



УДК 577.152.361*3713

СТРУКТУРНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ИЗОФЕРМЕНТОВ Na⁺,K⁺-АТФ-АЗЫ МОЗГА ТЕЛЕНКА

© 2003 г. Н. М. Владимирова[#], Е. Н. Сауткина,

Т. И. Муравьева, Т. В. Овчинникова, Н. А. Потапенко

Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
117997 ГСП, В-437, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

Поступила в редакцию 21.12.2001 г. Принята к печати 04.02.2002 г.

Получены функционально активные препараты изоферментов Na⁺,K⁺-АТФ-азы из мозга теленка, содержащие каталитические субъединицы трех типов ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$), с использованием двух методов: селективного удаления примесных белков по методу Йоргенсена (Jorgensen, 1974) и селективной солюбилизации фермента с последующей реконструкцией мембранной структуры по методу Эсмана (Esmann, 1988). Определены константы ингибирования полученных изоферментов оуабаином. Оценен реальный изоферментный состав Na⁺-насоса для серого вещества, содержащего клетки глии. и ствола мозга, содержащего нейроны. Показано, что плазматические мембраны клеток глии содержат в основном Na⁺,K⁺-АТФ-азу $\alpha 1\beta 1$ -типа и минорное количество изоферментов $\alpha 2\beta 2$ ($\beta 1$)- и $\alpha 3\beta 1$ ($\beta 2$)-типа, а аксолема – изоферменты $\alpha 2\beta 1$ - и $\alpha 3\beta 1$ -типа. На основании результатов углеводного анализа обнаружено, что препараты ферментов $\alpha 1\beta 1$ -типа, выделенные из серого вещества мозга, имеют существенные различия по сравнению с ферментом такого же состава из почек в характере гликозилирования $\beta 1$ -изоформы. Выявлена повышенная чувствительность к эндогенному протеолизу каталитической субъединицы $\alpha 3$ Na⁺,K⁺-АТФ-азы нейронов. Локализована точка специфического протеолиза в аминокислотной последовательности, соответствующей одной из зон наибольшей варируемости для субъединиц $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$, но характерной для $\alpha 3$ -изоформ различных видов: PNDNR⁴⁹² ↓ Y⁴⁹³ (по нумерации $\alpha 3$ -субъединицы человека). Впервые показано присутствие $\beta 3$ -изоформы тубулина (белка цитоскелета) в высокомолекулярном комплексе $\alpha 3\beta 1$ -изофермента Na⁺,K⁺-АТФ-азы, выделенном из аксолеммы нейронов ствола мозга, и его связь с каталитической субъединицей $\alpha 3$.

Ключевые слова: Na⁺,K⁺-АТФ-аза; изоформы; изоферменты; аксолема; тубулин; гликозилирование; протеолиз.

ВВЕДЕНИЕ

Na⁺-насос – транспортная Na⁺K⁺-АТФ-аза плазматической мембраны (КФ 3.6.1.37) поддерживает низкие концентрации ионов Na⁺ и высокие – K⁺ в цитоплазме практически всех животных клеток. Она представляет собой гетеродимер субъединиц двух типов: α и β . α -Субъединица – каталитическая, содержит участки связывания катионов и специфического ингибитора – оуабаина. Гликозилированная β -субъединица важна для внутриклеточного транспорта α -субъединицы к плазматической мембране, защиты α -субъединицы от эндогенного протеолиза и правильного встраивания фермента в плазматическую мембрану [1, 2].

В настоящее время для α -субъединицы показано существование четырех изоформ ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$

и $\alpha 4$) и для β -субъединицы трех изоформ ($\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$), являющихся продуктами разных генов [2–4]. Возникло новое представление о строении Na⁺-насоса, согласно которому он включает в себя не только хорошо описанный гетеродимер $\alpha 1\beta 1$ (“почечный тип”), но и представляет собой семейство двенадцати потенциально возможных типов изоферментов различного $\alpha\beta$ -гетеродимерного состава. Ситуация с количеством изоферментов может быть значительно усложнена рядом факторов. Во-первых, молекулярная гетерогенность β -субъединицы может быть обусловлена не только экспрессией структурных изоформ ($\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$), но также различием в характере их гликозилирования [5, 6]. Во-вторых, показано, что в ряде тканей с Na⁺,K⁺-АТФ-азным комплексом ассоциирует третья субъединица (γ), структура которой родственна трансмембранным белкам I-типа, осуществляющим ионный транспорт, таким, как фосфолеманн, каналдицирующий фактор (CHIF) и Mat-8 (Mammary tumor associated protein) [2, 4]. Для γ -субъединицы также показано существова-

Сокращения: DFP – диизопропилфторфосфат; C₁₂E₈ – додециловый эфир октаэтиленгликоля; срА, срВ, срУ – карбоксипептидазы А, В, У; PVP-40 – поливинилпирролидон-40.

[#] Автор для переписки (эл. почта: vla@mail.ibch.ru; тел.: (095) 330-66-47).

ние нескольких изоформ [2]. Однако принадлежность этой субъединицы к Na^+ -насосу и ее роль для функционирования насоса точно не доказана и широко дискутируется сейчас в литературе.

$\alpha 1$ -Изоформа каталитической субъединицы наиболее изучена, определена ее структура для большого числа видов животных. Она экспрессируется практически во всех тканях, ей приписывают функцию регуляции содержания цитозольного Na^+ и называют изоформой – “домоправительницей”. Именно на ферменте $\alpha 1\beta 1$ -типа получен практически весь объем данных о топографии и функциональных доменах фермента. Строение изоформ $\alpha 2$ и $\alpha 3$ известно для небольшого числа объектов, распределение этих изоформ более тканеспецифично. $\alpha 4$ -Изоформа выделена пока из единственного источника (семенников крысы), хотя небольшое ее количество детектировано также в мозге [4], данные же о функциональных свойствах этой изоформы практически отсутствуют.

Несмотря на то что три изоформы каталитической субъединицы ($\alpha 1$, $\alpha 2$ и $\alpha 3$) имеют большую структурную гомологию (>94%), спектр их функциональных различий весьма широк. Так, они по-разному ингибируются кардиотоническими стероидами как растительного происхождения (например, оубаином) [3, 7, 8], так и эндогенными дигиталисподобными соединениями [4, 9]; для них характерны существенные различия в антагонизме между K^+ и оубаином при физиологических значениях концентрации K^+ [4, 7]. Изоформы различаются сродством к АТФ, Na^+ , чувствительностью к ингибированию ионами Ca^{2+} , устойчивостью к действию оксидантов, радикалов, эндогенных протеиназ, а также механизмами регуляции их биосинтеза и клеточной активности [9]. Причина таких глубоких различий неясна, литературные сведения противоречивы, а данные о функциональных свойствах изоформ, как правило, получены не для выделенных изоферментов, а анализом либо микросом, содержащих эти изоформы, либо продуктов экспрессии соответствующих генов субъединиц. Анализ литературных данных показал, что широкий спектр функциональных различий изоформ может быть обусловлен не только тонкими различиями в их первичной структуре; большое влияние может оказывать также липидное окружение [2, 4], углеводная компонента β -субъединицы [6], способность к взаимодействию с мембранными и цитоплазматическими белками [2, 4, 10]. Поэтому система, в которой тестируются свойства изоформ субъединиц и изоферментов, должна быть максимально приближена к существующей *in vivo*.

В настоящее время стало ясно, что регуляция Na^+ -насоса включает факторы, влияющие как на функционирование самого фермента, так и на его пространственное распределение в клеточной мем-

бране. В поляризованном эпителии Na^+, K^+ -АТФ-аза распределена в основном в базолатеральной мембране [11], и это распределение осуществляется за счет взаимодействия с белками цитоскелета (актином, фодрином и анкирином) [12–14]. Существование нескольких изоформ для каждой субъединицы Na^+ -насоса значительно усложняет анализ его пространственного распределения в мембране. На повестку дня встает новый вопрос: изучение механизма распределения изоформ.

Наименее понятно функционирование Na^+, K^+ -АТФ-азы в клетках мозга, где Na^+ -насос наряду с традиционными функциями участвует в межклеточном взаимодействии нейрональных и глиальных клеток [15], в связывании с белками цитоскелета [6, 16], где экспрессируются все известные сегодня изоформы обеих субъединиц Na^+, K^+ -АТФ-азы и где клеточная геометрия имеет фундаментальное значение для функционирования многих белков.

Цель данной работы – выделение и характеристика изоферментов Na^+, K^+ -АТФ-азы, реально функционирующих в различных клетках мозга, выяснение их структурных особенностей.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Обнаружение в мозге всех известных изоформ вызвало ряд важных вопросов: какие типы изоферментов Na^+ -насоса действительно функционируют в клетках мозга, каковы их свойства, продуцируются ли различные гетеродимеры в клетках одного вида, какой тип гетеродимера выполняет адгезионную функцию в нервной системе, существуют ли специфические особенности, характерные для изоферментов мозга, отличающие их от изоферментов такого же гетеродимерного типа из других тканей.

Сложность ответа на эти вопросы обусловлена прежде всего тем, что выделены и хорошо охарактеризованы только ферменты $\alpha 1\beta 1$ -“почечного” типа [1, 2]. Изоферменты из мозга выделены не были, а данные о свойствах изоформ получены не путем исследования выделенных изоферментов, а анализом либо микросом, содержащих эти изоформы, либо продуктов экспрессии соответствующих генов, где, как правило, отсутствует нативное липидное и белковое окружение, а также углеводная компонента β -субъединицы. Поэтому первый этап исследования состоял в разработке методов для выделения функционально активных изоферментов.

В качестве объектов нами были выбраны серое вещество коры мозга теленка, содержащее клетки глии, и ствол, богатый миелинизированными аксонами. Ствол также служил исходным материалом для получения аксолеммы – плазматической мембраны миелинизированных аксо-

нов. Получение и характеристика микросомного материала подробно описаны в нашей работе [17].

Для выделения Na^+, K^+ -АТФ-азы используют в основном два разных методических подхода: а) селективное удаление примесных белков с помощью ионного детергента додецилсульфата натрия (в присутствии АТФ) по методу Йоргенсена [18], при котором Na^+, K^+ -АТФ-аза остается мембраносвязанной, в нативном липидном окружении и функционально активной; б) селективную сольubilизацию Na^+, K^+ -АТФ-азы с помощью неионного детергента C_{12}E_8 (додецилового эфира октаэтиленгликоля) с последующей реконструкцией мембранной структуры в присутствии ионов Ca^{2+} или Mn^{2+} [19]. Этот детергент позволяет сохранять в значительной степени межбелковые контакты и поэтому ранее часто использовался для изучения субъединичной структуры многих мембранных белков и их взаимодействия с внешними белковыми структурами.

Метод Йоргенсена был основным при выделении Na^+, K^+ -АТФ-азы из почек различных видов животных: кролика, собаки, овцы [20], свиньи [20, 21], теленка [10], солевых желез утки [22], содержащих изоферменты $\alpha 1\beta 1$ -типа. В этих препаратах на долю α -субъединицы приходится около 67–70% белка. Отсутствие примесных белков в ферменте было также показано нами при анализе пептидов, полученных в результате исчерпывающего гидролиза экспонированных доменов мембраносвязанного фермента из почек свиньи: в гидролизате присутствовали пептиды только $\alpha 1$ - и $\beta 1$ -субъединиц Na^+, K^+ -АТФ-азы [21]. Однако при выделении этим методом изоферментов, содержащих другие типы изоформ каталитической субъединицы, многие ученые столкнулись с рядом трудностей. Так, из аксолеммы ствола мозга крысы по методу Йоргенсена выделен препарат Na^+, K^+ -АТФ-азы (в соответствии с данными иммунохимического анализа содержащий смесь $\alpha 2$ - и $\alpha 3$ -изоформ), по активности сопоставимый с ферментами, полученными из почек [23]. Однако, по данным электрофореза, даже в самом чистом образце такого фермента при окрашивании гелей раствором Кумасси в зоне белков с $M \sim 50$ кДа, в отличие от препарата из почек, помимо α - и β -субъединиц был выявлен примесный белок молекулярной массы, близкой к β -субъединице, который не был идентифицирован.

Успех выделения фермента был связан с АТФ-азной активностью микросомного материала, способом его получения, а конечный изоформный состав Na^+, K^+ -АТФ-азы изменялся не только в зависимости от протокола получения микросомного материала, но и от объекта исследования. Так, препарат фермента, выделенный из аксолеммы ствола мозга собаки, в отличие от аналогичного препарата из крысы, содержал, наряду с

$\alpha 2$ - и $\alpha 3$ -, также $\alpha 1$ -изоформу. При анализе препаратов Na^+, K^+ -АТФ-азы, полученных по методу Йоргенсена из цист креветки [24] (где продуцируются изоформы каталитической субъединицы, близкие по структуре к $\alpha 3$ -изоформам млекопитающих) и ректальных желез акулы [19] (где предполагается существование $\alpha 3$ -изоформы [25]), авторы обнаружили ряд дополнительных белковых зон, анализ структуры которых, к сожалению, не был проведен. Для дополнительной очистки Na^+, K^+ -АТФ-азы из ректальных желез акулы Эсманом был разработан метод селективной сольubilизации фермента с помощью детергента C_{12}E_8 и последующей реконструкции мембранной структуры в присутствии ионов Ca^{2+} или Mn^{2+} [19].

В наших недавних работах был осуществлен структурный анализ Na^+, K^+ -АТФ-азы из мозга теленка [10, 16]. Были установлены N -концевые последовательности изоформ $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\beta 1$, $\beta 2$ и оценен изоформный состав и тип функционирующих комплексов $\alpha n\beta m$ для отделов мозга, содержащих разные типы клеток. Поскольку из литературных данных известно, что свойства высокоочищенных препаратов, содержащих одинаковые изоформы Na -насоса, не только являются тканеспецифичными, но и зависят от протокола очистки белка, для выделения Na^+, K^+ -АТФ-азы из мозга теленка были использованы как метод Йоргенсена, так и метод Эсмана.

Препараты ферментов, выделенные из серого вещества мозга двумя вышеописанными методами, имели сравнимую АТФ-азную активность, характерную бифазную кинетику ингибирования убаином ($K_i \sim 10^{-6}$ М и 1.5×10^{-8} М) и, судя по данным электрофоретического и структурного анализа, одинаковый набор белков. Структурный скрининг всех белковых компонентов позволил не только определить изоформный состав, но и провести полуколичественную оценку реально функционирующих изоферментов. Было показано, что Na^+, K^+ -АТФ-аза серого вещества, содержащего клетки глии, представляет набор изоферментов состава $\alpha 1\beta 1$, $\alpha 2\beta t$ и $\alpha 3\beta t$ (где $t = 1$ и/или 2), причем форма $\alpha 1\beta 1$ значительно преобладает. Из литературных данных известно, что $\beta 2$ -изоформа гомологична белку, названному ранее “адгезионной молекулой на глие”, осуществляющему взаимодействие астроцит-нейрон в нервной системе, а строение ее углеводных цепей родственно строению сложных гликанов адгезионных молекул [15]. Поскольку в сером веществе количество $\beta 2$ -изоформы сопоставимо с количеством $\alpha 2$ -изоформы, можно предположить, что изофермент Na^+, K^+ -АТФ-азы $\alpha 2\beta 2$ -типа является реальным претендентом на роль адгезионной молекулы.

С помощью сравнительного электрофоретического анализа препаратов ферментов, полученных из серого вещества мозга и наружных медул почек

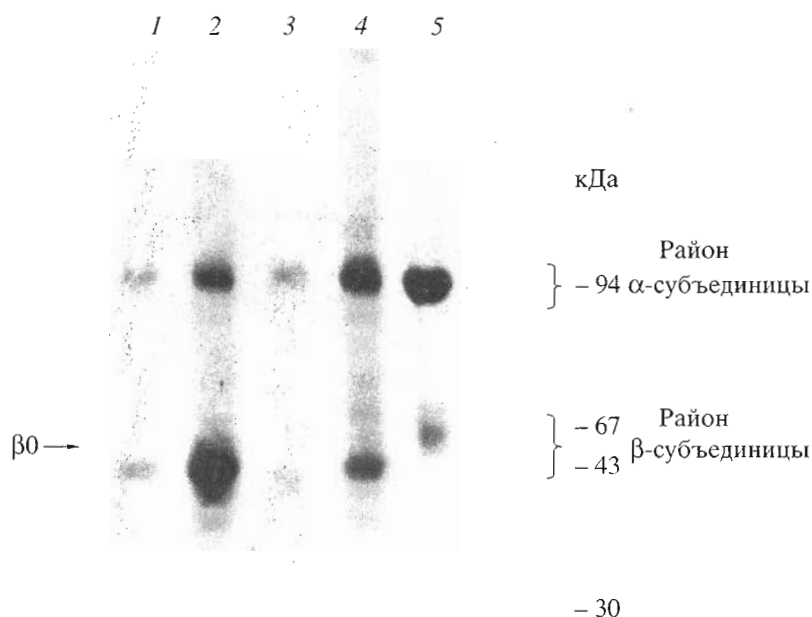


Рис. 1. Электрофореграммы ферментов: Na^+, K^+ -АТФ-аза серого вещества коры мозга телят до (1) и после (3) обработки DFP; Na^+, K^+ -АТФ-аза аксолеммы ствола мозга телят до (2) и после (4) обработки DFP; (5) – контроль (фермент из наружных медул почек теленка без обработки DFP, полученный по методу Йоргенсена). Образцы 1–4 выделены по методу Эсмана. Стрелкой слева (β_0) обозначена полоса в геле, содержащая *N*-концевой фрагмент α_3 . Электрофоретическое разделение белков проводили по методу Вебера–Осборн в градиентном (4–15%) SDS ПААГ, используя 0.1 М Na-фосфатный буфер, pH 7.2, содержащий 0.1% SDS, при 15°C. При приготовлении образцов 3 и 4 перед добавлением раствора, содержащего денатурирующий буфер (2-меркаптоэтанол и SDS), образцы выдерживали 15 мин при комнатной температуре в буфере, содержащем 3 мМ DFP и 1 мМ EDTA. После добавления денатурирующего буфера образцы выдерживали при 100°C 1 мин. Гель окрашен Кумасси G-250. Справа показано положение белков-маркеров.

теленка мы выявили бóльшую по сравнению с почками электрофоретическую подвижность β_1 -субъединицы мозга (рис. 1, дор. 1, 5). Было сделано предположение, что причиной этого может быть различное гликозилирование β_1 -субъединиц. После электрофоретического разделения белковые компоненты препаратов фермента из почек и серого вещества мозга теленка были перенесены на мембрану иммобилона Р электроблотированием и подвергнуты моносахаридному анализу по методу [26]. Он подтвердил наше предположение об различающемся гликозилировании β_1 -субъединицы ферментов из почек и мозга.

Было выявлено, что моносахаридный состав углеводных цепей β_1 -субъединицы из почек теленка: Gal 6.9; Man 3.0; GlcNAc 9.0; Fuc 0.7 (здесь и далее рассчитанный на три остатка маннозы; остатки сиаловой кислоты не определялись) оказался близок моносахаридному составу углеводных цепей β_1 -субъединицы из почек свиньи [6],

овцы и собаки [27], представленных набором четырехантенных гликанов, в том числе с ограниченным количеством повторяющихся *N*-ацетиллактозаминных единиц [27]. Локализация углеводных цепей, ранее определенные нами в β_1 -субъединице фермента из почек свиньи [21, 28], также идентичны данным для ферментов из почек овцы и собаки. Вероятно, межвидовые различия в гликозилировании β_1 -субъединицы из почек невелики, и все четыре фермента имеют близкую структуру углеводных цепей.

Нами впервые установлено, что препараты Na^+, K^+ -АТФ-азы одинакового изоформного состава могут значительно отличаться строением углеводных цепей. Показано, что моносахаридный состав углеводов β_1 -субъединицы из серого вещества мозга (Gal 2.5; Man 3.0; GlcNAc 4.2; Fuc 0.8), содержащего в основном $\alpha_1\beta_1$ -тип гетеродимера, значительно отличается от состава препаратов, выделенных из почек, и на основании дан-

ных углеводного анализа, свидетельствующих о более простом строении углеводных цепей препаратов фермента из мозга, сделано предположение, что различия в гликозилировании могут быть одной из причин, обуславливающих различную устойчивость ферментов мозга и почек к действию протеиназ *in vivo*.

Ранее [16] было показано, что Na^+, K^+ -АТФ-азы из нейронов и аксолеммы ствола мозга телят представляют собой в основном смесь изоферментов $\alpha 2\beta 1$ и $\alpha 3\beta 1$ с одинаковой чувствительностью к убаину ($K_i \sim 10^{-7}$ М), причем в аксолемме преобладает $\alpha 3\beta 1$ -изофермент. При выделении и анализе Na^+, K^+ -АТФ-азы из аксолеммы ствола мозга мы столкнулись с рядом проблем. Прежде всего, соотношение изоформ $\alpha 2$ и $\alpha 3$, наличие дополнительных белковых полос зависело не только от выбора фракции микросом, но и от метода выделения ферментов и протоколов их очистки. Кроме того, у одного и того же препарата фермента электрофореграммы различаются в зависимости от условий обработки образца и проведения электрофореза – увеличение рН буфера (7.2 \rightarrow 9.3), усиление тепловой обработки (37°C, 10 мин \rightarrow 100°C, 1 мин) приводили к сильному возрастанию интенсивности полосы “района β -субъединицы” (данные не показаны). Однако профиль электрофореграммы (рис. 1, дорожка 2 и 4) отличался от “классического” (где на долю α -субъединицы приходится ~65–70% белка), характерного, например, для почек (рис. 1, дорожка 5) даже при проведении электрофореза в более мягких условиях (при 15°C и рН 7.2) и нанесении образцов на гель без предварительной тепловой обработки. И в этом случае полоса в “районе β -субъединицы” была усилена (рис. 1, дорожка 2).

Мы установили, что одной из причин этих явлений была повышенная чувствительность каталитической субъединицы $\alpha 3$ к действию эндогенных протеиназ, приводящая к протеолизу субъединицы и отщеплению ее *N*-концевого фрагмента с $M \sim 55$ кДа, видимого как верх полосы района β -субъединиц ($\beta 0$, рис. 1, дорожка 2). Добавление ингибитора протеиназ диизопропилфторфосфата изменило электрофореграмму: исчезла зона белка $\beta 0$, усилилась интенсивность полосы района α -субъединицы, уменьшилась интенсивность полосы района β -субъединицы (рис. 1, дорожки 2 и 4). В районе β -субъединицы последующим секвенированием блотированных белков этой зоны (рис. 1, дорожка 2) были детектированы аминокислотные последовательности, соответствующие тубулину и $\beta 1$ -изоформе Na^+, K^+ -АТФ-азы. С помощью анализа *N*-концевой аминокислотной последовательности полосы $\beta 0$ секвенированием и *C*-концевой аминокислотной последовательности с помощью карбоксипептидаз мы локализовали участок трипсиноподобного эндогенного протеолиза: -Pro-Asn-Asp-Asn-Arg⁴⁹² ↓ ⁴⁹³(Tyr)- (по

нумерации $\alpha 3$ -изоформы человека). Такая последовательность полипептидной цепи уникальна для $\alpha 3$ -изоформ. С одной стороны, она высококонсервативна для $\alpha 3$ -изоформ весьма далеких видов (млекопитающих [29, 30], птиц [31], земноводных [32]). С другой стороны, она соответствует одной из двух наиболее вариабельных областей изоформ $\alpha 1, \alpha 2, \alpha 3, \alpha 4$, локализованной в центральной области белка [30–35]. Известно, что другая, *N*-концевая вариабельная область изоформ, наиболее изученная к настоящему времени, важна для связывания ионов либо для ионзависимого конформационного изменения ферментов [36]. На рис. 2 приведены структуры фрагментов этих двух вариабельных областей изоформ каталитической субъединицы Na^+, K^+ -АТФ-азы млекопитающих.

В вариабельном участке, локализованном в центральной части молекул изоформ $\alpha 1, \alpha 2, \alpha 4$, аминокислотная последовательность, аналогичная участку эндогенного трипсиноподобного протеолиза $\alpha 3$ -изоформы, отсутствует. В этом месте полипептидной цепи в других изоформах либо нет остатков основных аминокислот, либо содержится (в $\alpha 1$) последовательность РК(Н), не гидролизуемая трипсином. Функциональное значение центрального вариабельного района $\alpha 3$ -изоформы, чрезвычайно чувствительного к эндогенному протеолизу, пока неясно, так же как неизвестно, присутствует ли эта повышенная чувствительность к протеолизу всем изоферментам, содержащим $\alpha 3$ -изоформу, или это свойство только изофермента, выделенного из нейронов ствола мозга.

Введение ингибитора протеиназ – диизопропилфторфосфата перед добавлением детергентов оказалось необходимым как на стадии выделения фермента, так и на стадии его электрофоретического анализа. Однако даже после введения ингибитора наблюдалась дополнительная белковая полоса (верхняя полоса “района β -субъединицы”, рис. 3, дорожка 2), похожая на белковую полосу, детектированную Свиднер [23] в препаратах фермента из аксолеммы ствола мозга крысы. Нами было обнаружено, что интенсивность этой белковой полосы в выделенных препаратах коррелировала с содержанием $\alpha 3$ -изоформы Na^+, K^+ -АТФ-азы, а анализ ее *N*-концевой последовательности секвенированием выявил, что она принадлежит β -изоформе тубулина.

Как уже упоминалось выше, фракцией, наиболее обогащенной $\alpha 3$ -изоформой, является аксолемма. При получении аксолеммы из ствола мозга мы использовали схему, включающую выделение миелинизированных аксонов, диссоциацию и отделение миелина от аксолеммы [37]. Методом градиентного центрифугирования были разделены две фракции аксолеммы различной плотности; из каждой осуществлено выделение фермента

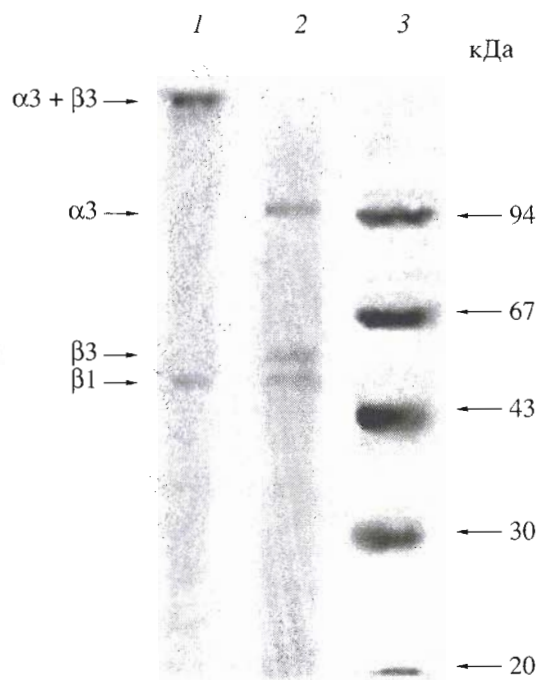


Рис. 3. Электрофореграммы препаратов Na^+, K^+ -АТФ-азы из аксолеммы ствола мозга телянка: не обработанных (1) и обработанных 2-меркаптоэтанолом (2); (3) – стандартная белковая смесь. Ферменты выделены по методу Йоргенсена. Стрелками слева обозначены полосы геля, содержащие белки, подвергнутые после электроблоттинга на PVDF-мембрану последующему структурному анализу, описанному в тексте ($\alpha 3$ - и $\beta 1$ -субъединицы Na^+, K^+ -АТФ-азы и $\beta 3$ -изоформа тубулина). Условия обработки образцов и проведения электрофореза аналогичны условиям, приведенным в подписи к рис. 1 (в присутствии DFP). Гель окрашен Кумасси G-250.

ствлен гидролиз С-концевых аминокислотных остатков с помощью карбоксипептидаз.

Оказалось, что эффективное отщепление С-концевых аминокислот возможно только после предварительной обработки белков, иммобилизованных на мембране иммобилона, с помощью поливинилпирролидона (PVP-40), препятствующего, по-видимому, неспецифической сорбции карбоксипептидаз [47]. Отщепленные аминокислоты анализировали в виде дансильных производных с помощью двумерной хроматографии на силикагельных пластинках. В аналитических опытах тестировались различные карбоксипептидазы, их нагрузки и время гидролиза. Карбоксипептидаза В, так же как и смесь карбоксипептидаз А и В (срА + срВ), за 30 мин освобождала единственную кислоту – лизин, ее количество в супернатанте возрастало с увеличением времени гидролиза до 60 мин. Последующее понижение рН буфера (8.5 \rightarrow 7.0) и добавление карбоксипептидазы У приводило к появлению пролина и следовых количеств глицина. Более полное отщепление С-

концевых аминокислот было достигнуто двухступенчатым гидролизом (срВ + срА, рН 8.5, 60 мин; срА + срУ, рН 7.0, 60 мин): в гидролизате были обнаружены лизин, прелин, глицин, глутамин и аланин. Анализ набора отщепленных аминокислот и кинетики их гидролиза позволил определить последовательность пяти С-концевых аминокислотных остатков (рис. 4). Сравнение найденных последовательностей с известными первичными структурами β -тубулинов человека [41–45] и С-концевой последовательностью $\beta 3$ -изоформы тубулина телянка [46] позволили идентифицировать в полученном нами препарате фермента $\beta 3$ -изоформу тубулина.

Изоформа тубулина $\beta 3$ была детектирована в образцах Na^+, K^+ -АТФ-азы, полученных как по методу Йоргенсена, так и по методу Эсмана, где использовались совершенно различные принципы выделения (получение фермента в мембраносвязанной и солюбилизированной формах) и типы детергентов (ионный детергент SDS и неионный – C_{12}E_8). Этот факт был аргументом в пользу возможного контакта между натриевым насосом и белком цитоскелета тубулином.

В результате серии электрофоретических экспериментов был обнаружен ряд интересных фактов: электрофореграммы образцов Na^+, K^+ -АТФ-азы из серого вещества мозга (рис. 5, дорожки 1 и 2), так же как и образцов фермента из почек (рис. 5, дорожки 3 и 4), 2-меркаптоэтанолом не изменяются после обработки (на электрофореграммах видны две белковые полосы, соответствующие α - и β -субъединицам Na^+, K^+ -АТФ-азы). Это свидетельствует об отсутствии в белках дисульфидных связей типа α - α , β - β , α - β . Электрофореграммы же ферментов, полученных из аксолеммы (рис. 3), отличаются от электрофореграмм ферментов почек и серого вещества: во-первых, в препаратах, обработанных 2-меркаптоэтанолом, детектируются три белковые полосы, соответствующие $\alpha 3$ - и $\beta 1$ -субъединицам Na^+, K^+ -АТФ-азы и $\beta 3$ -изоформе тубулина (рис. 3, дорожка 2), а во-вторых, в препаратах, не обработанных 2-меркаптоэтанолом, отсутствуют полосы, соответствующие $\beta 3$ -изоформе тубулина и $\alpha 3$ -субъединице Na^+, K^+ -АТФ-азы, и обнаруживается новая полоса в районе старта (рис. 3, дорожка 1). Анализ N-концевой аминокислотной последовательности белковой полосы на старте показал присутствие эквимольной смеси двух аминокислотных последовательностей, соответствующих $\alpha 3$ -изоформе Na^+, K^+ -АТФ-азы и $\beta 3$ -изоформе тубулина.

На основании полученных данных сделано предположение о возможности существования дисульфидной связи между $\alpha 3$ -субъединицей Na^+, K^+ -АТФ-азы и $\beta 3$ -субъединицей тубулина.

Сравнение всех известных первичных структур изоформ α -субъединицы выявило интерес-

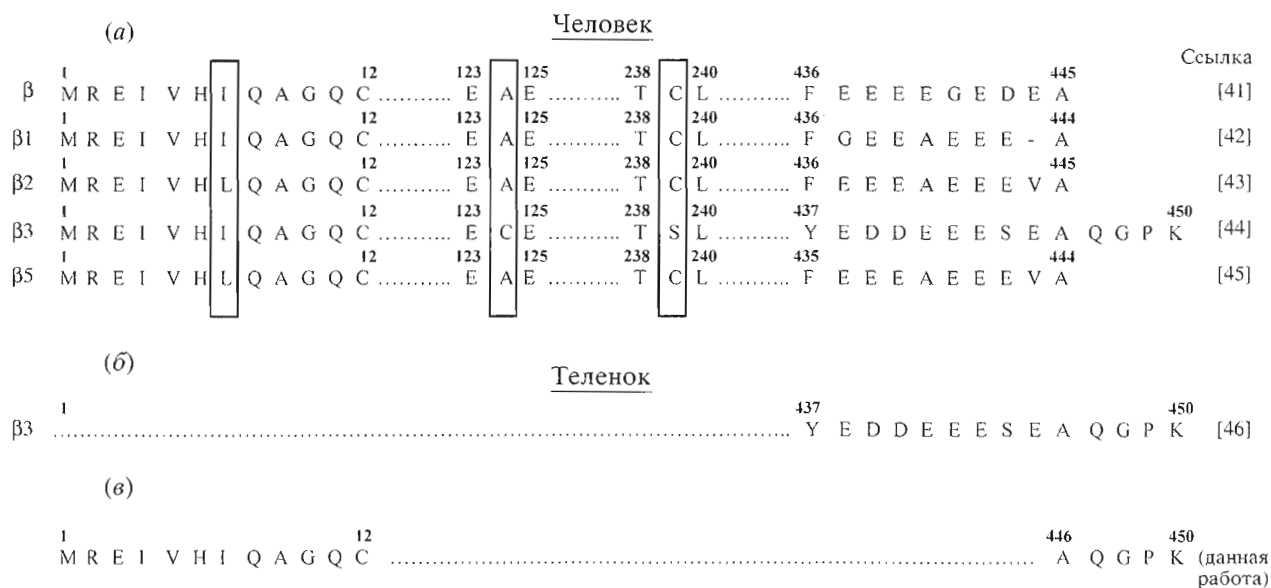


Рис. 4. Сравнительный анализ фрагментов аминокислотных последовательностей β-изоформ тубулина человека (а) и β3-изоформы тубулина теленка (б). В рамки взяты остатки аминокислот, находящиеся в консервативных областях полипептидной цепи и являющиеся характеристическими для β3-изоформы тубулина. В нижней части схемы (в) приведены определенные нами N- и C-концевые аминокислотные последовательности тубулина, содержащегося в препарате Na⁺,K⁺-АТФ-азы из аксолеммы ствола мозга теленка.

ную структурную особенность α3-изоформы. Кроме 21 консервативно расположенных во всех изоформах каталитической субъединицы остатков цистеина, α3-изоформы (известные на сегодняшний день для крысы, человека и цыпленка) содержат дополнительно четыре остатка цистеина Cys⁴², Cys⁴⁹, Cys²²¹, Cys⁵⁶³ (по нумерации изоформы α3 из крысы), находящиеся в цитоплазматическом домене. Изоформы α3-типа не содержат локализованных в цитоплазме остатков цистеина в положениях Cys⁴⁶³, Cys⁴⁶⁴ и Cys²⁴¹, Cys⁴⁶² (гомологичный Cys⁴⁶⁴), которые характерны для α1- и α2-изоформ соответственно (рис. 6). Но изоформы α1, α2, α3 каталитической субъединицы различаются не только величиной общего содержания SH-групп, но и их реакционной способностью. Так, в работах Свиднер [49] было показано, что при реакции с N-этилмалеимидом количество реактивных сульфгидрильных групп в препаратах оуабаинчувствительной каталитической субъединицы мозга α⁺ (смесь α2- и α3-изоформ) вдвое выше, чем у α1-субъединицы почек. Эсманом была выявлена различная кинетика инактивации Na⁺,K⁺-АТФ-азы под действием N-этилмалеимида ферментов из ректальных желез и почек, содержащих α3- и α1-изоформу каталитической субъединицы соответственно [50].

Сравнение аминокислотных последовательностей различных изоформ тубулина позволило также выявить интересную структурную особенность β3-изоформы тубулина: для нее характерно иное расположение остатков цистеина, чем в ос-

тальных изоформах, для которых оно весьма консервативно. β3-Изоформа отличается отсутствием остатка Cys²³⁹ и появлением дополнительного остатка Cys¹²⁴ (рис. 4). Есть данные, что Cys²³⁹ является наиболее реактивным остатком в изоформах β-тубулина мозга. Его наличие (или отсутствие) имеет критическое значение для выполнения β-изоформами тубулина различных функций в мозге [51].

Исходя из полученных данных, мы сделали вывод, что как α3-изоформа Na⁺,K⁺-АТФ-азы, так и β3-изоформа тубулина содержат дополнительные остатки цистеина, характерные для этих типов изоформ; не исключена возможность образования специфической дисульфидной связи между α3-изоформой Na⁺,K⁺-АТФ-азы и β3-изоформой тубулина.

Физиологическая роль специфической ассоциации изоформ натриевого насоса и тубулина в мозге пока неясна. Известно однако, что другие белки цитоскелета (актин, фодрин и анкирин/спектрин) взаимодействуют с Na⁺,K⁺-АТФ-азой. Было показано, что [¹²⁵I]анкирин взаимодействует с α1-субъединицей Na⁺,K⁺-АТФ-азы клеточной линии MDCK [12], установлен нековалентный характер этого взаимодействия [13], локализованы домены полипептидной цепи α-субъединицы, участвующие во взаимодействии с анкирином [14], аминокислотная последовательность которых высококонсервативна для всех видов изоформ.

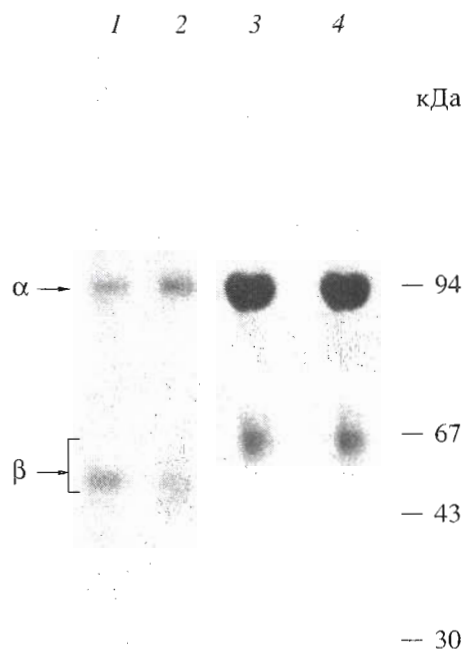


Рис. 5. Электрофореграмма препаратов Na⁺,K⁺-АТФ-азы из серого вещества коры мозга (1, 2) и наружных медул почек (3, 4) телят: не обработанных 2-меркаптоэтанолом (1, 3), обработанных 2-меркаптоэтанолом (2, 4). Ферменты выделены по методу Йоргенсена. Условия обработки образцов и проведения электрофореза приведены в подписи к рис. 1. Гель окрашен Кумасси G-250. Справа показано положение белков-маркеров, слева – положение α- и β-субъединиц Na⁺,K⁺-АТФ-азы.

Показано, что в эпителиальных клетках и мышечных клетках артерий, имеющих, как и нейроны, сложную организацию плазматических мембран, поляризованное распределение Na⁺,K⁺-АТФ-азы осуществляется через взаимодействие с цитоскелетными белками анкирином и спектрином [11, 52]. С помощью цитоиммунохимической техники было показано, что α2-изоформа в астроцитах и α3-изоформа в нейронах и миоцитах локализованы в области плазматической мембраны, расположенной параллельно эндо(сарко)плазматическому ретикулуму, где также расположен Na⁺/Ca²⁺-обменник, и выдвинуто предположение, что α1-изоформа регулирует общую цитозольную концентрацию Na⁺ и, опосредованно, концентрацию Ca²⁺, а изоформы α2 и α3 регулируют концентрации этих ионов в ограниченном пространстве между плазматической мембраной и эндо(сарко)плазматическим ретикулумом [53].

Совсем недавно стало известно, что димер (или субъединица) тубулина заякорен в ганглиозид-обогатщенных, устойчивых к детергентам доме-

нах нейрона, и что заякоренный тубулин важен при контакте микротрубочек с плазматическими мембранами для ремоделирования мембран во время вытягивания аксона. На основании этих экспериментов высказано предположение о возможном взаимодействии тубулина с белковыми компонентами плазматической мембраны [54]. Появились данные [55], что β3-изоформа тубулина может быть включена в микротрубочки совместно с β1-изоформой – постоянной компонентой микротрубочек взрослого мозга. Исследования β3-мутантных фенотипов показали, что она важна для специфической архитектуры аксонов, их способности к связыванию и структурированию, и подтвердили гипотезу, что β3 придает специализированные функции микротрубочкам, в которые она включена.

Таким образом, совершенно очевидно, что не только изоформный состав, липидное окружение, характер гликозилирования, но также связь с белками цитоскелета и другими белковыми компонентами могут быть важными для функциональных особенностей изоферментов Na⁺,K⁺-АТФ-азы, а понимание значения ассоциации изоферментов с другими белковыми системами (с белками цитоскелета, в частности) может привести к открытию новых функций Na⁺-насоса в клетке.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали: оуабаин, бычий сывороточный альбумин, поливинилпирролидон-40 (Sigma, США); мембраны иммобилона Р (PVDF-мембраны) с диаметром пор 0.45 мкм (Millipore, США); карбоксипептидазу А из поджелудочной железы быка (активность 55 ед./мг белка); карбоксипептидазу В из поджелудочной железы свиньи (активность 132 ед./мг белка); карбоксипептидазу Y из дрожжей (активность 460 ед./мг белка); додециловый эфир октаэтиленгликоля (C₁₂E₈) (Calbiochem, США); реактивы для электрофореза (Bio-Rad, США); додецилсульфат натрия (Bio-Rad) был дважды перекристаллизован из 95% метанола; АТФ (Reanal, Венгрия); низкомолекулярный белковый калибровочный стандарт (LMW-KIT) (Pharmacia, Швеция); силикагельные пластинки (Merck, ФРГ). Остальные реактивы отечественного производства квалификации "х.ч." или "ос.ч."

Получение микросом. Для их выделения использовали свежий мозг и почки телят. Получение микросом из серого вещества мозга осуществляли по методу Свиднер [56]. Ствол мозга был использован как для получения мембран по методу Свиднер [49], так и для получения аксолеммы по методике, описанной в работе [37]. Концентрацию белка определяли по методу Лоури с использованием в качестве стандарта бычьего сывороточного альбумина [57]. Выделение микро-

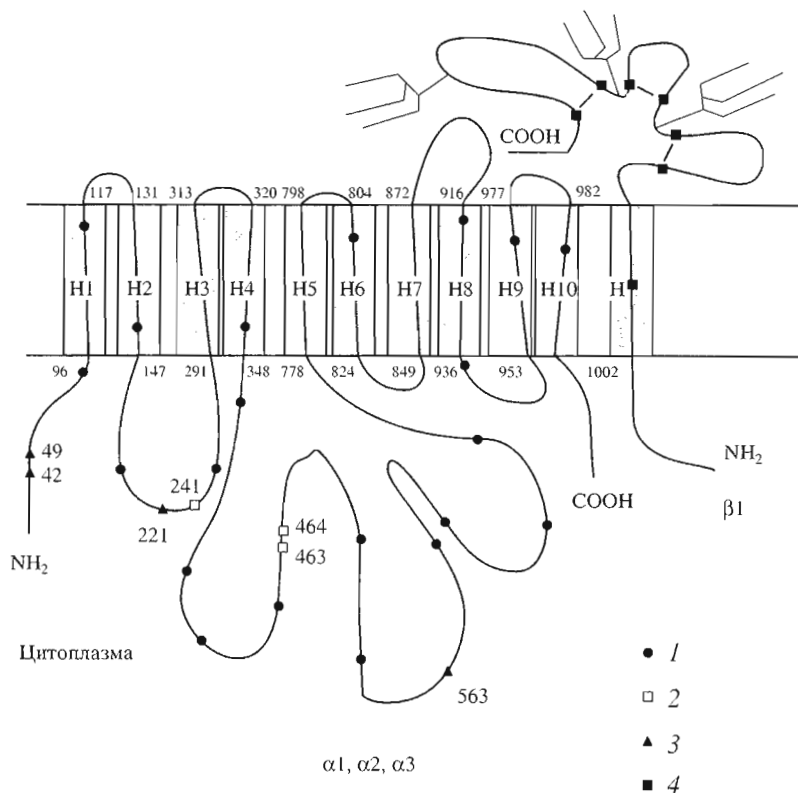


Рис. 6. Расположение остатков цистеина в $\alpha 1$ -, $\alpha 2$ -, $\alpha 3$ - и $\beta 1$ -изоформах Na⁺,K⁺-АТФ-азы: геометрическими значками (1–4) обозначены: остатки цистеина $\alpha 3$, гомологичные остаткам цистеина изоформ $\alpha 1$ и $\alpha 2$ (1), остатки цистеина, отсутствующие в $\alpha 3$ -изоформе (2), остатки цистеина, присутствующие только в $\alpha 3$ -изоформе (3), остатки цистеина, гомологичные для $\beta 1$ -изоформ различных видов (4). На рисунке приведена топографическая модель фермента, предложенная Карлишем и соавт. [48].

сом из наружных медул почек телят проводили по методу Йоргенсена [18].

Выделение Na⁺,K⁺-АТФ-азы из всех видов микросом проводили по модифицированному методу Йоргенсена (метод 1) [18], заключающемся в обработке мембран SDS (в присутствии АТФ) с последующим центрифугированием в ступенчатом градиенте плотности глицерина, а также осаждением по методу Эсмана [19] мембраносвязанной формы фермента после предварительной селективной солубилизации его с помощью C₁₂E₈ (метод 2). В обоих методах перед добавлением детергентов вводили диизопропилфторфосфат (DFP) до концентрации 3 мМ и выдерживали образцы 10 мин при комнатной температуре. Применение этих методов для получения ферментов из мозга подробно описаны в нашей работе [17]. Выделение фермента из наружных медул почек телят проводили по методу Йоргенсена.

Электрофорез и электроблоттинг. Электрофорез выполняли по методу Вебера и Осборн [58] как описано в работе [17]. Образцы готовили по методике [17]: а) перед добавлением раствора, содержащего SDS и 2-меркаптоэтанол, вводили 3 мМ DFP и 1 мМ EDTA (в ряде экспериментов,

описанных в тексте и представленных на рис. 3, 5, 2-меркаптоэтанол не добавляли); б) образец выдерживали 15 мин при 37°C, затем добавляли солубилизирующий буфер, содержащий SDS и 2-меркаптоэтанол до концентрации 5 и 2.5% соответственно, смесь термостатировали при 100°C 1 мин. Для тестирования белковых полос использовали окрашивание половиной геля раствором Кумасси G-250 в 10% уксусной кислоте, содержащей 25% изопропилового спирта. С другой половины геля осуществляли электроблоттинг на PVDF-мембрану в 0.025 М натрий-бикарбонатном буфере (рН 9.0), содержащем 0.1% SDS и 20% метанола (4 ч, сила тока 400 мА). Мембрану промывали метанолом, несколько раз тридистиллированной водой (Milli-Q), 30% метанолом и высушивали на воздухе. Белковые полосы детектировали либо окрашиванием раствором амидочерного 10Б, либо методом визуализации белков на мембране иммобилона без окрашивания, описанным Рейгом и Клейном [59] и широко примененным нами ранее при анализе изоформ Na⁺,K⁺-АТФ-азы [17]. Было обнаружено, что после промывки 30% метанолом белковые полосы высыхают медленнее, чем сама мембрана. 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 при повторении промывок. Неокрашенные белковые зоны вырезали и использовали либо для секвенирования, либо для углеводного анализа по методу [26], либо для гидролиза C-концевых аминокислот карбоксипептидазами.

Анализ N-концевой аминокислотной последовательности белков. Автоматическая деградация по методу Эдмана выполнялась на газофазном секвенаторе Procise 491 Protein Sequencing System (Applied Biosystems, США). Идентификацию фенилтиогидантоиновых производных аминокислот проводили на РТН-анализаторе 785A (Applied Biosystems, США).

Гидролиз белков карбоксипептидазами и анализ C-концевой последовательности. Гидролиз белков карбоксипептидазами осуществляли непосредственно на PVDF-мембране. Для предотвращения неспецифической адсорбции карбоксипептидаз мембрану иммобилона обрабатывали поливинилпирролидоном. Полоски иммобилона мелко нарезали 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°C. Избыток PVP-40 был удален пятикратной промывкой водой Milli-Q и двукратной промывкой 0.1 М NH_4HCO_3 , pH 7.5.

а) **Гидролиз N-концевого фрагмента $\alpha 3$ -субъединицы ($M \sim 55$ кДа).** К промытой мембране иммобилона, содержащей около 50 мкг белка, добавляли 0.5 мкг срВ, растворенной в 50 мкл 0.1 М NH_4HCO_3 , pH 7.5. В аналитических экспериментах время инкубации варьировалось от 30 до 90 мин. В препаративном опыте после 30 мин инкубации с срВ при 37°C был добавлен 1.0 мкг срА в 5 мкл того же буфера. После инкубирования смеси в течение 60 мин при 37°C супернатант отделяли. Мембрану последовательно промывали 0.1 М NH_4HCO_3 , pH 7.5, водой Milli-Q и метанолом (порциями по 30 мкл). Все отмывки объединяли с супернатантом и упаривали. 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 5×5 см как описано в работе [60]. Для идентификации дансильных производных аминокислот использовали две двумерные хроматографии в разных системах растворителей: 1) ацетон–изопропиловый спирт–25% аммиак (9.0 : 7.0 : 0.5) – первое направление;

хлороформ–бензиловый спирт–этилацетат–уксусная кислота (6.0 : 4.0 : 5.0 : 0.2) – второе направление. 2) ацетон–изопропиловый спирт–25% аммиак (9.0 : 7.0 : 2.0) – первое направление; хлороформ–бензиловый спирт–метанол–уксусная кислота (5.0 : 4.0 : 1.0 : 1.0) – второе направление. На хроматограммах были идентифицированы дансильные производные аргинина, аспарагиновой кислоты и аспарагина. Пятна Dns-аминокислот детектировали при длине волны 366 нм, а идентификацию проводили сравнением их подвижности с маркерной смесью Dns-аминокислот. Аминокислотный анализ позволил оценить количество отщепленных аминокислот (пмоль/100 пмоль белка): Arg – 60 (срВ, 30 мин); Arg – 85–90 и Asn – 15 (срВ, 90 мин); Arg – 87–95, Asn – 115–120 и Asp – 60–65 (срВ, 90 мин, срА, 60 мин).

б) **Гидролиз β -тубулина.** Обработку мембраны иммобилона (содержащей 45–50 мкг белка) с помощью PVP-40 проводили как описано выше. Избыток PVP-40 был удален пятикратной промывкой водой Milli-Q и двукратной промывкой 0.2 М *N*-этилморфолинацетатным буфером, pH 8.5. Гидролиз карбоксипептидазами осуществляли в два этапа. На первом этапе к мембране добавляли 50 мкл 0.2 М *N*-этилморфолинацетатного буфера, pH 8.5, содержащего 0.5 мкг срВ и 1.0 мкг срА. Смесь инкубировали в течение 60 мин при 37°C, затем супернатант отделяли. После удаления супернатанта, мембрану последовательно промывали 0.2 М *N*-этилморфолинацетатным буфером, pH 8.5, водой Milli-Q и метанолом (порциями по 30 мкл). Все отмывки объединяли с супернатантом и упаривали. На втором этапе гидролиза к мембране добавляли 50 мкл 0.2 М *N*-этилморфолинацетатного буфера, pH 7.0, содержащего 1.0 мкг срА и 1.0 мкг срУ. Смесь инкубировали при 37°C в течение 60 мин. После удаления супернатанта промывку мембран и анализ отщепленных аминокислот проводили в виде дансильных производных как описано выше.

Измерение АТФ-азной активности и чувствительности к оуабайну. При оценке чувствительности изоферментов к оуабайну АТФ-азную активность определяли в буфере, содержащем 140 NaCl, 14 мМ KCl, 5 мМ MgCl_2 , 0.5 мМ EDTA, 50 мМ имидазол · HCl (pH 7.5) в присутствии различных концентраций оуабайна (10^{-3} – 10^{-10} М). Инкубацию с оуабайном проводили в течение 15 мин при 37°C. В остальных случаях Na^+ , K^+ -АТФ-азную активность определяли как активность, чувствительную к оуабайну в концентрации 100 мкМ. При необходимости предварительно вводили DFP до концентрации 3 мМ. Реакцию с АТФ осуществляли при 37°C в течение 5–15 мин. В работе использован препарат ферментов из почек с удельной активностью (мкмоль P_i /(мг белка · ч)) 1600–1800; из серого вещества 800–1100; из аксолеммы 600–700.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 99-04-48387.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Blanco G., Berberian G., Beauge L. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1990. V. 1027. P. 1–7.
2. Mobasher A., Avila J., Cozar-Castellano I., Brownleader M.D., Trevan M., Francis M.J.O., Lamb J.F., Martin-Vasallo P. // *Biosci. Reports.* 2000. V. 20. P. 51–91.
3. Sweadner K.J. // *J. Biol. Chem.* 1985. V. 260. P. 11508–11513.
4. Blanco G., Mercer R.W. // *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* 1998. V. 275. P. F633–F650.
5. Fambrough D.M. // *Trends Neurosci.* 1988. V. 11. P. 325–328.
6. Vladimirova N.M., Murav'eva T.I., Ovchinnikova T.V., Potapenko N.A., Khodova O.M. // *Membr. Cell. Biol.* 1998. V. 12. P. 435–439.
7. Crambert G., Hasler U., Beggah A.T., Yu C., Modyanov N.N., Horisberger J.-D., Lelievre L., Geering K. // *J. Biol. Chem.* 2000. V. 275. P. 1976–1986.
8. Maixent J.M., Lelievre L., Berrebi-Bertrand I. // *Cardiovasc. Drugs. Ther.* 1998. V. 12. P. 585–594.
9. Therien A.G., Blostein R. // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2000. V. 279. P. C541–C566.
10. Vladimirova N.M., Potapenko N.A., Modyanov N.N. // *Биоорган. химия.* 1995. Т. 21. С. 483–491.
11. Nelson W.J., Hammerton R.W. // *J. Cell. Biol.* 1989. V. 108. P. 893–902.
12. Morrow J.S., Gianci C.D., Ardito T., Mann A.S., Kashgarian M. // *J. Cell. Biol.* 1989. V. 108. P. 455–465.
13. Koob R., Kraemer D., Trippe G., Aebi U., Drenckhahn D. // *Eur. J. Cell. Biol.* 1990. V. 53. P. 93–100.
14. Devarajan P., Scaramuzzino D.A., Morrow J.S. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1994. V. 91. P. 2965–2969.
15. Gloor S., Antonicek H., Sweadner K.J., Pagliusi S., Frank R., Moos M., Schachner M. // *J. Cell. Biol.* 1990. V. 110. P. 165–174.
16. Vladimirova N.M., Platoshkina E.A., Efendiyev R.E., Potapenko N.A. // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1997. V. 834. P. 153–154.
17. Владимирова (Арзамазова) Н.М., Потепенко Н.А., Левина Н.Б., Модянов Н.Н. // *Биол. мембраны.* 1990. Т. 7. С. 1256–1270.
18. Jorgensen P.L. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1974. V. 356. P. 36–52.
19. Esmann M. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1988. V. 940. P. 71–76.
20. Jorgensen P.L. // *Meth. Enzymol.* 1988. V. 156. P. 29–43.
21. Ovchinnikov Yu.A., Arzamazova (Vladimirova) N.M., Arystarkhova E.A., Gevondyan N.M., Aldanova N.A., Modyanov N.N. // *FEBS Lett.* 1987. V. 217. P. 269–274.
22. Smith T.W. // *Meth. Enzymol.* 1988. V. 156. P. 46–48.
23. Sweadner K.J. // *Meth. Enzymol.* 1988. V. 156. P. 65–71.
24. Peterson G.L., Hokin L.E. // *Meth. Enzymol.* 1988. V. 156. P. 48–65.
25. Fisone G., Cheng S.X., Nairn A.C., Czernik A.J., Hemmings H.C., Hoog J.-O., Bertorello A.M., Kaiser R., Bergman T., Jornvall H., Aperia A., Greengard P. // *J. Biol. Chem.* 1994. V. 269. P. 9368–9373.
26. Хорлин А.Я., Шиян С.Д., Насонов В.В., Мирзаянова М.Н. // *Биоорган. химия.* 1986. Т. 12. С. 1203–1212.
27. Treuheit M.Y., Costello C.E., Kirley T.L. // *J. Biol. Chem.* 1993. V. 268. P. 13914–13919.
28. Арзамазова (Владимирова) Н.М., Гевондян Н.М., Чертова Е.Н., Назимов И.В., Гаврильева Е.Е., Алданова Н.А., Модянов Н.Н. // *Биоорган. химия.* 1987. Т. 13. С. 5–13.
29. Ovchinnikov Yu.A., Monastyrskaya G.S., Broude N.E., Ushkaryov Yu.A., Melkov A.M., Smirnov Yu.V., Malyshov I.V., Allikmets R.V., Kostina M.B., Dulubova I.E., Kiyatkin N.J., Grishin A.V., Modyanov N.N., Sverdlov E.D. // *FEBS Lett.* 1988. V. 233. P. 87–94.
30. Shull G.E., Greeb J., Lingrel J.B. // *Biochemistry.* 1986. V. 25. P. 8125–8132.
31. Takeyasu K., Lemas V., Fambrough D.M. // *Amer. J. Physiol.* 1990. V. 259. P. C619–C630.
32. Verry F., Kairouz P., Schaefer E., Fuentes P., Geering K., Rossier B.C., Kraehenbuhl J.-P. // *Amer. J. Physiol.* 1989. V. 256. P. F1034–F1043.
33. Kawakami K., Ohta T., Nojima H., Nagano K. // *J. Biochem. (Tokyo).* 1986. V. 100. P. 389–397.
34. Shull M.M., Pugh D.G., Lingrel J.B. // *J. Biol. Chem.* 1989. V. 264. P. 17532–17543.
35. Shamraj O.I., Lingrel J.B. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1994. V. 91. P. 12952–12956.
36. Jorgensen P.L., Collins J.H. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1986. V. 860. P. 570–576.
37. De Vries G.H., Matthieu Y.-M., Beny M., Chicheportiche R., Lazdunski M., Dolivo M. // *Brain Res.* 1978. V. 147. P. 339–352.
38. MacRae T.H. // *Biochem. Cell. Biol.* 1992. V. 70. P. 835–841.
39. Moura Neto V., Mallat M.J., Jeantet C., Prochiantz A. // *EMBO J.* 1983. V. 2. P. 1243–1248.
40. Hallworth R., Luduena R.F. // *Hear Res.* 2000. V. 148. P. 161–172.
41. Leffers H., Wiemann S., Ansorge W. // Submitted to the Protein Sequence Database. 1994.
42. Lee M.G., Lewis S.A., Wilde C.D., Cowan N.J. // *Cell.* 1983. V. 33. P. 477–487.
43. Lewis S.A., Gilmartin M.E., Hall J.L., Cowan N.J. // *J. Mol. Biol.* 1985. V. 182. P. 11–20.
44. Randanathan S., Dexter D.W., Benetatos C.A., Hudes G.R. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1998. V. 1395. P. 237–245.
45. Lee M.G., Loomis C., Cowan N.J. // *Nucl. Acids Res.* 1984. V. 12. P. 5823–5836.
46. Alexander J.E., Hunt D.F., Lee M.K., Shabanowitz J., Michel H., Berlin S.C., MacDonald T.L., Sundberg R.J., Rebhun L.J., Frankfurter A. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1991. V. 88. P. 4685–4689.
47. Zvaritch E., James P., Vorherr T., Falchetto R., Modyanov N., Carafoli E. // *Biochemistry.* 1990. V. 29. P. 8070–8076.
48. Karlisch S.J., Goldshleger R., Stein W.D. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1990. V. 87. P. 4566–4570.

49. Sweadner K.J. // J. Biol. Chem. 1979. V. 254. P. 6060–6067.
50. Esmann M. // Biochim. Biophys. Acta. 1982. V. 688. P. 251–259.
51. Little M., Luduena R.F. // EMBO J. 1985. V. 4. P. 51–56.
52. Lee D., Chen X., Smith P.R. // FASEB J. 1996. V. 10. P. 651.
53. Juhaszova M., Blaustein M.P. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1997. V. 94. P. 1800–1805.
54. Palestini P., Pitto M., Tedeschi G., Ferraretto A., Parenti M., Brunner J., Masserini M. // J. Biol. Chem. 2000. V. 275. P. 9978–9985.
55. Hoyle H.D., Turner F.R., Raff E.C. // Dev. Biol. 2000. V. 221. P. 375–389.
56. Sweadner K.J. // J. Biochim. Biophys. Acta. 1978. V. 508. P. 486–499.
57. Lowry O.H., Rothenbrough N.Y., Farr A.H., Randall R.J. // J. Biol. Chem. 1951. V. 193. P. 265–275.
58. Weber K., Osborn M. // J. Biol. Chem. 1969. V. 244. P. 4406–4412.
59. Reig J., Klein D.C. // Appl. and Theor. Electrophor. 1988. V. 1. P. 59.
60. Бельский Б.Г., Ганкина Э.С., Нестеров В.В. // Докл. АН СССР. 1967. Т. 172. С. 91–93.

Structural Peculiarities of Na⁺,K⁺-ATPase Isozymes from the Calf Brain

N. M. Vladimirova[#], E. N. Sautkina, T. I. Murav'eva, T. V. Ovchinnikova, and N. A. Potapenko

[#]Phone: +7 (095) 330-66-47; e-mail: vla@mail.ibch.ru

Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,
ul. Miklukho-Maklaya 16/10, GSP Moscow, 117997 Russia

Functionally active preparations of Na⁺,K⁺-ATPase isozymes from calf brain that contain catalytic subunits of three types ($\alpha 1$, $\alpha 2$, and $\alpha 3$) were obtained using two approaches: a selective removal of contaminating proteins by the Jorgensen method and a selective solubilization of the enzyme with subsequent reconstitution of the membrane structure by the Esmann method. The ouabain inhibition constants were determined for the isozymes. The real isozyme composition of the Na⁺ pump from the grey matter containing glial cells and the brain stem containing neurons was determined. The plasma membranes of glial cells were shown to contain mainly Na⁺,K⁺-ATPase of the $\alpha 1\beta 1$ type and minor amounts of isozymes of the $\alpha 2\beta 2$ ($\beta 1$) and the $\alpha 3\beta 1$ ($\beta 2$) type. The axolemma contains $\alpha 2\beta 1$ - and $\alpha 3\beta 1$ isozymes. A carbohydrate analysis indicated that $\alpha 1\beta 1$ enzyme preparations from the brain grey matter substantially differ from the renal enzymes of the same composition in the glycosylation of the $\beta 1$ isoform. An enhanced sensitivity of the $\alpha 3$ catalytic subunit of Na⁺,K⁺-ATPase from neurons to endogenous proteolysis was found. A point of specific proteolysis in the amino acid sequence PNDNR⁴⁹² ↓ Y⁴⁹³ was localized (residue numbering is that of the human $\alpha 3$ subunit). This sequence corresponds to one of the regions of the greatest variability in $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, and $\alpha 4$ -subunits, but at the same time, it is characteristic of the $\alpha 3$ isoforms of various species. The presence of the $\beta 3$ isoform of tubulin (cytoskeletal protein) was found for the first time in the high-molecular-mass Na⁺,K⁺-ATPase $\alpha 3\beta 1$ isozyme complex isolated from the axolemma of brain stem neurons, and its binding to the $\alpha 3$ catalytic subunit was shown. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2003, vol. 29, no. 2; see also <http://www.maik.ru>.

Key words: Na⁺,K⁺-ATPase, axolemma, glycosylation, isoforms, isozymes, proteolysis, tubulin