



УДК 577.152.361*3'13

СТРУКТУРНЫЙ АНАЛИЗ ИЗОФОРМ Na^+, K^+ -АТФ-азы МОЗГА ТЕЛЕНКА

© 1995 г. Н. М. Владимировича*, Н. А. Потапенко, Н. Н. Модянов

Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
117871, ГСП-7, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

Поступила в редакцию 20.07.94 г. После доработки 03.10.94 г.

Определены изоформный состав, тип функционирующих комплексов Na^+, K^+ -АТФ-азы в ряде мембран мозга теленка и константы ингибирования их убаином. Выявлена повышенная чувствительность к эндогенному протеолизу каталитической субъединицы $\alpha 3$ в составе нативного ферментного комплекса. Локализована точка специфического протеолиза в области полипептидной цепи, уникальной для всех изоформ типа $\alpha 3$: PNDNR⁴⁹²↓(Y⁴⁹³) (по нумерации $\alpha 3$ -субъединицы человека). Впервые показано, что во всех препаратах фермента, содержащих $\alpha 2$ - и $\alpha 3$ -изоформы, выделенных как по методу Йоргенсена, так и по методу Эсмана, присутствуют два других белка – $\beta 5$ -цепь тубулина и глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназа, биологический смысл ассоциации которых пока неясен.

Ключевые слова: Na^+, K^+ -АТФ-аза; изоформы; изоферменты.

С помощью биохимических, иммунохимических и генетических методов открыты семейства изоформ для обеих субъединиц Na^+, K^+ -АТФ-азы: каталитической α ($M \approx 100$ кДа), содержащей все известные в настоящее время функциональные домены, и гликопротеина β ($M \approx 50$ кДа, белковая часть – $M \approx 35$ кДа) (см. обзоры [1, 2]).

В настоящее время для каталитической субъединицы показано наличие трех изоформ ($\alpha 1, \alpha 2$ и $\alpha 3$), являющихся продуктами различных генов [3]. Распределение изоформ носит ткане- и клеточно-специфический характер и может быть очень сложным в клетках, плазматические мембраны которых организованы в домены с различной морфологией и функцией [4].

Семейство изоформ для гликозилированной субъединицы Na^+, K^+ -АТФ-азы представлено в настоящее время также тремя типами – $\beta 1, \beta 2$ и $\beta 3$ [3].

В результате открытия семейства генов, кодирующих различные изоформы субъединиц Na^+, K^+ -АТФ-азы, возникла проблема выделения функционально активных изоферментов и изучения их функциональных особенностей. Физиологическая ассоциация специфической β -изоформы со специфической α -изоформой была продемонстрирована лишь на нескольких примерах. Наиболее изучен ферментативный комплекс $\alpha 1\beta 1$, выделенный из почек [2, 3]. Именно на таком

ферменте были получены экспериментальные данные о топографии субъединиц, представление о локализации всех функционально важных доменов каталитической субъединицы [2, 3]. В ооцитах обнаружены только мРНК $\alpha 1$ и $\beta 3$, что предполагает присутствие гетеродимера $\alpha 1\beta 3$ [3], однако фермент соответствующего типа не выделен. Есть также косвенные доказательства, что гетеродимеры $\alpha 2\beta 2$ в глиальных клетках [5] и $\alpha 3\beta 2$ в фоторецепторных клетках [6] также физиологичны. И, наконец, неизвестно, продуцируются ли различные гетеродимеры в клетках одного вида. В мозге синтезируются все обнаруженные к настоящему времени изоформы каталитической и гликозилированной субъединиц [2, 7]. Na^+, K^+ -АТФ-аза находится в высоких концентрациях как в нейронах, где осуществляет сложный и тонкий контроль ионного окружения, важный для генерации нервного импульса, так и в глиальных клетках, которые участвуют в регулировании концентрации экстраклеточного калия, происходящем вслед за активацией нерва.

Целью данной работы являлись поиск и характеристика белковых продуктов экспрессии генов субъединиц Na^+, K^+ -АТФ-азы, определение их тканевого распределения, изучение изоформного и изоферментного состава Na^+, K^+ -АТФ-азы в тканях мозга, где присутствуют несколько изоформ; выяснение функциональных и структурных особенностей ферментов, содержащих в качестве каталитической субъединицы различные типы изоформ.

* Автор для переписки.

Сокращения: DIFP – диизопропилфторфосфат; CrA – карбоксипептидаза А; CrB – карбоксипептидаза В; PVDF-мембрана – поливинилпирролидонфторид-мембрана.

Необходимым этапом данного исследования являлась разработка методов выделения функционирующих комплексов Na^+, K^+ -АТФ-азы из мембран различных типов клеток мозга.

В качестве объектов исследования нами были выбраны серое вещество коры, содержащее клетки глии, и ствол мозга телянка, богатый миелинизированными аксонами. Ствол служил также исходным материалом для получения аксолеммы. Выделение и характеристика полученного микросомного материала подробно описаны в нашей предыдущей работе [8].

Несмотря на интенсивное использование различных детергентов при очистке, солюбилизации и реконструкции Na^+, K^+ -АТФ-азы [9, 10], пока еще мало проведено исследований, касающихся возможных причин и механизмов их влияния на функциональные свойства насоса. Оптимальные условия получения Na^+, K^+ -АТФ-азы из различных тканей, как правило, подбираются эмпирически. Критериями чистоты и целостности фермента чаще всего служат данные электрофоретического контроля и АТФ-азная активность. Однако, изучая чувствительность к катионам для одних и тех же изоформ высокоочищенных препаратов ферментов, различные авторы получили противоречивые результаты (см. обзор [11]). Оказалось, что сродство к катионам и другие характеристики изоформ *in vitro* зависят как от источника получения фермента, так и от протокола его очистки [11]. По-видимому, нельзя исключить влияние различий в липидном микроокружении и цитоскелетной структуре на функциональные свойства фермента.

Для выделения Na^+, K^+ -АТФ-азы из мозга телянка нами было решено использовать два принципиально различных методических подхода: а) селективное удаление примесных белков по методу Йоргенсена [12], где Na^+, K^+ -АТФ-аза остается мембраносвязанной; б) селективную солюбилизацию фермента с помощью детергента C_{12}E_8 с последующей реформацией мембранной структуры в присутствии ионов Mn^{2+} по методу Эсмана [13].

Метод Йоргенсена был основным при выделении Na^+, K^+ -АТФ-азы из почек животных. После обработки мембран с помощью SDS (в присутствии АТФ) и последующего зонального центрифугирования солюбилизированного материала были получены препараты фермента с наибольшими значениями специфической удельной АТФ-азной активности и степени очистки [12]. В нем на долю α -субъединицы приходится около 67 - 70% белка. Отсутствие примесных белков в ферменте было также показано при анализе пептидов, полученных в результате исчерпывающего гидролиза экспонированных доменов мембраносвязанного фермента: в гидролизате присутствовали пептиды только α - и β -субъединицы [14]. Метод

Йоргенсена был также успешно применен для выделения фермента из аксолеммы ствола мозга крысы. Препарат содержал в качестве каталитической субъединицы $\alpha+$ (по иммунохимическому анализу смесь $\alpha 2$ и $\alpha 3$), по активности он был сравним с ферментом, полученным из почек [15]. Однако, по данным электрофореза, даже в самом чистом образце фермента, выделенном из аксолеммы по методу Йоргенсена, в отличие от фермента, выделенного из почек, полоса с $M \approx 46$ кДа содержала β -субъединицу Na^+, K^+ -АТФ-азы (неохарактеризованную изоформу) и некий примесный белок близкой молекулярной массы [15], которые, к сожалению, не были идентифицированы. Успех выделения фермента по методу Йоргенсена из гомогената мембран мозга сильно зависел от АТФ-азной активности микросомного материала, способа его получения, а конечный изоформный состав Na^+, K^+ -АТФ-азы изменялся в зависимости не только от выбора способа получения микросомного материала, но и от объекта исследования [15]. Так, препарат фермента, выделенный из аксолеммы ствола мозга собаки, в отличие от аналогичного препарата, выделенного из мозга крысы, содержал наряду с $\alpha+$ - также $\alpha 1$ -изоформу.

Метод Эсмана [13] был предложен для очистки Na^+, K^+ -АТФ-аз из мембран пластинок электрических органов и ректальных желез колючей акулы *Squalus acathias*, где метод Йоргенсена оказался неприменим вследствие вызываемой SDS инактивации ферментов. После обогащения препаратов с помощью обработки мембран дезоксихолатом и специфической солюбилизации детергентом C_{12}E_8 фермент был осажден в мембранной форме с помощью двухвалентных ионов Ca^{2+} или Mn^{2+} .

Выделение ферментов из всех трех видов микросом было осуществлено нами двумя описанными выше методами. Подбор оптимальных условий обработки микросом детергентами и методология выделения ферментов подробно описаны в работе [8].

Как уже упоминалось выше, традиционно приемлемыми критериями очистки являются электрофоретическая чистота и специфичная удельная активность фермента. Электрофоретический анализ Na^+, K^+ -АТФ-азы из серого вещества показал, что фермент, выделенный двумя методами, имеет примерно одинаковую степень чистоты [8]. При сравнении электрофореграмм ферментов, выделенных нами по методу Йоргенсена из серого вещества мозга телянка и наружных медул почек свиньи (рис. 1, дорожки 1 и 5), видно, что β -субъединица серого вещества проявляла большую электрофоретическую подвижность по отношению к β -субъединице из почек свиньи, тогда как подвижность каталитических субъединиц обоих препаратов была одинакова.

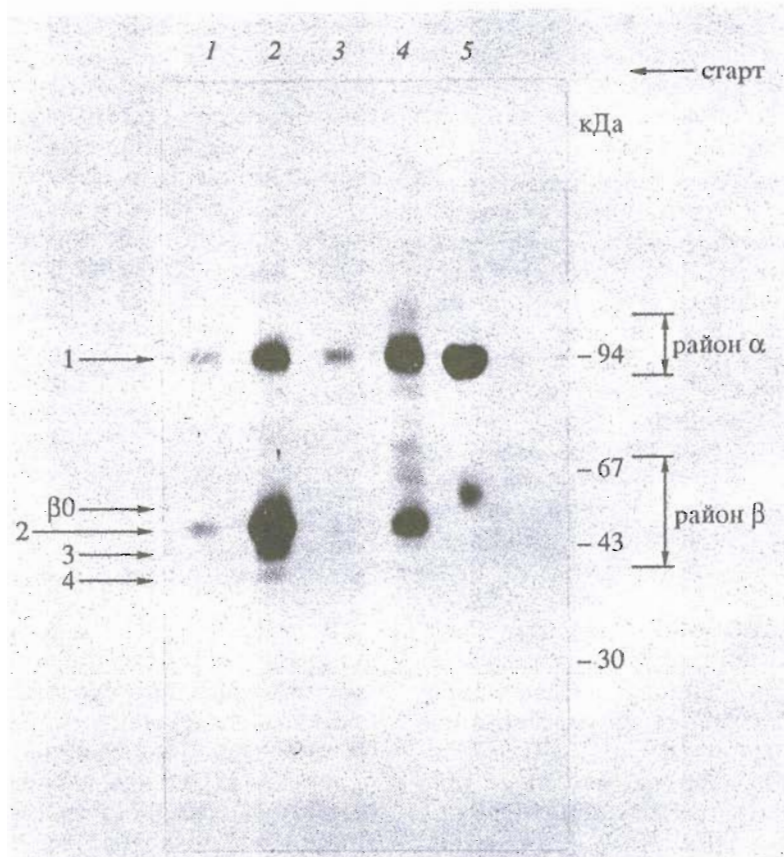


Рис. 1. Электрофореграммы ферментов: 1 – АТФ-аза серого вещества коры, обработанная DIFP; 2, 3 – АТФ-аза аксолеммы ствола до (2) и после (3) обработки DIFP; 4 – АТФ-аза ствола после обработки DIFP; 5 – контроль (АТФ-аза мозгового слоя почек свиньи, выделенная нами по методу Йоргенсена и описанная в работе [14]). Образец 1 выделен по методу Йоргенсена, образцы 2 - 4 выделены по методу Эсмана. Стрелками слева обозначены полосы геля, содержащие белки, подвергнутые последующему структурному анализу, описанному в тексте.

Интерпретация результатов электрофоретического анализа Na^+, K^+ -АТФ-азы из микросом ствола и его аксолеммы оказалась довольно сложной. Во-первых, у одного и того же препарата фермента электрофореграммы различались в зависимости от условий обработки образца и проведения электрофореза – увеличение рН буфера (7.2 → 9.3) и мягкая тепловая обработка (37°C, 10 - 15 мин) приводили к сильному возрастанию интенсивности полосы “района β -субъединицы”. Во-вторых, профиль электрофореграммы отличался от “классического”, где на долю α -субъединицы приходится ~65 - 70% белка [2], характерного, например, для фермента из почек (рис. 1, 5), даже если электрофорез проводили в более мягких условиях (при 15°C и рН 7.2), а образец наносился на гель без предварительной тепловой обработки – и в этом случае полоса в “районе β -субъединицы” была усилена. Увеличение количества гидролизующего АТФ в зависимости от увеличения времени инкубации с АТФ (5 - 30 мин) не носило линейный характер. Было сделано предположение, что причиной этих аномалий может быть протеолиз, проходящий в процессе рас-

творения образца в электрофорезном буфере и усиливающийся при тепловой обработке. Для проверки этого предположения к образцам ферментов был добавлен ингибитор протеиназ – DIFP. Действительно, его добавление сильно изменило электрофореграммы препаратов фермента, выделенных из мембран ствола и аксолеммы (ср., например, рис. 1, дорожки 2 и 3).

Для ферментов из серого вещества коры и наружных медул почек добавление ингибитора не изменяло картину (данные не приведены). Для ферментов из мембран ствола и аксолеммы наблюдалось усиление белковой полосы в “районе α -субъединицы”. Интенсивность полосы в “районе β -субъединицы” значительно уменьшалась. Мы предположили, что белок, подвергающийся протеолизу и имеющий подвижность, характерную для α -субъединицы Na^+, K^+ -АТФ-азы, может быть одной из ее изоформ. Это предположение было в дальнейшем подтверждено структурным анализом белковых компонентов ферментов (см. ниже). После введения DIFP АТФ-азная активность увеличивалась на 25 - 35%, а увеличение количества гидролизующего АТФ в зависимости

от времени инкубации с АТФ (5 - 30 мин) приобрело линейный характер. Описанные выше наблюдения привели нас к необходимости тщательного анализа белковых компонентов, входящих в состав полученных препаратов ферментов.

С этой целью был осуществлен градиентный электрофорез с последующим электроблоттингом на поливинилидендифторид (PVDF)-мембрану и структурным анализом. Для проведения первичного структурного анализа белковых компонентов ферментов оказался очень полезен электрофоретический анализ образцов, модифицированных дансилхлоридом. При этом становится возможен полуколичественный анализ белков на основании сравнения их N-концевых аминокислотных остатков, так как перенос дансильированных α - и β -субъединиц осуществлялся с помощью электроблоттинга на мембраны иммобилона примерно с одинаковой скоростью, что было важно для последующего соотнесения субъединиц α и β . Предварительно на ферменте из почек свиньи было показано, что электрофоретическая подвижность субъединиц при дансильировании не меняется, к тому же флуоресцентные белковые полосы менее диффузны, чем при окрашивании с помощью кумасси, что позволило четче идентифицировать близлежащие полосы.

На рис. 1 приведена электрофореграмма выделенных препаратов ферментов. Подвижность α -субъединицы Na^+, K^+ -АТФ-азы из аксолеммы ствола, выделенной по методу Эсмана (рис. 1, 2), несколько меньше подвижности α 1-субъединицы из почек свиньи (рис. 1, 2). В "районе β -субъединицы" видно несколько полос, верхняя из которых исчезает (или сильно уменьшается) после обработки DIFP (рис. 1, дорожки 2 и 3).

Для первичного структурного анализа фермента из аксолеммы после электроблоттинга дансильированных образцов на PVDF-мембрану вырезаны полосы иммобилона, содержащие белки ($M \sim 100$ кДа) (район α -субъединицы) и белок из "района β -субъединицы", концентрация которого зависела от предварительной обработки фермента DIFP (β 0) (рис. 1). Для препарата фермента из аксолеммы, не обработанного ингибитором протеиназ (рис. 1, 2), белки "района α -субъединицы" имели в качестве N-концевых остатков глицин и следовые количества метионина, а белок β 0 - метионин. Фермент, обработанный DIFP, при N-концевом анализе белковой полосы "района α -субъединицы" наряду с глицином содержал значительное количество метионина. На основании этого было сделано предположение, что белок, подвергающийся протеолизу, имеет в качестве N-концевой аминокислоты метионин, его подвижность совпадает с α -субъединицей и он может быть ее изоформой.

Для более точной идентификации близко расположенных друг к другу белковых полос был

также использован метод визуализации белков на мембране иммобилона без окрашивания, описанный Рейгом и Клейном [16] и широко примененный нами ранее при анализе изоформ Na^+, K^+ -АТФ-азы [8]. Полосы шириной 1 - 1.5 мм, соответствующие видимым на иммобилоне белковым полосам (см. "Экспер. часть" и работу [16]), совпадающим по подвижности с белками, детектируемыми методом дансильирования и окрашиванием раствором кумасси, были вырезаны и использованы для структурного анализа.

При этом для белка "района β -субъединицы" (β 0) была определена последовательность аминокислот MGDKK. Она полностью совпадает со структурой N-концевой области α 3-изоформы, выведенной на основании структурного анализа ее кДНК из мозга крысы [17, 18] и гена человека [19], и последовательностью α 3-изоформы, выделенной из почек свиньи [20].

В "районе α -субъединицы" (рис. 1, 2) препарата аксолеммы, не обработанного DIFP, был найден белок, имеющий последовательность GREYX*PAA, полностью совпадающую с последовательностью α 2-изоформы, выведенной из структуры кДНК человека [21], крысы [22], цыпленка [23], а также были обнаружены следовые количества белка с N-концевой последовательностью MGDKK-, принадлежащей изоформе α 3. Для препарата этого фермента после обработки DIFP в белковой полосе "района α -субъединицы" (рис. 1, 3) была определена двойная последовательность: MGDKKD- (α 3), GREYXP- (α 2) со значительным преобладанием первой. Нестабильность каталитической субъединицы α 3 наблюдалась нами в препаратах фермента, выделенных обоими методами. Эта повышенная чувствительность к действию эндогенных протеиназ могла быть одной из причин неудач с ее выделением. Этим же можно, по-видимому, объяснить и результаты Литтона [24], которому из аксолеммы ствола крысы удалось выделить и охарактеризовать лишь α 2-изоформу. Продукт протеолиза, N-концевой фрагмент α 3-изоформы с $M \approx 55$ кДа, проявляется на электрофореграмме в виде дискретной полосы (β 0).

Для локализации участка эндогенного протеолиза иммобилизованный на PVDF-мембране фрагмент (β 0) $M \approx 55$ кДа был подвергнут действию карбоксипептидаз. Причем эффективное отщепление C-концевых аминокислот оказалось возможным только после предварительной обработки полос иммобилона с помощью поливинилпирролидона (PVP-40), препятствующего, по-видимому, неспецифической сорбции карбоксипептидаз [25]. Отщепленные аминокислоты анализировали как в виде их фенолтиокарбамильных производных на аминокислотном анализаторе, так и в виде дансильных производных с помощью двумерной хроматографии на силикагельных

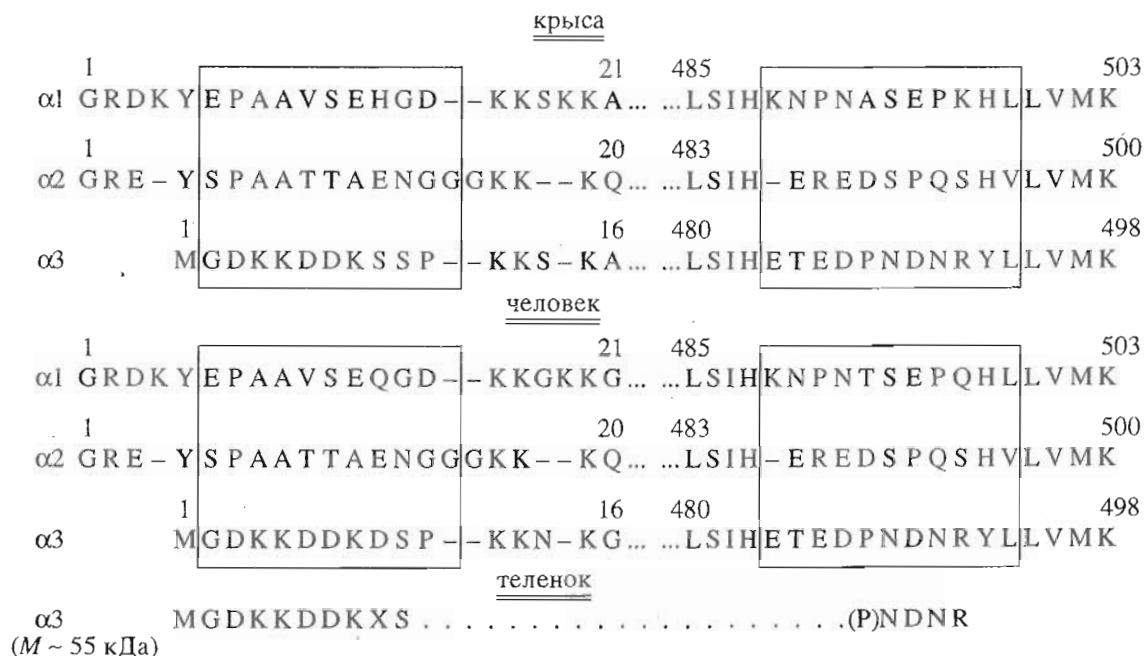


Рис. 2. Сравнительный анализ последовательностей изоформ каталитической субъединицы Na⁺,K⁺-АТФ-азы: α1 – крысы [22] и человека [27]; α2 – крысы [22] и человека [21]; α3 – крысы [22], человека [19] и теленка. В рамках приведены варибельные области изоформ α1, α2, α3.

пластинках. Хроматографический анализ отщепленных аминокислот в виде дансильных производных был широко использован в предварительных аналитических опытах, где тестировались различные карбоксипептидазы, их нагрузки и время гидролиза. Гидролиз карбоксипептидазами А и Y не приводил к заметному отщеплению какой-либо аминокислоты. Карбоксипептидаза В за 30 мин освобождала единственную аминокислоту – аргинин, ее количество в супернатанте увеличивалось с увеличением времени гидролиза от 30 мин до 1.5 ч. Кроме того, при продолжительности гидролиза более 1 ч в супернатанте была обнаружена вторая аминокислота – аспарагин. Более полное отщепление С-концевых аминокислот было достигнуто ступенчатым гидролизом с помощью карбоксипептидаз В и А (см. “Экспер. часть”). Следующие аминокислоты были найдены в виде фенилтиокарбамильных производных: Arg – 60 пмоль (СрВ, 30 мин); Arg – 85 - 90 пмоль, Asn – 15 пмоль (СрВ, 90 мин); Arg – 87 - 95 пмоль, Asn – 115 - 120 пмоль, Asp – 60 - 65 пмоль (СрВ – 90 мин, СрА – 60 мин) на 100 пмоль белка. Учитывая набор отщепленных аминокислот, кинетику их гидролиза, а также молекулярную массу N-концевого фрагмента (β0) α3-изоформы (~55 кДа), мы локализовали участок трипсиноподобного эндогенного протеолиза ее полипептидной цепи: -Pro-Asn-Asp-Asn-Arg⁴⁹² ↓ (Tyr⁴⁹³-Leu-Leu-Val-Met).

Эта область полипептидной цепи уникальна для α3-изоформ. С одной стороны, она высококонсервативна и характерна для α3-изоформ

весьма далеких видов (млекопитающих [19, 22], птиц [23] и земноводных [26]). С другой стороны, она соответствует одной из двух варибельных областей изоформ α1, α2 и α3, локализованной в центральной области белка [19, 21 - 23, 26, 27]. Другая, N-концевая варибельная область изоформ наиболее изучена в настоящее время. Установлено, что она важна для связывания ионов либо для зависимого от ионов конформационного изменения фермента [11, 28]. На рис. 2 приведен сравнительный анализ варибельных областей изоформ каталитической субъединицы Na⁺,K⁺-АТФ-азы млекопитающих. В варибельном участке, локализованном в центральной части молекулы изоформ α1, α2, аминокислотная последовательность, аналогичная участку эндогенного трипсиноподобного протеолиза α3-изоформы, отсутствует. В этом месте полипептидной цепи либо нет остатков основных аминокислот (как в случае α2-изоформы крысы и человека или α1-изоформы человека), либо содержится последовательность РК(Н), не гидролизуемая трипсином. Функциональное значение центрального варибельного района α3-изоформы, чрезвычайно чувствительного к эндогенному протеолизу, пока неясно.

В “районе β-субъединицы” фермента, выделенного из аксолеммы как по методу Эсмана (рис. 1, дорожка 3), так и по методу Йоргенсена (данные не приведены), были детектированы три белковые полосы (соответствующие полосам 2, 3, 4 на рис. 1).

Верхняя полоса, судя по данным секвенирования, содержала $\beta 5$ -цепь тубулина, имеющую молекулярную массу около 50 кДа [29]. В средней полосе обнаружены две N-концевые последовательности, одна из которых соответствовала $\beta 5$ -цепи тубулина, а другая была идентична N-концевой последовательности $\beta 1$ -субъединицы Na^+, K^+ -АТФ-азы, определенной для ряда млекопитающих [3]. Нижняя полоса содержала белок, N-концевая последовательность которого соответствовала структуре глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназы, молекулярная масса которой составляет ~36 кДа [30]. Так были просканированы N-концевые последовательности белков с молекулярной массой 36 - 100 кДа.

Таким образом, было найдено, что выделенный из аксолеммы препарат фермента содержит два типа каталитической субъединицы ($\alpha 2$ и $\alpha 3$) и один тип гликозилированной субъединицы ($\beta 1$). Можно сделать вывод, что основными функционирующими комплексами Na^+, K^+ -АТФ-азы в аксолемме ствола мозга телят являются изоферменты $\alpha 2\beta 1$ и $\alpha 3\beta 1$. Биологический смысл связи двух других белков, тубулина и глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназы, с изоферментами Na^+, K^+ -АТФ-азы пока оценить трудно. В препаратах ферментов "почечного типа" ($\alpha 1\beta 1$) эти белки не обнаружены. Присутствие их в ферментах АТФ-азы, выделенных из мембран нервных клеток, объясняется, по-видимому, их локализацией в непосредственной близости с Na^+, K^+ -АТФ-азой, и нельзя исключить, что они являются компонентами единого функционального домена нервных клеток.

Выделение ферментов из микросом серого вещества коры и ствола было осуществлено также двумя методами (данные не приведены). Чистота и удельная активность полученных препаратов были сопоставимы [8]. На электрофореграмме (рис. 1) приведены ферменты, выделенные из микросом серого вещества по методу Йоргенсена и из микросом ствола по методу Эсмана (дорожки 1 и 4 соответственно). При анализе белковых компонентов полученных ферментов была использована методология, описанная выше для Na^+, K^+ -АТФ-азы из аксолеммы.

В обоих случаях из мембран иммобилона вырезали одну полосу из "района α -субъединицы" и три полосы (2, 3, 4) из "района β -субъединицы". Для фермента, выделенного из серого вещества в "районе α -субъединицы", N-концевым анализом была детектирована смесь белков. В ней заметно преобладала изоформа $\alpha 1$, белок $\alpha 2$ присутствовал в меньшем, а $\alpha 3$ - в следовом количестве. При соотношении смесей производных аминокислот на каждом цикле деградации с последовательностью индивидуальных изоформ каталитической субъединицы были учтены как данные об N-концевой последовательности изоформ $\alpha 2$ и $\alpha 3$, оп-

ределенные нами в препарате фермента из аксолеммы:

$\alpha 2$: Gly-Arg-Glu-Tyr-X-Pro-Ala-Ala-Thr-Thr,

$\alpha 3$: Met-Gly-Asp-Lys-Lys-Asp-Asp-Lys-X-Ser,

так и литературные данные о строении всех трех изоформ для других видов животных [17 - 19, 22].

Как и в случае аксолеммы, анализ белков "района β -субъединицы" оказался довольно сложен. Правда, поскольку ранее был проведен анализ фермента из аксолеммы, последовательности $\beta 1$ -изоформы Na^+, K^+ -АТФ-азы, $\beta 5$ -цепи тубулина и глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназы из мозга телят были уже известны. В полосе 2 была детектирована двойная последовательность, причем основная принадлежала N-концевой последовательности $\beta 1$ -изоформы, а минорная - $\beta 5$ -цепи тубулина. В полосе 4 в следовых количествах детектирована индивидуальная N-концевая последовательность глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназы. При анализе белков полосы 3 найдено, что основным компонентом смеси является $\beta 1$ -изоформа, глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназа присутствует в минорном количестве. Однако на ряде циклов деградации были найдены фенилтиогидантоиновые производные аминокислот (в скобках номер цикла): Ile(2), Glu(5), Lys(7), Ser(8), Gln(11), Val(12), Val(13), не обнаруженные при структурном анализе белковых компонентов препарата фермента из аксолеммы и отличные от аминокислот N-концевого анализа $\beta 1$ -изоформы Na^+, K^+ -АТФ-азы, $\beta 5$ -цепи тубулина, глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназы и изоформ каталитической субъединицы. Найденные при анализе полосы 3 аминокислоты ложатся в последовательность $\beta 2$ -изоформы, выведенной из анализа структурного гена, проведенного в работах [5, 7], если считать N-концевым остатком валин. Так, было показано, что в сером веществе телят изоформа субъединицы $\beta 2$ присутствует в небольшом количестве и имеет N-концевую аминокислотную последовательность: VIXKEKKSXXQVV.

Принимая отношение $\alpha : \beta = 1 : 1$, можно предположить, что основной изофермент Na^+, K^+ -АТФ-азы в сером веществе коры - $\alpha 1\beta 1$, вероятно также присутствие $\alpha 2\beta 2$ и/или $\alpha 3\beta 2$, концентрация которых примерно одинакова и сопоставима с концентрацией тубулина и глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназы, что является еще одним доводом в пользу того, что эти белки, как и в случае аксолеммы, сопутствуют функциональным изоформам $\alpha 2$ и/или $\alpha 3$ Na^+, K^+ -АТФ-азы.

Пока неясно, присущи ли два последних изофермента клеткам глии или их появление обусловлено наличием небольшого загрязнения белым веществом коры препарата, использованного при выделении микросом. Нами было показано (данные не приведены), что белое вещество коры мозга телят содержит в основном смесь $\alpha 2$ и $\alpha 3$.

Результаты структурного анализа белковых фрагментов фермента из микросом ствола, выделенного обоими методами, показали, что в полосе "района α -субъединицы" содержались в значительных и сопоставимых количествах белки, последовательность которых соответствовала изоформам $\alpha 2$ и $\alpha 3$, и в следовом количестве белок, представляющий $\alpha 1$ -изоформу каталитической субъединицы. В "районе β -субъединицы" в сопоставимых количествах были идентифицированы $\beta 1$ -изоформа, тубулин и глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназа.

Основными функционирующими комплексами Na^+, K^+ -АТФ-азы в мембранах ствола, как и в случае аксолеммы, являются $\alpha 2\beta 1$ и $\alpha 3\beta 1$, но в ферменте из ствола было также показано присутствие небольшого количества $\alpha 1$ -изоформы каталитической субъединицы, функционирующей, по-видимому, в виде $\alpha 1\beta 1$ -комплекса.

Проведенный структурный анализ ферментов из мозга телят позволил не только установить N-концевые последовательности изоформ $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\beta 1$, $\beta 2$ АТФ-азы телят, но и впервые оценить изоформный состав и тип функционирующих комплексов $\alpha n\beta m$ для отделов мозга, содержащих различные типы клеток. Na^+, K^+ -АТФ-аза из микросом серого вещества коры представляет собой набор изоферментов $\alpha 1\beta 1$, $\alpha 2\beta m$, $\alpha 3\beta m$ (где $m = 1$ и/или 2) с явным преобладанием $\alpha 1\beta 1$ -комплекса. Na^+, K^+ -АТФ-аза из микросом ствола и аксолеммы ствола состоит в основном из смеси изоферментов $\alpha 2\beta 1$ и $\alpha 3\beta 1$ с преобладанием в аксолемме формы $\alpha 3\beta 1$.

Было показано также, что в препаратах фермента из мозга, содержащих изоформы $\alpha 2$ и $\alpha 3$, присутствуют два других белка – $\beta 5$ -цепь тубулина и глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназа.

Был проведен сравнительный анализ ингибирования препаратов Na^+, K^+ -АТФ-азы, имеющих различный изоферментный состав. Как видно из рис. 3, фермент из серого вещества, содержащий все три изоформы каталитической субъединицы, имеет бифазную кинетику ингибирования убаином с $K_i \sim 10^{-6}$ М и 1.5×10^{-8} М. Na^+, K^+ -АТФ-аза из аксолеммы, содержащая изоформы $\alpha 2$ и $\alpha 3$ каталитической субъединицы, имеет монофазную кинетику ингибирования с $K_i \sim 10^{-7}$ М.

Таким образом, для мозга телят, как и для мозга крысы, характерна большая чувствительность к убаину изоформ $\alpha 2$ и $\alpha 3$, чем $\alpha 1$, несмотря на то что в отличие от крысы телят относится к видам животных, имеющих высокочувствительную форму $\alpha 1$.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали: поливинилпирролидон-40 (Sigma, США); мембраны иммобилона (PVDF-мембраны) с диаметром пор 0.45 мкм (Mil-

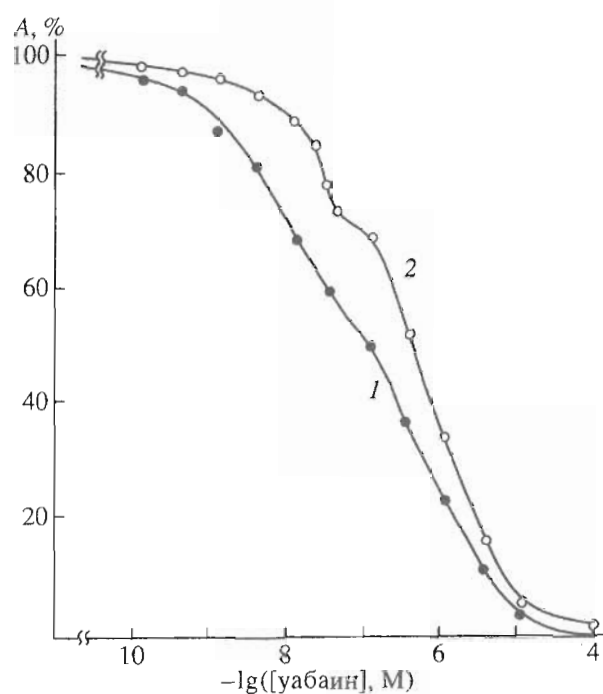


Рис. 3. Ингибирование убаином Na^+, K^+ -АТФ-азы из аксолеммы ствола (1) и серого вещества коры (2) мозга телят, выделенных по методу Эсмана и методу Йоргенсена соответственно. АТФ-азная реакция была выполнена при разных концентрациях убаина как описано в "Экспер. части".

lipore, США); карбоксипептидазу А из поджелудочной железы быка (активность 55 ед./мг белка), карбоксипептидазу В из поджелудочной железы свиньи (активность 460 ед./мг белка), додециловый эфир октаэтиленгликоля (C_{12}E_8) (Calbiochem, США); 5-диметиламинонафталин-1-сульфонилхлорид (Dns-Cl) (Fluka, Швейцария); реагенты для электрофореза (Bio-Rad, США); SDS фирмы Bio-Rad был дважды перекристаллизован из 95% метанола; АТФ (Reanal, Венгрия). Остальные реактивы отечественного производства квалификации х. ч. или ос. ч.

Получение микросом. Для выделения использовали свежий мозг телят. Получение мембран серого вещества, ствола и аксолеммы проводили по методике, описанной в работе [8]. Концентрацию белка определяли по методу Лоури с использованием в качестве стандарта бычьего сывороточного альбумина [31].

Выделение ферментов. Выделение Na^+, K^+ -АТФ-азы из всех трех видов микросом проводили как по модифицированному методу Йоргенсена (метод 1) [12], заключающемуся в обработке мембран смесью SDS, АТФ с последующим центрифугированием в ступенчатом градиенте плотности глицерина, так и осаждением по методу Эсмана [13] мембраносвязанной формы фермента после предварительной селективной солиubilизации

его с помощью $C_{12}E_8$ (метод 2). Оба метода подробно описаны в работе [8].

Дансирование белковых препаратов и их анализ. Образец белка (100 мкг) осаждали 80% метанолом ($-20^{\circ}C$, 2 ч). Осадок суспендировали в 50 мкл 0.0625 М трис-НСl-буфера, рН 6.8, содержащего 2% SDS, титровали до рН 9.0 с помощью 1 М раствора трис и увеличивали концентрацию SDS до 5%. К полученному раствору добавляли 1/15 часть (по объему) 10% раствора дансилхлорида (Dns-Cl) в ацетоне. Реакционную смесь инкубировали 45 мин при $45^{\circ}C$, затем отбирали аликвоту для N-концевого анализа, а к остатку добавляли 1/15 часть (по объему) β -меркаптоэтанола, выдерживали еще 15 мин при той же температуре и использовали для электрофоретического анализа (см. ниже). Для определения N-концевого аминокислотного остатка к аликвоте образца добавляли трихлоруксусную кислоту до концентрации 10%, выдерживали при $4^{\circ}C$ 4 - 6 ч, центрифугировали, к осадку добавляли 5.7 н. НСl и проводили гидролиз при $45^{\circ}C$ в течение 14 - 16 ч. Идентификацию дансильных производных аминокислот проводили микротонкослойной хроматографией на силикагеле, как описано в работе [32].

Электрофорез и электроблоттинг. Электрофорез выполняли по методу Вебера и Осборн [33], как описано в работе [8]. Образцы готовили по методике [8]: а) перед добавлением раствора, содержащего SDS и β -меркаптоэтанол, вводили 3 мМ DIFP и 1 мМ EDTA; б) образец выдерживали 15 мин при комнатной температуре. Для тестирования белковых полос использовали как окрашивание контрольных полос гелей раствором кумасси G-250 в 12.5% трихлоруксусной кислоте, так и флуоресценцию Dns-образцов в ультрафиолете при λ 366 нм. Часть геля, соответствующую белковым зонам, вырезали и осуществляли электроблоттинг на PVDF-мембрану в 0.025 М натрий-бикарбонатном буферном растворе (рН 9.0), содержащем 0.1% SDS и 20% метанола (2.5 ч, сила тока 400 мА). Мембрану промывали метанолом, несколько раз трижды перегнанной водой, 30% метанолом и высушивали на воздухе. Для детекции белковых полос был также использован метод визуализации белков на мембране иммобилона без окрашивания, описанный Рейгом и Клейном [16] и широко примененный нами ранее при анализе изоформ Na^+, K^+ -АТФ-азы [8]. Было обнаружено, что белковые полосы высыхают более медленно, когда мембрана иммобилона высушивается на воздухе после промывки 20 - 30% метанолом. Влажные полосы становятся видимыми невооруженным глазом в отраженном дневном свете или как более темные по сравнению с фоном в УФ-свете. Эти полосы исчезают при полном высушивании мембраны, но могут быть снова видимыми в любое время после смачивания ее в 20 - 30% метаноле и неполном высушивании.

Белковые полосы на мембране детектировали либо по окрашиванию части мембран раствором кумасси, либо по флуоресценции Dns-образцов, либо визуально в процессе сушки мембраны.

Вырезанные неокрашенные полосы мембраны использовали непосредственно для секвенирования по методике [34] или для гидролиза C-концевых аминокислот карбоксипептидазами. Полосы мембран, содержащие дансильные производные белков, обрабатывали 5.7 н. НСl по описанной выше методике. Идентификацию Dns-аминокислот проводили микротонкослойной хроматографией на силикагеле, как описано в работе [32].

Гидролиз C-концевых аминокислот иммобилизованного на мембране белка осуществлен ступенчато с помощью карбоксипептидаз А и В (СрА и СрВ): Для предотвращения неспецифической адсорбции карбоксипептидаз мембрану иммобилона обрабатывали поливинилпирролидоном (PVP-40). Полоски иммобилона разрезали на мелкие кусочки и смачивали 20 мкл метанола. Избыток метанола удаляли капиллярной пипеткой. Мембраны инкубировали в 100 мкл 0.5% PVP-40, растворенного в 100 мМ уксусной кислоте, в течение 30 мин при $37^{\circ}C$. Избыток PVP-40 удаляли пятикратной промывкой трижды перегнанной водой и двукратной промывкой 0.1 М NH_4HCO_3 , рН 7.5. Затем добавляли 0.5 мкг карбоксипептидазы В, растворенной в 200 мкл 0.1 М NH_4HCO_3 , рН 7.5. После 30 мин инкубации при $37^{\circ}C$ был добавлен 1 мкг карбоксипептидазы А в 5 мкл того же буфера. После инкубирования смеси в течение 60 мин при $37^{\circ}C$ супернатант отделяли. Мембрану последовательно промыли 100-мкл порциями 0.1 М NH_4HCO_3 (рН 7.5), трижды перегнанной воды и метанола. Отмывки объединяли с супернатантом, дважды упаривали с водой. Отщепленные аминокислоты анализировали как в виде их фенилтиокарбамильных производных на аминокислотном анализаторе Millipore-Waters 680 (США) с использованием колонки (3.9×150 мм) Pico-Tag (Pico-Tag manual), так и в виде дансильных производных с помощью двумерной хроматографии на силикагельных пластинках (6×6 см), как описано в работе [32]. Пятна Dns-аминокислот детектировали с помощью УФ-лампы при длине волны 366 нм, а идентификацию проводили сравнением их подвижности с маркерной смесью Dns-аминокислот.

Измерение АТФ-азной активности и чувствительности к убаину. АТФ-азную активность фермента определяли в буфере, содержащем 140 мМ NaCl, 14 мМ KCl, 5 мМ $MgCl_2$, 0.5 мМ EDTA, 50 мМ имидазол-НСl (рН 7.5), в присутствии различных концентраций убаина. Инкубацию с убаином проводили в течение 15 мин при $37^{\circ}C$. В случае необходимости предварительно вводили 3 мМ DIFP. Реакцию с АТФ осуществляли при $37^{\circ}C$ в течение 5 - 15 мин.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Broude N.E., Modyanov N.N., Monastyrskaya G.S., Sverdlov E.D. // FEBS Lett. 1989. V. 257. № 1. P. 1 - 9.
2. Sweadner K.J. // Biochim. et biophys. acta. 1989. V. 988. P. 185 - 220.
3. Horisberger J.-D. // The Na,K-ATPase: Structure-Function Relationship. Austin, USA: R.G. Landes Company, 1994. P. 1 - 130.
4. Rodriguez-Boulan E., Nelson W.J. // Science. 1989. V. 245. P. 718 - 725.
5. Gloor S., Antonicek H., Sweadner K.J., Pagliusi S., Frank R., Moos M., Schachner M. // J. Cell. Biol. 1990. V. 110. P. 165 - 174.
6. Schneider B.G., Shyjan A.W., Levenson R. // J. Histochem. Cytochem. 1991. V. 39. P. 507 - 517.
7. Martin-Vasallo P., Dackowski W., Emanuel J.R., Levenson R. // J. Biol. Chem. 1989. V. 264. P. 4613 - 4618.
8. Владимирова (Арзамазова) Н.М., Потапенко Н.А., Левина Н.Б., Модянов Н.Н. // Биол. мембраны. 1990. Т. 7. № 12. С. 1256 - 1269.
9. Brotherus J.B., Jost P.C., Griffith O.H., Hokin L.E. // Biochemistry. 1979. V. 18. № 23. P. 5043 - 5050.
10. Jorgensen P.L., Skou J.C. // Biochim. et biophys. acta. 1971. V. 233. P. 366 - 380.
11. Vasilets L.A., Schwarz W. // Biochim. et biophys. acta. 1993. V. 1154. P. 201 - 222.
12. Jorgensen P.L. // Biochim. et biophys. acta. 1974. V. 356. P. 36 - 52.
13. Esmann M. // Biochim. et biophys. acta. 1988. V. 940. P. 71 - 76.
14. Ovchinnikov Yu.A., Arzamazova N.M., Arystarkhova E.A., Gevondyan N.M., Aidanova N.A., Modyanov N.N. // FEBS Lett. 1987. V. 217. № 2. P. 269 - 274.
15. Sweadner K.J. // Meth. Enzymol. 1988. V. 156. P. 65 - 71.
16. Reig J., Klein D.C. // Appl. and Theor. Electrophor. 1988. V. 1. P. 59.
17. Hara Y., Urayama O., Kawakami K., Nojima H., Nagamine H., Kojima T., Ohta T., Nagano K., Nakao M. // J. Biochem. 1987. V. 102. P. 43 - 58.
18. Herrera V.L.M., Emanuel J.R., Ruiz-Opazo N., Levenson R., Nadal-Ginard B. // J. Cell Biol. 1987. V. 105. P. 1855 - 1865.
19. Ovchinnikov Yu.A., Monastyrskaya G.S., Broude N.E., Ushkaryov Yu.A., Melkov A.M., Smirnov Yu.V., Malyshev I.V., Allikmets R.V., Kostina M.B., Dulubova I.E., Kiyatkin N.I., Grishin A.V., Modyanov N.N., Sverdlov E.D. // FEBS Lett. 1988. V. 233. P. 87 - 94.
20. Arystarkhova E.A., Lakhtina O.E., Levina N.B., Modyanov N.N. // FEBS Lett. 1989. V. 257. № 1. P. 24 - 26.
21. Shull M.M., Pugh D.G., Lingrel J.B. // J. Biol. Chem. 1989. V. 264. № 29. P. 17532 - 17543.
22. Shull G.E., Greeb J., Lingrel J.B. // Biochemistry. 1986. V. 25. P. 8125 - 8132.
23. Takeyasu K., Lemas V., Fambrough D.M. // Amer. J. Physiol. 1990. V. 259. C619 - C630.
24. Lytton J. // Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1985. V. 132. № 2. P. 764 - 769.
25. Zvaritch E., James P., Vorherr T., Falchetto R., Modyanov N., Carafoli E. // Biochemistry. 1990. V. 29. P. 8070 - 8076.
26. Verre F., Kairouz P., Schaerer E., Fuentes P., Geering K., Rossier B.C., Kraehenbuhl J.-P. // Amer. J. Physiol. 1989. V. 256. F1034 - F1043.
27. Kawakami K., Ohta T., Nojima H., Nagano K. // J. Biochem. 1986. V. 100. № 2. P. 389 - 397.
28. Jorgensen P.L., Collins J.H. // Biochim. et biophys. acta. 1986. V. 860. P. 570 - 576.
29. Wang D., Villasante A., Lewis S.A., Cowan N.J. // J. Cell Biol. 1986. V. 103. P. 1903 - 1910.
30. Kulbe K.D., Kenneth W., Tang J. // Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1975. V. 67. P. 35 - 42.
31. Lowry O.H., Rosenbrough N.Y., Farr A.H., Randall R.J. // J. Biol. Chem. 1951. V. 193. P. 265 - 275.
32. Белецкий Б.Г., Ганкина Е.С., Нестеров В.В. // Докл. АН СССР, 1967. Т. 172. С. 91 - 93.
33. Weber W., Osborn M. // J. Biol. Chem. 1969. V. 244. № 16. P. 4406 - 4412.
34. Левина Н.Б., Слепак В.З., Киселев О.Г., Шемякин В.В., Хохлачев А.А. // Биоорган. химия. 1989. Т. 15. № 1. С. 24 - 31.

Structural Analysis of Na⁺,K⁺-ATPase Isoforms in Calf Brain

N. M. Vladimirova*, N. A. Potapenko, and N. N. Modyanov

Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,
ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, 117871 Russia

Abstract — The isoform composition and types of functioning of Na⁺,K⁺-ATPase complexes, as well as their ouabain-inhibition constants, were studied for calf brain membranes. The catalytic subunit $\alpha 3$ within the native enzyme complex was found to exhibit an increased sensitivity to endogenous proteolysis. The site of specific proteolysis was localized in the region of the polypeptide chain that is unique for all $\alpha 3$ type isoforms: PNDNR⁴⁹²↓(Y⁴⁹³) (according to the nomenclature of human $\alpha 3$ -subunit). It was shown for the first time that in all enzyme preparations containing the $\alpha 2$ and $\alpha 3$ isoforms isolated by both Jorgensen's and Esmann's method two other proteins were present: the $\beta 5$ chain of tubulin and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; the biological meaning of their association is still unclear.

Key words: Na⁺,K⁺-ATPase, isoforms, isoenzymes.

* To whom correspondence should be addressed.