



УДК 547.963

НЕКОТОРЫЕ СВОЙСТВА ЯДЕРНЫХ ФОСФОПРОТЕИНОВ*

Уманский С. Р., Зотова Р. Н., Ковалев Ю. И.

Институт биологической физики Академии наук СССР, Пущино

Изучена кинетика фосфорилирования ядерных белков печени и тимуса крыс *in vitro*. Максимальное включение фосфата в белки ядер и хроматина печени достигается к 5 мин, а тимуса — к 15 мин инкубации ядер или хроматина с $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$. Параллельно с фосфорилированием идет дефосфорилирование ядерных белков и белков хроматина. Фосфорилирование различных фракций ядерных белков неравномерно и распределяется по убывающей в ряду: лабильно связанные НГБ, прочно связанные НГБ, БЯС, гистоны. Методом электрофореза в полиакриламидном геле показана значительная гетерогенность всех исследовавшихся фракций ядерных ФП. ФП хроматина отличаются от ФП ядерного сока. Обнаружена тканевая специфичность ФП ядерного сока. ФП, входящие в состав хроматина и ядерного сока, способны взаимодействовать как с нативной, так и с денатурированной ДНК, причем с последней связывается большее количество ФП.

Одним из возможных путей регуляции процессов транскрипции в клетках эукариот является модификация белков хроматина [1,2]. Действительно, в последние годы было показано, что белки хроматина (как гистоны, так и НГБ) подвергаются в клетках ацетилированию, метилированию, фосфорилированию и т. д. Наиболее интенсивно, по крайней мере в отношении НГБ, исследовался процесс фосфорилирования [1—9]. Было показано, что фосфорилирование ядерных белков осуществляется путем переноса концевой фосфата АТФ на сериновые и (в меньшей степени) треониновые остатки белковых молекул [4, 5, 7], причем *in vivo* и *in vitro* (на препарате изолированных ядер) фосфорилируются одни и те же белки [6]. Изучены и некоторые другие свойства как системы фосфорилирования ядерных белков, так и самих ФП, наиболее существенными из которых являются способность ФП взаимодействовать с ДНК [8], а также корреляция между скоростью фосфорилирования ядерных белков и скоростью синтеза РНК [1, 7, 9].

Целью настоящей работы было изучение фосфокиназной системы клеточных ядер и хроматина, а также некоторых свойств ядерных ФП.

На рис. 1 представлены данные о кинетике включения фосфата в белки при инкубации ядер (1, а, в) или хроматина (1, б) печени и тимуса крыс с $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$. Максимальное включение в белки ядер и хроматина печени достигается через 5 мин, а тимуса — через 15 мин инкубации. Риквуд и соавт. [10] показали, что после 5 мин инкубации ядер печени с $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ ~90% кислоторастворимого ^{32}P обнаруживается в виде неорганического

* Принятые сокращения: НГБ — негистоновые белки хроматина, ФП — фосфопротеины, БЯС — белки ядерного сока.

фосфата. Таким образом, после 5 мин инкубации ядер печени включение в белки прекращается из-за отсутствия донатора фосфата. Несколько иная кинетика фосфорилирования белков ядер и хроматина тимуса связана, возможно, с тем, что распад $[\gamma -^{32}\text{P}]\text{ATP}$ в их присутствии идет несколько медленнее. После инкубации хроматина или ядер печени и тимуса крыс с $[\gamma -^{32}\text{P}]\text{ATP}$ соответственно в течение 5 и 15 мин количество ^{32}P в бел-

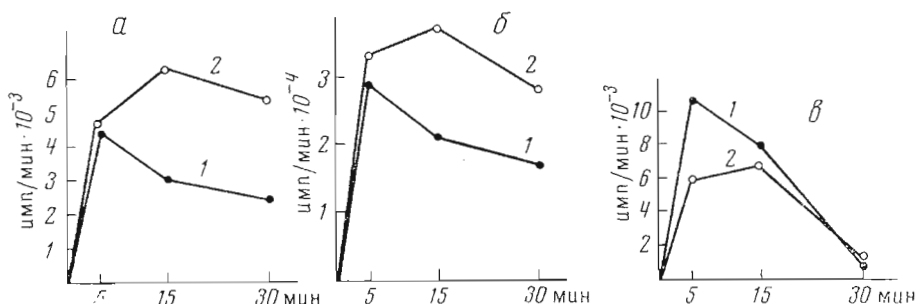


Рис. 1. Кинетика фосфорилирования белков ядер (а, б) и хроматина (б) печени (1) и тимуса (2) крыс: а, б — инкубация в стандартных условиях, в — инкубация в среде, содержащей 0,25 М NaCl

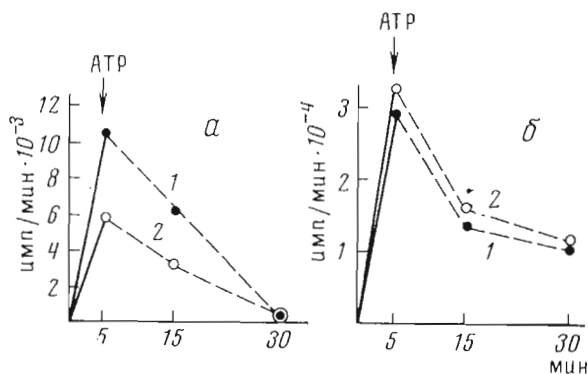


Рис. 2. Дефосфорилирование белков ядер (а) и хроматина (б) печени (1) и тимуса (2) крыс. Ядра инкубировали в среде, содержащей 0,25 М NaCl, а хроматин — в стандартной среде, через 5 мин добавляли немеченый АТФ до концентрации 2 мМ и инкубацию продолжали 10 или 25 мин

ках начинает уменьшаться. Таким образом, параллельно с фосфорилированием белков ядер и хроматина идет их дефосфорилирование. Выход метки из ядерных белков происходит значительно быстрее при повышении концентрации NaCl от 0,025 до 0,25 М (рис. 1, в). Кинетика фосфорилирования и дефосфорилирования ядерных белков и белков хроматина одинакова. Таким образом, в состав хроматина входят ферменты, обеспечивающие как фосфорилирование, так и дефосфорилирование белковых молекул.

В ряде опытов после 5 мин инкубации ядер или хроматина с $[\gamma -^{32}\text{P}]\text{ATP}$ к смеси добавляли 100-кратный избыток немеченого АТФ и инкубацию продолжали 10 или 25 мин (рис. 2, а, б). Радиоактивность ядерных и хроматиновых белков падает при этом значительно быстрее, чем в отсутствие немеченого АТФ. Следует учесть, что немеченый АТФ не маскирует, по крайней мере в печени, включение ^{32}P в белки, потому что, как уже говорилось, после 5 мин инкубации ядер печени с $[\gamma -^{32}\text{P}]\text{ATP}$ включение ^{32}P в белки прекращается из-за распада $[\gamma -^{32}\text{P}]\text{ATP}$. Таким образом, из-

Фосфорилирование различных фракций ядерных белков тимуса

Ядра тимуса инкубировали с [γ - 32 P]АТР в стандартных условиях 10 мин и белки ядер фракционировали, как описано в «Экспериментальной части»

Белки	Удельная радиоактивность, имп/мин/мг белка	% от общей радиоактивности белков ядер
Гистоны	$2,06 \cdot 10^3$	2,35
Прочно связанные НГБ	$49,6 \cdot 10^3$	4,25
Лабильно связанные НГБ	$184 \cdot 10^3$	78
«Свободные» БЯС	$8,9 \cdot 10^3$	9,4
Белки рибонуклеопротеидов ядерного сока	$11,6 \cdot 10^3$	0,75
ДНК	$6,6 \cdot 10^3$ *	5,25

* Имп/мин/мг ДНК.

быток АТР действительно стимулирует дефосфорилирование белков ядер и хроматина.

В табл. 1 представлены данные одного из опытов, в которых сравнивалось фосфорилирование различных фракций ядерных белков тимуса. Наиболее высокой оказывается удельная активность лабильно связанных НГБ, наименьшей — гистонов. Около 6% суммарной радиоактивности ядерных белков остается связанной с ДНК.

Различие в удельной активности лабильно связанных НГБ и прочно связанных НГБ свидетельствует о том, что разделение их в процессе выделения не является случайным и что эти белки представляют собой по крайней мере функционально различные классы НГБ.

На рис. 3, *г*, *д* представлены электрофореграммы ФП, входящих в состав НГБ печени и тимуса крыс. Несмотря на заметные количественные различия, связанные с разницей в относительной концентрации отдельных ФП или скорости их фосфорилирования в хроматине двух органов, существенных качественных отличий обнаружить не удастся. Вообще следует отметить, что чрезвычайная гетерогенность ФП затрудняет качественное сравнение электрофореграмм. Вместе с тем ФП, входящие в состав НГБ и БЯС одного органа, различаются между собой (рис. 3, *а*, *б*, *г*, *д*). Сравнение электрофореграмм суммарных ФП ядерного сока и ФП рибонуклеопротеидов обнаруживает различие между ФП рибонуклеопротеидов и «свободными» ФП ядерного сока (рис. 3, *б*, *е*). Следует отметить также существенные различия (количественные и, по-видимому, качественные) между ФП, входящими в состав БЯС, печени и тимуса (3, *а*, *б*).

В ряде работ была ранее показана способность выделенных различными методами ФП хроматина взаимодействовать с нативной ДНК [8]. Мы изучали взаимодействие ФП, входящих в состав лабильно связанных НГБ, прочно связанных НГБ и «свободных» БЯС с нативной и денатурированной ДНК.

В табл. 2 представлены данные, свидетельствующие о том, что в состав исследованных фракций ФП входят белки, способные взаимодействовать как с нативной, так и с денатурированной ДНК. Во всех случаях несколько большее количество белков связывается с денатурированной ДНК. Хотя отношение белок/ДНК для разных белков было различным, что не позволяет количественно сравнивать взаимодействие разных ФП с ДНК, можно полагать, что ФП, входящие в состав прочно связанных НГБ, действительно, наиболее эффективно взаимодействуют с ДНК.

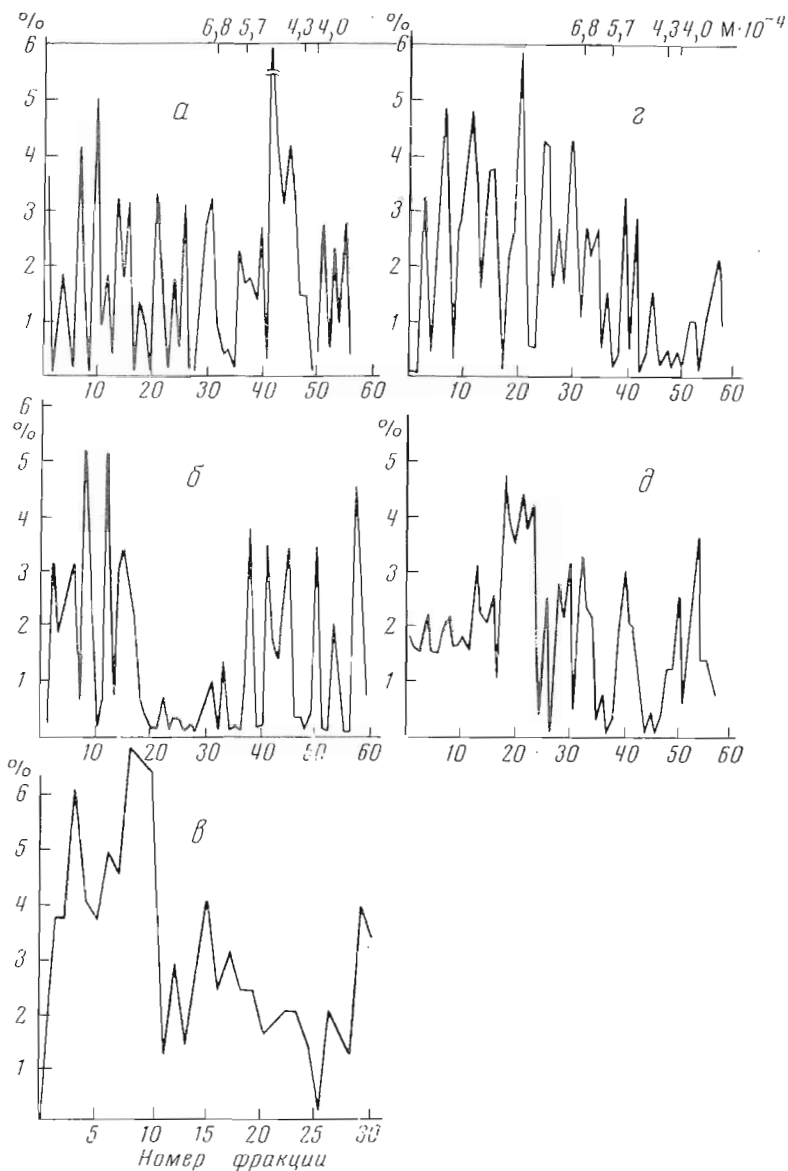


Рис. 3. Электрофорграммы суммарных БЯС печени (а) и тимуса (б), НГБ печени (г) и тимуса (д) и белков рибонуклеопротеидов тимуса (в). По оси ординат — радиоактивность фракций в процентах от суммарной активности. По верхней оси абсцисс отложены молекулярные веса бычьего сывороточного альбумина, пируваткиназы, яичного альбумина и креатинкиназы, подвергнутых электрофорезу в стандартных условиях

Представленные в настоящей работе результаты в соответствии с данными работ [1,3—6,10,11] свидетельствуют о наличии в ядрах клеток эукариот ферментативных систем, обеспечивающих фосфорилирование и дефосфорилирование различных фракций ядерных белков. Данные опытов по фосфорилированию белков хроматина свидетельствуют о том, что необходимые для осуществления этих процессов ферменты имеются и в составе белков хроматина. Наличие фосфокиназ в НГБ было показано ранее различными авторами [5, 12—14], а Киш и Кляйншмитц [14] удалось обнаружить в составе НГБ 11 фракций фосфокиназ, обладающих высокой субстратной специфичностью (одни фракции фосфорилировали гистоны, но не НГБ,

Радиоактивность белков во фракциях элюатов (% от суммарной внесенной радиоактивности) при взаимодействии различных ФП с нативной и денатурированной ДНК (соответственно ДНК_н и ДНК_д)

На колонку с 1 мг нативной или денатурированной ДНК наносили по 1,9 мг «свободных» БЯС, 0,3 мг лабильно связанных НГБ или 0,5 мг прочно связанных НГБ

Элюэнт (NaCl), моль	БЯС		НГБ			
	ДНК _н	ДНК _д	прочно связанные		лабильно связанные	
			ДНК _н	ДНК _д	ДНК _н	ДНК _д
0,15	1,39	3,61	4,67	6,6	1,48	2,78
0,6	0,77	2,54	3,71	3,71	0,98	0,98
2,0	1,54	1,62	3,07	4,68	0,68	0,45
2,0 + 5М мочевины	0,25	2,32	4,03	5,0	0,98	0,76
Всего	3,95	10,09	15,48	19,99	4,12	4,97

другие — только определенные классы НГБ и т. д.). Наряду с этим Кляйншмит и Олфри [5] показали, что выделенные НГБ не обладают автономной системой дефосфорилирования — ^{32}P , включившийся в НГБ *in vitro*, не отщепляется при дальнейшей инкубации белков. Полученные нами данные о дефосфорилировании белков хроматина противоречат такому выводу. Это расхождение может объясняться двумя причинами: во-первых, возможно, что дефосфорилирование НГБ осуществляется только в составе хроматина, во-вторых, не исключено, что ферменты, обеспечивающие дефосфорилирование белков хроматина, инактивировались в работе [5] при выделении НГБ.

Дефосфорилирование белков ядер и хроматина, по-видимому, не является энергозависимым процессом, как это предполагали Кляйншмит и соавт. [4]. Действительно, переход в кислоторастворимую фракцию ^{32}P , включившегося в белки ядер или хроматина, наблюдается и без добавления немеченого АТР (рис. 1, а, б), причем в 0,25 М NaCl за 25 мин отщепляется почти весь ^{32}P , включившийся в ядерные белки за 5 мин инкубации с $[\gamma - ^{32}\text{P}]\text{АТР}$ (рис. 1, в). При добавлении немеченого АТР наблюдаемая скорость дефосфорилирования возрастает, что связано в какой-то степени с подавлением включения ^{32}P из-за разбавления метки (в случае хроматина и ядер тимуса), а также с тем, что АТР, по-видимому, повышает активность соответствующих ферментов, вследствие чего возрастает скорость дефосфорилирования. Во всяком случае тот факт, что как в изолированных ядрах, так и в хроматине параллельно с фосфорилированием идет активное дефосфорилирование ФП, должен учитываться при интерпретации данных о корреляции между изменением скорости синтеза РНК и фосфорилирования ядерных белков [1, 7, 9]. В каждом случае необходимо, по-видимому, изучение обоих параметров — кинетики фосфорилирования и дефосфорилирования. Следует иметь в виду также, что соотношение скорости этих процессов может быть различным в разных тканях (см. рис. 1, а, б) и при разных функциональных состояниях.

Фракционирование НГБ и БЯС в полиакриламидном геле свидетельствует о чрезвычайной гетерогенности ядерных ФП. Вместе с тем сравнение электрофореграмм ФП хроматина печени и тимуса не выявляет существенных качественных различий. Близкие результаты были получены Риквудом и соавт. [10] и в целом хорошо согласуются с данными других авторов, которые подтвердили значительную гетерогенность НГБ, с одной стороны, и отсутствие четко выявляемой тканевой специфичности — с другой. Распределение ФП, входящих в состав НГБ, существенно отличается от распределения ФП ядерного сока из того же органа, что указы-

вает на различия в составе этих фракций ядерных белков. ФП ядерного сока обнаруживают известную тканевую специфичность — распределение метки на электрофореграммах БЯС печени и тимуса различно. ФП «свободных» БЯС в свою очередь существенно отличаются от ФП рибонуклеопротеидов.

В последней серии опытов показана способность всех исследовавшихся фракций ФП взаимодействовать как с нативной, так и с денатурированной ДНК. Способность ФП хроматина связываться с нативной ДНК была показана ранее в работе Тенга и соавт. [8]. Интересно, что и в составе ФП ядерного сока есть фракции, способные взаимодействовать с ДНК (табл. 2). Этот факт свидетельствует о том, что либо *in vivo* количество участков ДНК, доступных для взаимодействия, ограничено, либо в клетках есть механизмы, ограничивающие присоединение БЯС к ДНК. ФП ядерного сока, взаимодействующие с ДНК, не являются, по-видимому, примесью НГБ хроматина, так как количество ФП ядерного сока, связывающихся с нативной ДНК, немного меньше, а с денатурированной ДНК — даже больше, чем лабильно связанных НГБ.

В заключение следует сказать, что значение фосфорилирования ядерных белков в настоящее время остается неясным, однако изучение этого вопроса представляется весьма перспективным для понимания механизма регуляции процесса транскрипции в клетках высших организмов.

Экспериментальная часть

В работе использовали ядра, выделенные из клеток печени и тимуса крыс породы *Wistar* (150—170 г). Ядра и хроматин из печени и тимуса крыс выделяли, как описано ранее [15].

Фосфокиназная система. Фосфорилирование белков ядер или хроматина проводили по методу [11], как он описан в работе Риквуда и соавт. [10]. Ядра или хроматин (~1 мг ДНК) инкубировали 5, 15 или 30 мин при 37° в 0,25 М сахарозе, 0,1 М трис-НСI буфере (рН 8,0), 0,01 М MgCl₂, 0,025 М NaCl (за исключением случаев, оговоренных особо) и 0,02 мМ [γ — ³²P] АТФ (0,1 Ки/ммоль) в общем объеме 2 мл. После окончания инкубации смесь охлаждали и добавляли HClO₄ до 0,75 М. Осадок отделяли центрифугированием, липиды экстрагировали последовательно 5 мл этанола, содержащего 2% ацетата натрия и 5 мл смеси хлороформ — эфир — этанол (1 : 2 : 2). Осадок инкубировали в 1 мл 0,3 М HClO₄ 20 мин при 85° для гидролиза нуклеиновых кислот. Смесь охлаждали, увеличивали концентрацию HClO₄ до 0,75 М и объем до 2 мл и пропускали через мембранные фильтры. Для определения радиоактивности липидной и нуклеиновой фракций аликвоты из соответствующих экстрактов наносили на планшеты, высушивали и радиоактивность просчитывали на газопроточном счетчике. Как выяснилось в первых опытах, радиоактивность, экстрагируемая с липидной фракцией, составляет менее 0,5% от общей кислотонерастворимой радиоактивности. Несколько большая (~ 6—8%) величина радиоактивности обнаруживается во фракции нуклеиновых кислот, однако основная ее часть представлена, по-видимому, фосфором, отщепляющимся от белковых молекул при обработке горячей кислотой. Поэтому в последующих опытах после окончания инкубации смесь быстро охлаждали, добавляли HClO₄ до 0,75 М, осадок собирали на мембранные фильтры и промывали 25 мл 0,75 М HClO₄. На каждую точку ставили три параллельных инкубационных смеси.

Фракционирование ядерных белков. Проба общим объемом 10 мл содержала ядра клеток тимуса (~20 мг), 0,25 М сахарозу, 0,1 М трис-НСI буфер (рН 8,0), 0,01 М MgCl₂, 0,025 М NaCl и 0,075 мкМ [γ — ³²P] АТФ (16 Ки/ммоль). Смесь инкубировали 10 мин при 37°, быстро охлаждали и дважды отмывали средой инкубации (10 мл), содержащей немеченый АТФ в концентрации 2,5 мМ. Осадок ядер последовательно экстрагирова-

ли 10 мл 0,14 М NaCl — 0,01 М трис-HCl буфера (рН 7,5); 10 мл 0,075 М NaCl — 0,024 М EDTA (рН 8,0) и 10 мл 0,01 М трис-HCl буфера (рН 7,5). Экстракты объединяли. Суммарные БЯС центрифугировали 1 ч при 105 000 *g*. Надосадочная жидкость — «свободные» БЯС, осадок — рибонуклеопротеиды ядерного сока. Хроматин дополнительно отмывали 3 раза 50 мл 0,01 М трис-HCl буфером (рН 7,5). Лабильно связанные НГБ отделяли по методу Ванга [16] с дополнительной очисткой на амберлите CG-50, а прочно связанные НГБ и гистоны — хроматографией на гидроксипатите [17] с дополнительной очисткой на амберлите CG-50, как описано ранее [15]. «Свободные» БЯС и НГБ диализовали против 0,01 М трис-HCl буфера (рН 7,5) и хранили при —20°. Для определения удельной радиоактивности аликвоты растворов белков с известной концентрацией разбавляли до 3 мл, добавляли бычий сывороточный альбумин до 100 мкг/мл и трихлоруксусную кислоту до 10%. Осадок собирали на мембранные фильтры и промывали 20 мл 10%-ной трихлоруксусной кислоты. Аналогичным образом определяли радиоактивность белков, остающихся связанными с ДНК после отделения прочно связанных НГБ (ДНК элюировали с гидроксипатита 0,5 М натрий-фосфатным буфером (рН 7,0)).

Взаимодействие ФII с ДНК. ДНК выделяли из тимуса крыс, как описано ранее [15]. Полиакриламидно-агарозные колонки, содержащие нативную или денатурированную ДНК, готовили по методу Кавальери и Кэррола [18]. Содержание ДНК в 1 мл упаковочного геля составляло ≈ 200 мкг. Белки пропускали через колонки в 0,01 М трис-HCl буфере (рН 7,5), непрореагировавшие белки отмывали тем же буфером, а белки, связавшиеся с ДНК, последовательно элюировали 0,01 М трис-HCl буфером, содержащим 0,15 М NaCl, 0,6 М NaCl, 2 М NaCl и 2 М NaCl—5 М мочевины. К элюатам добавляли альбумин (100 мкг/мл) и трихлоруксусную кислоту до 10%, осадки собирали на мембранные фильтры и радиоактивность просчитывали на газопроточном счетчике.

Электрофорез в полиакриламидном геле. Рибонуклеопротеиды ядерного сока растворяли в 1%-ном додецилсульфате натрия — 1%-ном меркаптоэтаноле — 0,01 М трис-HCl буфере (рН 7,5) и диализовали ночь при 37° против 0,1%-ного додецилсульфата натрия — 0,1%-ного меркаптоэтанола — 0,01 М трис-HCl буфера (рН 7,5). К раствору суммарных БЯС добавляли додецилсульфат натрия и меркаптоэтанол до 1% и обрабатывали аналогичным образом. Для проведения электрофореза суммарных НГБ хроматина гистоны экстрагировали 0,4 н. H₂SO₄, а ДНК и НГБ растворяли в 1%-ном додецилсульфате натрия — 1%-ном меркаптоэтаноле — 0,01 М трис-HCl буфере (рН 7,5) и диализовали против 0,1%-ного додецилсульфата натрия — 0,1%-ного меркаптоэтанола — 0,01 М трис-HCl буфера (рН 7,5). Электрофорез белков в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия проводили по методу [19]. Образцы объемом 0,1—0,2 мл (100—200 мкг белка) наносили на колонку (длина нижнего 10%-ного геля — 6 см, концентрирующего 3%-ного геля — 0,6 см) диаметром 0,5 см. В качестве свидетеля добавляли бромфенол синий, электрофорез проводили до выхода красителя из геля. Фореграммы замораживали и разрезали на кусочки толщиной 1 или 2 мм. Радиоактивность просчитывали в толуоловом сцинтилляторе в жидкостном сцинтиляционном счетчике SL-30.

ЛИТЕРАТУРА

1. Kleinsmith L. J., Allfrey V. G., Mirsky A. E. (1966) *Science*, **154**, 780—781.
2. Langan T. A. (1967) in *Regulation of Nucleic Acid and Protein Biosynthesis* (ed. by V. V. Koningsberger, L. Bosch), Elsevier, Amsterdam, p. 233—242.
3. Ahmed K. (1971) *Biochim. et biophys. acta*, **243**, 38—48.
4. Kleinsmith L. J., Allfrey V. G., Mirsky A. E. (1966) *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, **55**, 1182—1189.
5. Kleinsmith L. J., Allfrey V. G. (1969) *Biochim. et biophys. acta*, **175**, 123—135.

6. Platz R. D., Hnilica L. S. (1973) *J. Cell Biol.*, **59**, 267a.
7. Turkington R. W., Riddle M. (1969) *J. Biol. Chem.*, **244**, 6040—6046.
8. Teng C. S., Teng C. T., Allfrey V. G. (1971) *J. Biol. Chem.*, **246**, 3597—3609.
9. McCarthy K. S., Jones R. F., McCarthy K. S. (1973) *J. Cell Biol.*, **59**, 205a.
10. Rickwood D., Riches P. G., McGillivray A. J. (1973) *Biochim. et biophys. acta*, **299**, 162—171.
11. Schiltz E., Sekeris C. E. (1969) *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **350**, 317.
12. Benjamin W. B., Goodman R. M. (1969) *Science*, **166**, 629—631.
13. Kamiyama M., Dastugue B. (1971) *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, **44**, 29—36.
14. Kish V. M., Kleinsmith L. J. (1972) *J. Cell Biol.*, **55**, 138a.
15. Уманский С. Р., Ковалев Ю. И. (1975) *Биоорган химия*, **1**, № 4, 463—468.
16. Wang T. Y. (1967) *J. Biol. Chem.*, **242**, 1220—1226.
17. McGillivray A. J., Cameron A., Krauze R. J., Rickwood D., Paul J. (1972) *Biochim. et biophys. acta*, **277**, 384—402.
18. Cavaliere L., Carrol E. (1970) *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, **67**, 807—811.
19. Laemmli U. K. (1970) *Nature*, **227**, 680—684.

Поступила в редакцию
3.IX.1974

SOME PROPERTIES OF NUCLEAR PHOSPHOPROTEINS

UMANSKY S. R., ZOTOVA R. N., KOVALEV Y. I.

*Institute of Biological Physics,
Academy of Sciences of the USSR, Pushchino*

The kinetics of *in vitro* phosphorylation of the rat liver and thymus nuclear proteins were studied. The phosphate incorporation into the nuclear and chromatin proteins of liver or thymus reaches a maximum within 5 or 15 minutes of incubation with [γ - 32 P] ATP, respectively. Dephosphorylation of the nuclear and chromatin proteins parallels phosphorylation. The phosphorylation occurs unequally with different fractions of nuclear proteins and decreases as follows: the labile bound chromatin nonhistone proteins, the firmly bound ones, the nuclear sap proteins, and histones. Considerable heterogeneity of all the nuclear phosphoproteins (PP) studied was revealed by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gel. The chromatin PP differ from the nuclear sap PP and both types interact with native as well as denatured DNA, greater amount of PP binding to the latter.