальпонин и кальдесмон добавлялись будучи растворенными в том же буфере.

Результаты и обсуждение

Кальпонин в зависимости от концентрации ингибировал сокращение, вызванное ионами кальция (10 мкМ). Минимальная концентрация кальпонины, необходимая для ингибирования тонического сокращения, была 0,6 мкМ, и максимальный эффект был получен при 5,5 мкМ. При добавлении S-100 (1,5 мкМ) отмечалось устранение этого эффекта (рис1).

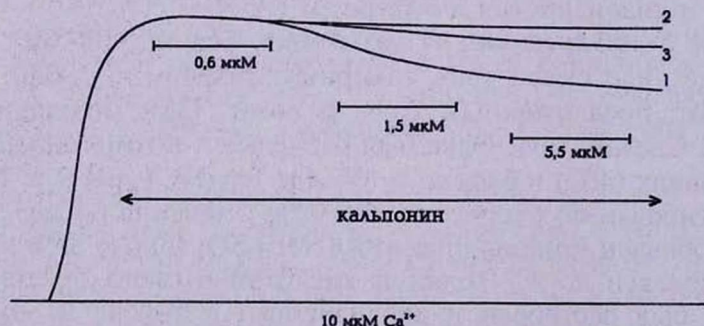


Рис. 1. 1 – контрольное сокращение, вызванное 10 мкМ CaCl_2 ; 2 – эффект кальпонины (0,6–5,5 мкМ) на кальций-индуцированное сокращение; 3 – устранение этого эффекта белком S-100 (1,5 мкМ)

Был также исследован эффект предварительно добавленного кальпони́на (5,5 мкМ) на кальцийиндуцированное (репродуцируемое 3–4 раза) сокращение. Необходимо отметить, что эффект кальпони́на на кальцийиндуцированное сокращение был исследован в присутствии 2 мкМ экзогенно добавленного кальмодулина к демембранизированной тритоном мышце. Сокращение вызывалось различными концентрациями кальция (0,1–10 мкМ). Проведенные эксперименты показали, что кальпонин уменьшает силу сокращения мышцы и что этот эффект устраняется добавлением разных концентраций S-100 (рис. 2).

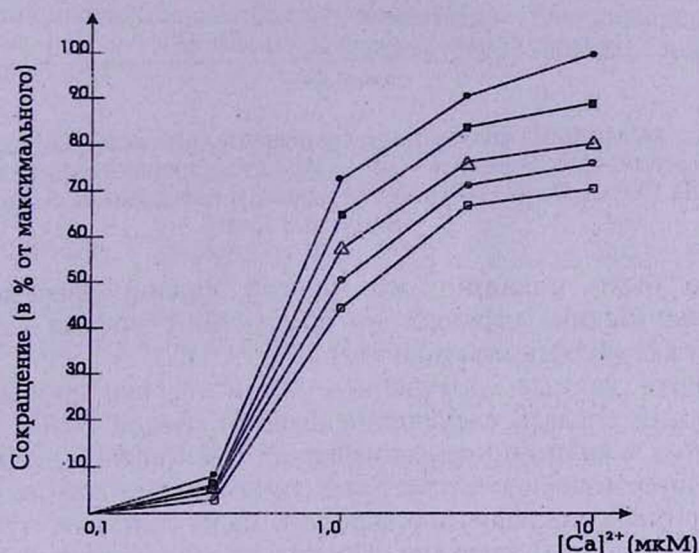


Рис. 2. Влияние разных концентраций S-100 на ингибирующий эффект 5,5 мкМ кальпони́на на кальцийиндуцированное (0,1–10 мкМ) сокращение

● — контроль, □ — кальпонин, ■ — S-100 (1,5 мкМ),
Δ — S-100 (1,0 мкМ), ○ — S-100 (0,8 мкМ),

Опыты были проведены и с кальдесмоном, который также ингибирует сокращение гладкой мускулатуры в концентрации 1,2 мкМ. Это ингибирование, как и в случае с кальпони́ном, устраняется белком S-100, но в более высоких концентрациях (4,8 мкМ). Однако тот же эффект устраняется белком р67кДа в концентрации 0,9 мкМ (рис.3).

Ранее разными исследователями было показано, что 1 моль белка S-100 связывается с 1 моль кальпони́на и 1 моль кальдесмона. Добавление S-100 к смеси кальдесмона или кальпони́на с актином вызывает отделение этих белков в присутствии ионов кальция, но не в присутствии ЭГТА. Белок S-100 также снимает ингибирующий эффект кальпони́на и кальдесмона (в присутствии ионов кальция) на АТФ-азную активность миозина [31].

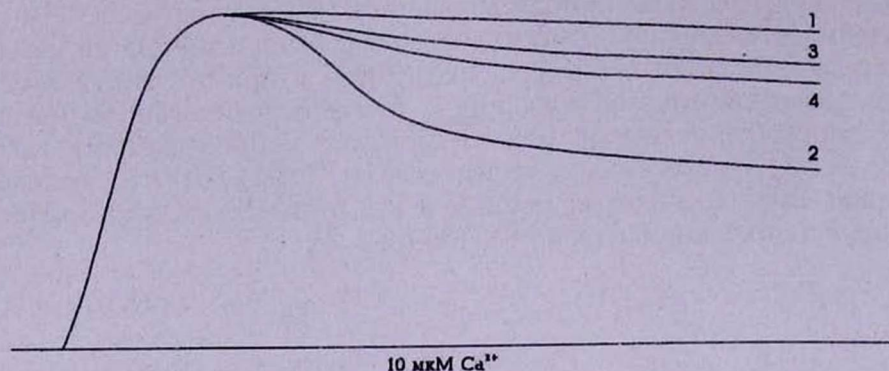


Рис. 3. 1— кальцийиндуцированное сокращение ($10 \text{ мкМ } [\text{Ca}]^{2+}$); 2 — ингибирование сокращения кальдесмоном ($1,2 \text{ мкМ}$); 3— устранение эффекта кальдесмона белком р67кДа ($0,9 \text{ мкМ}$); 4 — устранение эффекта кальдесмона белком S-100 ($4,8 \text{ мкМ}$)

Недавно было показано, что другой кальцийсвязывающий белок р67кДа кальцимедин устраняет ингибирующий эффект кальдесмона на АТФ-азную активность миозина [32].

Анализируя данные, полученные нами на изолированной гладкой мышце, можно сделать следующие выводы. Белок S-100, связываясь с кальдесмоном и кальпонином, снимает их ингибирующий эффект на актин-миозиновое взаимодействие, тем самым восстанавливая способность гладкой мышцы к сокращению; причем, надо отметить, что с кальпонином этот эффект ярко выражен. Наряду с этим полученные данные показали, что белок р67кДа, который связывается с кальдесмоном, также восстанавливает способность мышцы к сокращению. Из литературных данных и наших предварительных исследований известно, что кальпонин обладает способностью в большей мере влиять на скорость, чем на силу сокращения гладкой мышцы. Учитывая это, можно предположить, что некоторые кальцийсвязывающие белки (S-100, р67кДа) вовлекаются в регуляцию мышечного сокращения, специфически взаимодействуя с кальпонином и кальдесмоном или с обоими белками. Причем разные концентрации этих белков в клетке могут различным образом влиять на соотношение скорости и силы сокращения, что станет объектом дальнейших исследований.

Поступила 15.05.99

Ա.Ռ.Ալեքսանյան, Վ.Ա.Աղաջանյան, Բ.Ֆ.Պոլազով, Ա.Ա.Գալոյան

Հետազոտվել է ուղեղի սպիտակուցներ S-100 և n67kDa-ն ազդեցությունը ծովախոզուկի զստափոսային աղիքի հարթ մկանային փոկերի կրճատման ուժի կալիբսմոն- և կալպոնին-միջնորդված կարգավորման վրա: S-100 սպիտակուցները և n67kDa-ն ստացվել են ցուլի ուղեղից և հավերի ճտերի ստամոքսից, իսկ կալպոնինն ու կալիբսմոնը՝ ցուլի աորտայից:

Արդյունքները ցույց են տվել, որ S-100 և n67kDa-ն մասնակցում են մկանային կրճատման կարգավորմանը, մտնելով յուրահատուկ փոփոխարարչության մեջ կալիբսմոնի հետ, իսկ S-100-ը փոխազդեցության մեջ է մտնում 2 ակտին կապող սպիտակուցների հետ:

THE EFFECT OF CALPONIN AND CALDESMON ON FORCE OF CONTRACTION OF SMOOTH MUSCLE AND REGULATION OF THIS PROCESS WITH CALCIUM BINDING PROTEINS S-100 AND r67kDa CALCIMEDIN

A.R.Alexanian, V.A.Aghajanyan, B.F.Poglavov, A.A.Galoyan

The effect of S-100 from brain and r67kDa calcimedin on caldesmon and calponin dependent regulation of smooth muscle contraction force of taenia coli was studied.

Calponin and caldesmon were isolated from bovine aorta, S-100 and r67kDa proteins — from bovine brain and chicken stomach respectively.

Calponin at concentrations 0,6-5,5 μM inhibited contraction induced by 10 μM $CaCl_2$ caused by 1,5 μM S-100. Caldesmon also inhibited the contraction of smooth muscle at concentration 1,2 μM and this effect reversed with 4,8 μM S-100 as well as with 0,9 μM r67kDa calcimedin.

It is concluded that r67kDa protein is involved in the regulation of contraction of smooth muscle specifically interacting with caldesmon in contrast with S-100, which interacts with both of these actin binding proteins.

ЛИТЕРАТУРА

1. Adelstein R.S., Eisenberg E. Ann. Rev. Biochem., 1980, p. 921.
2. Walsh M.P., Harstone D.J. Calcium and Cell Function. 1982 (Cheung W.Y, ed.), Academic Press, New York.
3. Sommerville E.E., Harstone D. J. Cell Calcium, 1986, 7, p. 353.
4. Sobue K., Muramoto Y., Fujita M., Kakiuchi S. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1981, 78, p. 5652.
5. Takahashi K., Hiwada K., Kokubu T. Biochem. Biophys. Res. Commun., 1986, 141, p. 20.
6. Sobue K., Takahashi K., Wakabayashi I. Biochem. Biophys. Res. Commun., 1985, 132, p. 645.
7. Ngai P.K., Walsh M.P. J. Biol. Chem., 1990, 259, p. 13656.
8. Winder S. J., Walsh M.P. J. Biol. Chem., 1990, 265, p. 10148.
9. Ngai P.K., Walsh M.P. J. Biol. Chem., 1987, 244, 2, p. 417.
10. Umekawa H., Hidaka H. Biochem. Biophys. Res. Commun., 1985, 132, 1, p. 56.

11. Vorotnikov A.V., Shirinsky V.P., Gusev N.B. FEBS Letters, 1988, 236, 2, p. 321.
12. Yamashiro S., Yamakita Y., Ishikawa R., Matsumura F. Nature, 1990, 334, p. 6267.
13. Winder S. J., Walsh M.P. Biochem. Inter., 1990, 22, p. 335.
14. Naka M., Kureishi Y., Muroga Y. et al. Biochem. Biophys. Res. Commun., 1990, 171, 3, p. 933.
15. Tanaka T., Naka M., Kureishi Y., Muroga Y. Europ. J. Pharmacol., 1990, 318, 3, p. 672.
16. Sobue K., Sellers J.R. J. Biol. Chem., 1991, 266.
17. Marston S.B., Smith C.W.J. J. Muscle Res. Cell Motil., 1985, 6, p. 380.
18. Skripnikova E.V., Gusev N.B. FEBS Letters, 1989, 257, 2, p. 380.
19. Fujii Top Mashino K., Andoh H. et al. J. Biochem. (Tokyo), 1990, 107, 1, p. 133.
20. Takahashi K., Hiwada K., Kokubu T. Hypertension, 1988, 11, 6, Part 2, p. 620.
21. Sobue K., Murimoto K., Inoue M. Biomed. Res., 1982, 3, 2, p. 188.
22. Takahashi K., Abe M. J.C. Seidel Memorial Symposium on the Regulation of Smooth Muscle Contraction, Boston, 1990, Tues AM, N5.
23. Smith C.W.J., Pritchard K., Marston S.B. J. Biol. Chem., 1987, 262, 1, p. 116.
24. Marston S., Pritchard K., Redwood C., Taggart M. Biochem. Soc. Trans., 1988, 16, 4, p. 494.
25. Sobue K., Kanda K., Tanaka T., Ueki N. J. Cell. Biochem., 1988, 37, 3, p. 317.
26. Burgoyne R.D., Cheek T.R., Norman K.M. Nature, 1986, 319, 6082, p. 68.
27. Rochette-Egly C., Lacroix B., Kedinger M. et al. Calcium and Calcium Binding Proteins. Eds. Cerday Ch., Gilles R., Bdis L., Berlin, 1988, Heidelberg: Springer-Verlag, 179.
28. Walker C., Kerrik W.G.L., Bourguignon L.Y.W. J. Biol. Chem., 1989, 264, 1, p. 469.
29. Moore B.W. Biochem. Biophys. Res. Commun., 1965, 6, p. 739.
30. Donato R. Cell Calcium, 1986, 7, p. 123.
31. Fujii T., Oomatsuzawa A., Kuzumaki N., Kondo Y. J. Biochem., 1994, 116, p. 121.
32. Bogatcheva N.V., Panaiotov M.P., Vorotnikov A.V., Gusev N.B. FEBS Letters, 1993, 335, 2, p. 193.
33. Abe M., Takahashi K., Hiwada K. J. Biochem. (Tokyo), 1990, 107, p. 507.
34. Moore B.P. Biochem., 1986, 238, p. 49.
35. Isobe T., Nakajima T., Okuyama T. Biochem. Biophys. Acta, 1977, 494, p. 222.
36. Okasaki K., Obata H.N., Inoue S., Hidaka H. Biochem. J., 1995, 306, p. 551.
37. Arner A., Hellstand P. J. Physiology, 1985, 360, p. 347.