



УДК 577.152.07+547.963.04

**Na⁺-K⁺-АКТИВИРУЕМАЯ АДЕНОЗИНТРИФОСФАТАЗА
ИЗ ПОЧЕК СВИНЬИ****II*. ИЗУЧЕНИЕ ТОПОГРАФИИ ФЕРМЕНТА ИММУНОХИМИЧЕСКИМИ
МЕТОДАМИ***Джанджугазян Г. Н., Модянов Н. Н., Овчинников Ю. А.**Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина
Академии наук СССР, Москва*

Антитела (АТ) к Na⁺-K⁺-АТФ-азе из почек свиньи и ее субъединицам использовались в качестве высокоспецифических непроникающих реагентов для изучения пространственной организации молекулы фермента в плазматической мембране. Показано, что кроличьи АТ к Na⁺-K⁺-АТФ-азе специфичны к внутриклеточной области фермента, полностью ингибируют активность мембраносвязанного ферментного препарата и выявляют антигенные детерминанты только α-субъединицы. АТ, специфичные к внеклеточным участкам фермента, выделены путем иммуноадсорбции из голубиных антисывороток. Эти АТ ингибируют фермент и взаимодействуют с антигенными детерминантами обеих субъединиц — α и β. Наличие антигенных детерминант α-субъединицы на внешней поверхности мембраны доказано также с помощью АТ к ренатурированной α-субъединице. На основании трансмембранной организации α-субъединицы предпологается, что именно эта субъединица участвует в формировании катионпроводящего пути в молекуле Na⁺-K⁺-АТФ-азы.

Na⁺-K⁺-АТФ-аза плазматических мембран — высокомолекулярный интегральный мембранный белок, осуществляющий трансмембранный перенос одновалентных катионов, сопряженный с гидролизом АТФ. Этот фермент состоит из двух типов субъединиц: α (*M* 96 000) и β (молекулярный вес белковой части 40 000; углеводной — 7000) [1].

Установлено [2], что субъединицы входят в состав молекулы фермента в эквивалентных количествах. Имеющиеся в настоящее время данные о молекулярном весе фермента весьма противоречивы [3, 4], причем известно, что в состав его молекулы входит не менее двух α-субъединиц [5]. В мембране Na⁺-K⁺-АТФ-аза представляет собой глобулярные образования диаметром ~100 Å [6] и пронизывает ее, экспонируя участки белка как на наружной, так и на внутренней поверхностях мембраны. Структурные особенности белка — большой молекулярный вес, наличие в структуре локальных областей, экспонированных на противоположных поверхностях липидного бислоя, — обуславливают целесообразность применения АТ в качестве высокоспецифичных непроникающих реагентов для структурно-функциональных исследований Na⁺-K⁺-АТФ-азы.

С целью выяснения структурных основ активного транспорта одновалентных катионов нами начаты исследования строения и пространствен-

* Сообщение I см. [1]. Принятые сокращения: АТ — антитела, SDS — додецилсульфат натрия.

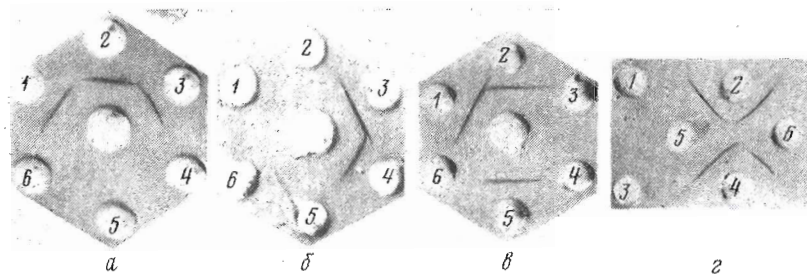


Рис. 1. Иммунодиффузия в агаровом геле. 1% гель содержит 0,5% тритон X-100, 150 мМ NaCl, 0,02% азид натрия, 50 мМ имидазол, pH 8,0/20° C; мембранные фракции (100 мкг белка), Na⁺-K⁺-АТФ-аза (10 мкг) и субъединицы (20 мкг) солиобилизованы 1% тритоном X-100. Лунки содержат: а) 1 — мембраны эритроцитов барана, 2 — Na⁺-K⁺-АТФ-азу, 3 — микросомную фракцию лимфоцитов мыши, 4—6 — контроль, в центре — кроличья антисыворотка к Na⁺-K⁺-АТФ-азе; б) 1 — β-, 2 — α-субъединицы фермента, 3 — Na⁺-K⁺-АТФ-аза, 4 — α', 5 — β'-субъединицы, 6 — контроль, в центре — кроличья антисыворотка к ферменту; в) антисыворотки к ферменту — голубиная (1), кроличья (2); контрольные сыворотки — голубиная (6), кроличья (3); кроличья антисыворотки к α- (4) и α'-субъединице (5), в центре — Na⁺-K⁺-АТФ-аза; г) 1 — β-, 2 — β', 3 — α- и 4 — α'-субъединицы, 5 — голубиная антисыворотка к ферменту, 6 — голубиные АТ к внеклеточной области фермента

ной организации в мембране Na⁺-K⁺-АТФ-азы из мозгового слоя почек свиньи. Методы выделения гомогенных препаратов фермента и его субъединиц описаны ранее [1]. В данной работе изучено взаимодействие АТ с областями фермента, экспонированными на внешней и внутренней поверхности мембраны, показано изменение антигенной структуры субъединиц в процессе их выделения и описаны условия ее восстановления.

Для изучения пространственной организации Na⁺-K⁺-АТФ-азы необходимо независимое исследование внутриклеточной и внеклеточной областей фермента, что требует выбора модельных систем, содержащих фермент в строго определенной ориентации. Такими моделями могли бы быть протеолипосомы и везикулы, а также интактные клетки. На возможность использования последних указывает консервативность антигенной структуры Na⁺-K⁺-АТФ-аз млекопитающих, выявленная по ингибированию фермента из различных источников АТ к очищенному препарату Na⁺-K⁺-АТФ-азы из почек собаки [7]. Однако ингибиторный анализ может дать информацию лишь о небольшом числе антигенных участков, поскольку популяция вырабатываемых АТ имеет широкий спектр специфичности и ингибирующими свойствами обладают только некоторые их фракции [8, 9]. Поэтому сравнительный анализ различных препаратов Na⁺-K⁺-АТФ-аз мы проводили методом иммунодиффузии по Ухтерлони, позволяющим детектировать взаимодействие фермента с преципитирующими АТ.

Как видно из рис. 1а, АТ к Na⁺-K⁺-АТФ-азе из почек свиньи взаимодействуют с аналогичными ферментами из эритроцитов барана и лимфоцитов мыши, что доказывает близость антигенной структуры этих Na⁺-K⁺-АТФ-аз. Полученные результаты позволили выбрать эритроциты и лимфоциты (клетки, являющиеся стандартными объектами иммунохимических исследований) в качестве модели при изучении внеклеточной области фермента. Для изучения внутриклеточной области были использованы полученные по ранее описанному методу [10] протеолипосомы, содержащие фермент в ориентации, обратной его ориентации в клетке.

При изучении связывания кроличьих АТ к Na⁺-K⁺-АТФ-азе из почек свиньи с ферментом (рис. 2) было обнаружено, что емкость связывания АТ с Na⁺-K⁺-АТФ-азой как в мембраносвязанном препарате фермента (кривая 1), так и в протеолипосомах (кривая 2) одинакова; АТ не вызывают ни агглютинации эритроцитов (рис. 3, ряд 2), ни лизиса их комплементом, т. е. не обнаруживают взаимодействия с внеклеточной обла-

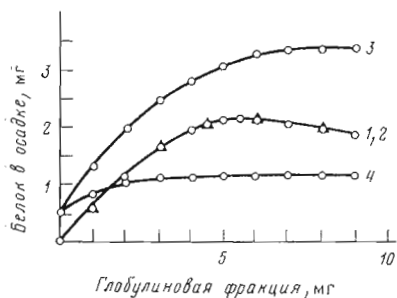


Рис. 2. Иммунопреципитация антителами к $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-АТР-азе}$ мембраносвязанной формы фермента (1), протеолизом «inside-out» (2) и связывание АТ против $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-АТР-азы}$ (3) и α -субъединицы (4) с мембраносвязанной формой фермента

стью фермента. Таким образом, кроличьи АТ к ферменту вырабатываются на его участки, экспонированные на внутренней поверхности мембраны. Этот вывод подтверждается тем, что кроличьи АТ ингибируют «натриевый насос» эритроцитов только при введении их внутрь «тений» [11]. Результаты количественной преципитации (рис. 2) позволяют оценить минимальное количество антигенных детерминант на внутриклеточной области фермента: в условиях избытка АТ с 0,5 мг АТР-азы связывается 2,9 мг АТ (кривая 3); в условиях проявления бивалентности АТ и максимальной преципитации (кривая 1) с тем же количеством фермента связывается 1,6 мг АТ. АТ, вырабатывающиеся при повторной иммунизации, относятся к классу IgG ($M \sim 160\,000$) [12]. Следовательно, с внутриклеточной областью мономера АТР-азы $\alpha\beta$ ($M\ 136\,000$) связывается 4–5 молекул IgG, что свидетельствует о значительных размерах этой области белка.

Взаимодействие $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-АТР-азы}$ с кроличьими АТ к ферменту вызывает полное подавление АТР-азной активности (таблица). Степень ингибирования фермента зависит не только от количества АТ в среде, но и от длительности их инкубации с ферментом. Так, количество АТ, вызывающее 50% ингибирование АТР-азной активности, резко уменьшается с увеличением времени инкубации (рис. 4, 1 и 3), причем такая закономерность наблюдается и при инкубации в средах с различным сочетанием лигандов (Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , АТР, P_i), недостаточных для полной АТР-азной реакции. Это означает, что полное ингибирование определяется не только быстрым процессом взаимодействия АТ с соответствующими детерминантами, но и медленным процессом агглютинации и образования преципитационной решетки. Образование такой жесткой трехмерной структуры может уменьшать доступ субстрата к активному центру, что отражается в изменении K_m для субстрата [13], или ограничивать подвижность отдельных участков белка, если она имеет функциональную значимость [8]. Первое из этих предположений не подтверждается при сравнении графиков Лайнуи-

Максимальное ингибирование мембраносвязанной $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-АТР-азы}$ различными препаратами АТ

№	Препарат АТ	Ингибирование, %
1	Кроличьи АТ: к $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-АТР-азе}$	100
2	Fab-фрагменты тех же АТ	56
3	к α -субъединице	0
4	к β -субъединице	0
5	к α' -субъединице	52
6	к β' -субъединице	0
7	Голубиные АТ: к $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-АТР-азе}$	70
8	к внеклеточной области фермента	48

Примечание. Препараты субъединиц α , β и α' , β' различаются по способу удаления SDS (см. «Экспериментальную часть»). Среднеквадратичная ошибка не превышает 3%.

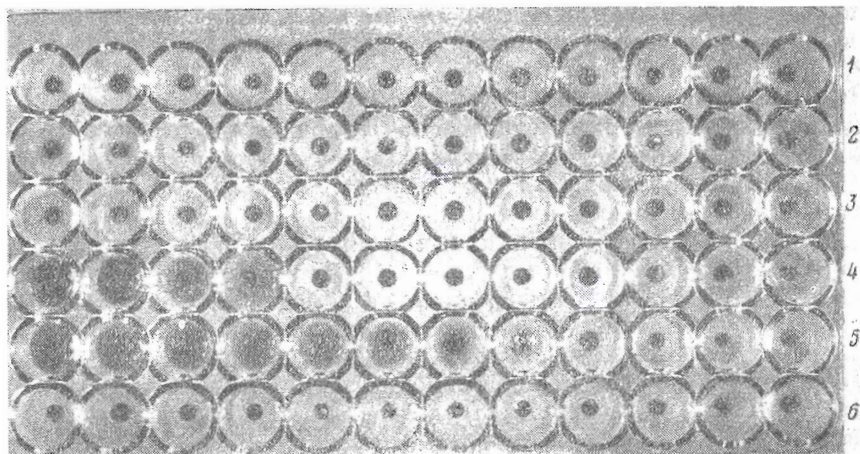


Рис. 3. Реакции прямой геммагглютинации. Каждый ряд лунок содержит 5 мкл суспензии бараньих эритроцитов и (слева направо) двукратные или четырехкратные (ряд 5) разведения соответствующей сыворотки, начиная от $1/4$; контрольные сыворотки: 1 — кроличья, 6 — голубиная; антисыворотки к ферменту: 2 — кроличья, 5 — голубиная; кроличьи антисыворотки: 3 — к α - и 4 — к α' -субъединицам

вера — Берка (рис. 5) для исходного фермента и препарата, активность которого на 50% подавлена АТ.

Таким образом, более обоснованно предположение об ограничении в агрегационной структуре функционально необходимой подвижности фермента. Для проверки этого предположения проведен сравнительный анализ ингибирования АТР-азной активности в следующих комплексах фермент — АТ, различающихся по жесткости образуемой структуры: мембраносвязанный препарат — нативные АТ; препарат, солибилизированный 0,05% тритоном X-100 без изменения антигенных свойств [11] — нативные АТ; мембраносвязанный препарат — Fab-фрагменты АТ. Оказалось, что стационарный уровень ингибирования (56%) фермента Fab-фрагментами в отличие от нативных АТ устанавливается в течение нескольких минут и не возрастает при длительной (24 ч) инкубации. Только в случае взаимодействия мембраносвязанного фермента с нативными, бивалентными АТ, т. е. в условиях максимального ограничения подвижности фермента кластеризацией на мембране и образованием агрегационных комплексов, наблюдалось полное ингибирование фермента (см. таблицу). При взаимодействии таких АТ с солибилизированным препаратом $\text{Na}^+ \text{--} \text{K}^+ \text{--} \text{АТР-азы}$ максимальное ингибирование АТР-азной реакции составляло 64%. По литературным данным [14, 15], АТ также не вызывали полного ингибирования солибилизированных препаратов фермента. Более того, АТ к выделенной в солибилизованном состоянии $\text{Na}^+ \text{--} \text{K}^+ \text{--} \text{АТР-азе}$ из почек собаки ингибировали мембраносвязанную АТР-азу эритроцитов человека в большей степени (100%), чем антиген (60%) [16].

Таким образом, функционирование фермента сопряжено с изменением пространственной организации его участков, экспонированных на внутренней поверхности мембраны, которое ограничивается при образовании комплексов бивалентными АТ. Существование $\text{Na}^+ \text{--} \text{K}^+ \text{--} \text{АТР-азы}$ в различных конформационных состояниях было ранее убедительно показано различными способами, включая ограниченный протеолиз [17] и спектральные исследования [18] фермента в присутствии различных сочетаний лигандов, недостаточных для полной АТР-азной реакции и моделирующих ее промежуточные стадии. Однако в «неполных средах» из метастабильных состояний могут образовываться стабильные конформации, не имеющие место в неостановленном АТР-азном цикле [19]. Наши результаты подтверждают,

что процесс функционирования $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$ -азы сопряжен с изменением структурной организации участков фермента, экспонированных на внутренней поверхности мембраны.

Полная диссоциация фермента на субъединицы происходит только в присутствии додецилсульфата натрия (SDS), однако выделенные субъединицы, освобожденные от SDS диализом в присутствии даукса AG1X8 [20], не взаимодействуют с АТ к ферменту (рис. 1б), а АТ к таким субъединицам образуют полосы преципитации с соответствующими субъединицами, но не с целым ферментом и не изменяют его АТР-азную активность (см. таблицу). В то же время, как показывает измерение количества связанных АТ (рис. 2, 4), с 0,5 мг фермента взаимодействует 0,6 мг АТ к выделенной α -субъединице, т. е., как и в случае фермента из почек собаки [21], эти АТ взаимодействуют с нативной α -субъединицей в составе фермента только по одной антигенной детерминанте. Взаимодействие с ферментом АТ к β -субъединице не удалось выявить ни одним из этих методов. Таким образом, в процессе выделения субъединиц в присутствии SDS происходит нарушение антигенных детерминант, присущих нативному белку.

При удалении SDS (для этого белок осаждали из растворов SDS ацетоном и осадок растворяли в 6 М гуанидинхлориде с последующим диализом) антигенная структура α -субъединицы частично восстанавливается. Этот вывод основан на следующем: АТ к ферменту образуют полосу преципитации с такой α -субъединицей (α' -субъединица) (рис. 1б), а АТ к α' -субъединице взаимодействуют с ферментом (рис. 1в) и ингибируют его АТР-азную активность (см. таблицу). Восстановление антигенной структуры α -субъединицы позволяет использовать АТ к α' -субъединице для изучения пространственной организации этой субъединицы в мембранно-связанном препарате фермента.

Известно, что α -субъединица участвует в гидролизе АТР [22], т. е. имеет участки, обращенные в цитоплазму клетки. Установлено, что некоторые участки β -субъединицы, в том числе и N-концевой, экспонированы на внешней поверхности плазматической мембраны [4]. Вблизи этой поверхности, как следует из результатов связывания фотоаффинных аналогов кардиоактивных стероидов [23], локализованы участки α -субъединицы. Чтобы выяснить, имеет ли α -субъединица участки, экспонированные на поверхности клетки, с помощью гемагглютинации и лизиса системой комплемента изучали взаимодействие АТ к α' -субъединице с областью фермента, экспонированной на внешней поверхности мембраны. Из рис. 3 (ряд 4) следует, что в присутствии АТ к α' -субъединице происходит агглютинация бараньих эритроцитов, содержащих (рис. 1а) $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$ -азу, иммунохимически подобную ферменту из почек свиньи. Специфическое связывание АТ к α' -субъединице с внешней поверхностью мембраны эритроцитов вызывает их лизис системой комплемента, измеряемый по количеству гемоглобина во внеклеточной среде (рис. 6). Аналогичный результат наблюдается и при взаимодействии АТ к α' -субъединице с мышинными лимфоцитами. Таким образом, с помощью двух независимых методов — агглютинации и лизиса комплементом — показано, что часть антигенных детерминант α -субъединицы локализована на внешней поверхности плазматической мембраны.

Кроличьих АТ, полученные к β -субъединице, освобожденной от SDS теми способами, что и в случае α -субъединицы, образовывали полосу преципитации с антигеном, однако взаимодействия АТ с целым ферментом не наблюдалось, поэтому АТ к β - и β' -субъединицам не удалось использовать для исследования топографии фермента. Этот результат не является неожиданным, поскольку ни к выделенной β -субъединице $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$ -азы млекопитающих [21], ни к участкам молекулы фермента, локализованым на внешней поверхности мембраны [11], кроличьих АТ получить не удавалось. Неиммуногенность участков β -субъединицы, экспонирован-

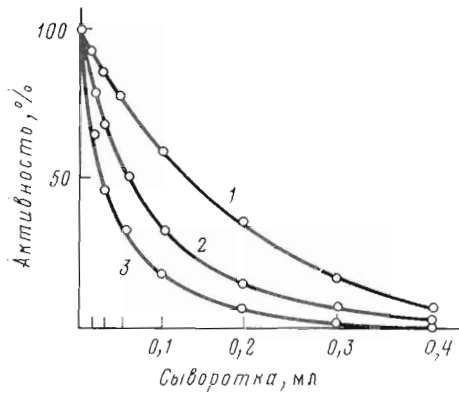


Рис. 4

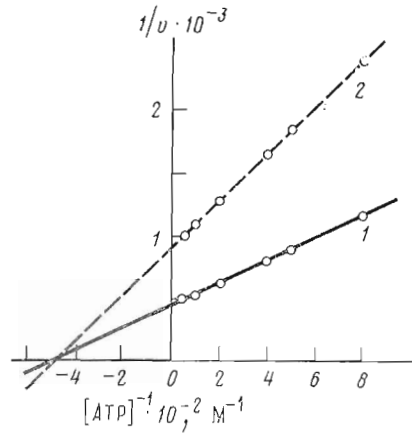


Рис. 5

Рис. 4. Ингибирование $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-АТФ}$ -азы антителами к ферменту. Указанное количество сыворотки с 50 мкг фермента инкубировали: 1 — 15 мин при 37°C , 2 — 1 ч при 37°C , 3 — 1 ч при 37°C и 24 ч при 4°C

Рис. 5. Зависимость скорости АТФ-азной реакции от $[\text{АТФ}]$ для нативного фермента (1) и его комплекса с антителами (2). $[\text{Mg}^{2+}] / [\text{АТФ}] = 2$

Рис. 6. Лизис эритроцитов системой комплемента под действием АТ к α' -субъединице. Бараньи эритроциты (20 мкл) вначале инкубировали с указанным на рисунке количеством иммунной сыворотки, затем — с сывороткой, содержащей систему комплемента

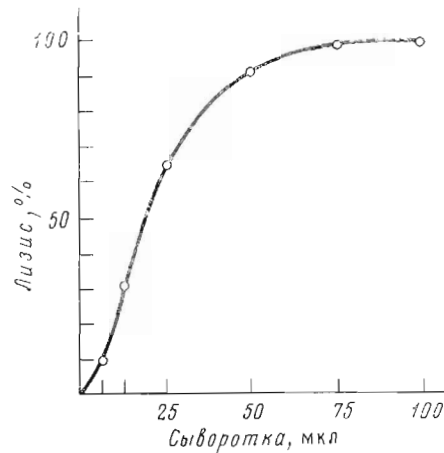


Рис. 6

ных во внеклеточное пространство, можно объяснить консервативностью фермента.

Действительно, только в случае иммунизации кроликов β -субъединицей эволюционно далеких видов (акула, электрический угорь) образовывались АТ, взаимодействующие с ферментом и ингибирующие его активность [14, 24]. Поэтому для получения АТ к внеклеточной области $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-АТФ}$ -азы из почек свиньи мы попытались использовать в качестве объекта иммунизации голубей (*Columbae*, *Columba livia*). Помимо эволюционной отдаленности выбор объекта иммунизации определяется тем, что оптимальные условия преципитации как для голубиных, так и для кроличьих АТ совпадают [25], и, таким образом, сравнение взаимодействия фермента с обоими видами АТ можно проводить в идентичных условиях.

Было обнаружено, что в голубиных антисыворотках к ферменту содержатся АТ, ингибирующие его активность (см. таблицу). При иммунодиффузии голубиные АТ, как и кроличьи, образуют единственную полосу преципитации, однако спектр антигенных детерминант перекрывается лишь частично, о чем свидетельствует кривая неполной идентичности между лунками 1 и 2 (рис. 1а), а также взаимодействие голубиных АТ с обеими субъединицами фермента (рис. 1а, лунки 2, 4, 5). О наличии в голубиных иммунных антисыворотках АТ к участкам $\text{N}^+\text{-K}^+\text{-АТФ}$ -азы, экспонированным на внешней поверхности мембраны, свидетельствуют результаты гем-агглютинации (рис. 3, ряд 5). Эта фракция была выделена из голубиных

антисывороток с помощью иммуноадсорбции на бараньих эритроцитах (см. «Экспериментальную часть»).

Интересно, что, хотя каталитический центр фермента локализован на внутренней стороне мембраны, взаимодействие АТ, специфичных к наружной поверхности фермента, ингибировало его АТР-азную активность. При иммунодиффузии эта фракция голубиных АТ образовывала полосу преципитации с каждой из выделенных субъединиц, освобожденной от SDS по методу II (рис. 1а, лунки 2, 4, 6), т. е. антигенные детерминанты области фермента, экспонированной на внешней поверхности мембраны, формируются участками обеих субъединиц: α и β . Этот результат подтверждает сделанный выше вывод о том, что α -субъединица продуцирует плазматическую мембрану и имеет антигенные участки на обеих ее сторонах.

Таким образом, с помощью иммунохимических методов показано, что АТ, специфичные к внутриклеточной области фермента, выявляют антигенные детерминанты только α -субъединицы, в то время как в формировании антигенных детерминант внеклеточной области фермента участвуют оба типа субъединиц — α и β . На основании трансмембранной организации α -субъединицы в плазматической мембране можно предположить, что участки полипептидной цепи этой субъединицы являются необходимыми структурными элементами катионпроводящего пути в молекуле $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -АТР-азы.

Экспериментальная часть

В работе использованы следующие реагенты: АТР (Reanal, Венгрия), оубаин (Calbiochem, США), холат, дезоксихолат, SDS, тритон X-100 (Serva, ФРГ), папаин (Worthington, США), протени А — сефароза (Pharmacia, Швеция).

Выделение фермента и его субъединиц, определение белка, АТР-азной активности, электрофорез в полиакриламидном геле в присутствии SDS и иммунодиффузию по Ухтерлони проводили, как описано в предыдущей работе [1].

SDS из препаратов субъединиц удаляли по одному из двух методов: 1) диализовали в присутствии дауэкса AG1×8 в течение 72 ч [20]; 2) белок осаждали 90% ацетоном, осадок дважды отмывали ацетоном и растворяли в 6 М гуанидинхлориде, содержащем 30 мМ гистидин (рН 7,5), полученный раствор диализовали 1 сут против 30 мМ гистидинового буфера, содержащего 0,15 М NaCl.

Липиды из фракции плазматических мембран экстрагировали по методу Фолча [26], для приготовления липосом высушенные на ротаторном испарителе липиды растворяли в 1% холате натрия и детергент удаляли диализом. Протелипосомы, содержащие $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -АТР-азу в ориентации, обратной ее ориентации в клетке, готовили из выделенного препарата фермента и хроматографически чистого яичного лецитина методом быстрого разбавления [10].

Получение антисывороток. Каждым из антигенов (ферментом и его субъединицами) в течение 4 мес иммунизировали по методу [27] в лимфоузлы группы из 3 кроликов (использовали сыворотки, полученные в конце срока иммунизации). Для получения голубиных антисывороток группу из 3 голубей (самцов) еженедельно иммунизировали ферментом по методу [28] (использовали сыворотку после 5-й иммунизации). В обоих случаях контрольной была сыворотка той же группы птиц или кроликов до иммунизации. Полученные сыворотки для инактивации системы компонента прогревали 30 мин при 56° С. Поскольку антиген — липопротеидный комплекс, во избежание присутствия в сыворотке липидспецифичных АТ [21] все сыворотки инкубировали с липосомами, приготовленными из липидов плазматических мембран почек, в соотношении 5 мг липида — 10 мл сыворотки в течение 30 мин при 37° С и далее 1 сут при 4° С. Затем

липосомы осаждали центрифугированием в течение 1 ч при 40 000 об./мин (Beckman, Spinco, ротор SW-41,4).

Глобулиновую фракцию, содержащую АТ, выделяли ступенчатым осаждением сульфатом натрия по методу [29].

Выделение АТ методом иммуноадсорбции проводили по методу [7] следующим образом: 30 мл иммунной сыворотки и 15 мг $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-АТР}$ -азы инкубировали 30 мин при 37° С и далее 1 сут при 4° С, затем по 5 мл этой смеси в 6 пробирках ротора SW-41,4° (Beckman, Spinco) наклоняли на 7 мл раствора 0,15 М NaCl и 30 мМ гистидина, рН 7,5 (буфер А), содержащего 0,25 М сахарозу, и центрифугировали 1 ч при 40 000 об./мин. После промывания осадка буфером А (30 мин, 40 000 об./мин) комплекс антиген — АТ диссоциировали инкубацией в 1 мл 10 мМ глицинового буфера (рН 2,8), содержащего 150 мМ NaCl, в течение 30 мин при 20° С. Полученную смесь наклоняли на 4 мл буфера А, содержащего 0,25 М сахарозу, и центрифугировали 30 мин при 50 000 об./мин (Beckman, Spinco, ротор SW-50,1). После центрифугирования отбирали верхние 1,5 мл, содержащие десорбированные АТ. рН отобранной фракции нейтрализовали добавлением сухого триса и фракцию элюированных АТ диализовали против буфера А в течение 12 ч при 4° С.

Для определения количества АТ, взаимодействующих с ферментом, комплекс АТ с мембраносвязанным препаратом фермента осаждали аналогичным образом (рис. 2, 1 и 3).

Голубиные АТ к виеклеточной области фермента выделяли методом иммуноадсорбции на эритроцитах по тому же принципу. Суспензию бараньих эритроцитов (10 мл), полученную стерильно смешиванием равных объемов крови и раствора Олсвера, трижды отмывали 75 мМ натрий-фосфатным буфером, рН 7,2, содержащим 75 мМ NaCl (буфер Б), осаждая эритроциты центрифугированием в течение 16 мин при 3000 об./мин, ресуспендировали в первоначальном объеме буфера Б и к полученной суспензии клеток добавляли 2 мл голубиной антисыворотки против фермента.

После инкубации (30 мин при 37° С и 2 ч при 4° С) к смеси добавляли сахарозу до конечной концентрации 5% и клетки осаждали центрифугированием (3000 об./мин, 10 мин, 4° С). Целостность эритроцитов в процессе иммуноадсорбции контролировали, измеряя количество гемоглобина (D_{417}) в супернатанте. После двукратного отмывания клеток буфером Б, содержащим 5% сахарозу, связанные с эритроцитами АТ элюировали инкубацией (15 мин при 4° С) в 5 мл 0,1 М глицинового буфера (рН 2,8), содержащего 0,15 М NaCl и 5% сахарозу. Клетки осаждали центрифугированием. После нейтрализации рН добавлением сухого триса надосадочную жидкость, содержащую элюированные АТ, концентрировали до 1 мл диализом против раствора полиэтиленгликоля (M 6000) и затем диализовали против буфера А. Для контроля неспецифической адсорбции использовали голубиную неиммунную сыворотку и кроличью иммунную сыворотку против фермента.

Fab-фрагменты кроличьих АТ, выделенных путем иммуноадсорбции на ферментном препарате, получали по методу [30]. 5 мг выделенных АТ диализовали 12 ч при 4° С против 0,1 М натрий-фосфатного буфера (рН 7,0), содержащего 1 мМ β -меркаптоэтанол и 2 мМ EDTA, затем добавляли 0,25 мл вапайна и смесь инкубировали 16 ч при 37° С в атмосфере азота. Гидролизат диализовали 48 ч при 4° С против бидистиллята, затем 24 ч против 0,1 М натрий-фосфатного буфера (рН 7,2) и хроматографировали в том же буфере на протени А — сефарозе для удаления Fc-фрагментов и нативных АТ [31]. Отсутствие во фракции Fab-фрагментов негидролизованых АТ контролировали с помощью электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии SDS без обработки образца восстанавливающими реагентами.

Прямая гемагглютинация. 5 мкл бараньих эритроцитов (10^9 клеток/мл) инкубировали с последовательными двух- или четырехкратными разведе-

ниями соответствующей сыворотки буфером А. Реакцию проводили 2 ч в объеме 0,2 мл при 20°С [32] (рис. 3).

Гемолиз эритроцитов под действием кроличьей системы комплемента проводили по методу [33]. Бараньи эритроциты (20 мкл) инкубировали 30 мин при 37°С в 0,1 мл буфера Б с указанным на рис. 6 количеством соответствующей сыворотки или ее глобулиновой фракции. Эритроциты осаждали (3000 об./мин, 15 мин) и к осадку в качестве источника комплемента добавляли 0,5 мл неиммунной кроличьей сыворотки, разведенной в 5 раз буфером Б, содержащим 5 мМ MgCl₂ и 1,5 мМ CaCl₂. После инкубации (2 ч при 20°С) к смеси добавляли 1,4 мл того же буфера и клетки осаждали центрифугированием (15 мин при 7000 об./мин). Количество гемоглобина, пропорциональное количеству лизированных эритроцитов, определяли в среде после осаждения клеток по поглощению при 417 или 541 нм. Поглощение, соответствующее 100% лизису, определяли после осмотического шока эритроцитов, вызванного добавлением дистиллированной воды, содержащей 0,1% дезоксихолат натрия, вместо изотонического буфера Б. Контролями специфичности реакции служили следующие пробы: 1) контрольная сыворотка тех же животных вместо иммунной; 2) система комплемента, инактивированная нагреванием при 56°С в течение 30 мин; 3) реакция без добавления MgCl₂ и CaCl₂ в присутствии 10 мМ EDTA.

Мембраны эритроцитов [34] и микросомную фракцию лимфоцитов [35] получали после разрушения клеток осмотическим шоком.

Максимальное ингибирование Na⁺-K⁺-АТФ-азы (таблица, рис. 4) при ее взаимодействии с нативными АТ и их Fab-фрагментами определяли после инкубации фермента при постоянном объеме с возрастающими количествами АТ или Fab-фрагментов в течение 30 мин при 37°С и далее 1 сут при 4°С. Инкубацию проводили в 30 мМ гистидиновом буфере (рН 7,5), содержащем, как обычно, 0,15 М NaCl, или в средах, содержащих, кроме буфера, следующие лиганды (мМ): АТР — 3; MgCl₂ — 3; АТР — 3, MgCl₂ — 3, NaCl — 130; P_i — 10; KCl — 20. Фермент в контрольных пробах инкубировали с соответствующими лигандами в присутствии отнализированных против этих растворов контрольных сывороток или контрольной глобулиновой фракции. АТФ-азную реакцию проводили согласно [1] в среде, содержащей (мМ): NaCl — 130, KCl — 20, MgCl₂ — 5, АТР — 3, гистидин — 30 (рН 7,5). Кинетику ингибирования Na⁺-K⁺-АТФ-азы Fab-фрагментами АТ определяли в той же среде, содержащей 3 мМ гистидин вместо 30 мМ, путем потенциометрического измерения скорости закисления среды ортофосфорной кислотой, образующейся в процессе АТФ-азной реакции [36].

Авторы глубоко признательны Е. В. Сидоровой за помощь и советы на начальных этапах данной работы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Джанджузаян К. Н., Модянов Н. Н., Овчинников Ю. А. Na⁺-K⁺-аденозинтрифосфатаза из почек свиньи. I. Выделение и химическая характеристика фермента и его субъединиц. — Биоорганич. химия, 1981, т. 7, № 6, с. 847–857.
2. Джанджузаян К. Н. Na⁺-K⁺-АТФ-аза почек свиньи: субъединичный состав и химическая характеристика субъединиц. — Тез. научн. сообщ. IV Всес. биохимического съезда. Л.: Наука, 1979, т. 2, с. 33.
3. Esmann M., Skou J. C., Christiansen C. Solubilization and molecular weight determination of the (Na⁺ + K⁺)-ATPase from rectal gland of *Squalus acantias*. — Biochim. et biophys. acta, 1979, v. 567, № 2, p. 410–420.
4. Hastings D. F., Reynolds J. A. Molecular weight of (Na⁺, K⁺) ATPase from shark rectal gland. — Biochemistry, 1979, v. 18, № 5, p. 817–820.
5. Giotta G. J. Quaternary structure of (Na⁺-K⁺)-dependent adenosine triphosphatase. — J. Biol. Chem., 1976, v. 251, № 5, p. 1247–1252.
6. Демин В. В., Барнаков А. А., Джанджузаян К. Н., Василова Л. А. Исследование мембранных белков методом электронно-микроскопической криофрактографии. I. Ультроструктурная организация Na⁺-K⁺-АТФ-азы в плазматических мембранах и протеолипосомах. — Биоорганич. химия, 1981, т. 7, № 12, с. 1783–1789.

7. McCans J. L., Linder Mayer G. E., Pitts B. J. R., Ray M. V., Raynor B. D., Butler V. P., Jr., Schwartz A. Antigenic differences in $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ preparations isolated from various organs and species.— *J. Biol. Chem.*, 1975, v. 250, № 18, p. 7257–7265.
8. Cinader B. Enzyme – antibody interactions.— In: *Methods in immunology and immunochemistry*/Eds Williams C. A., Chase M. W. New York – San Francisco – London: Acad. Press, 1977, v. 4, p. 313–375.
9. Наградова Н. К., Гроздова М. Д. Применение иммунохимических методов в энзимологии.— *Биохимия*, 1977, т. 42, № 7, с. 1155–1166.
10. Василова Л. А., Джанджузаян К. П., Модянов Н. Н. Изучение $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP-азы}$ в протеолипосомах.— Матер. VIII Всес. совещания по транспортным АТР-азам. Тарту, 1980.
11. Jorgensen P. L., Hansen O., Glynn I. M., Caviers J. D. Antibodies to pig kidney $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$ inhibit the sodium pump in human red cells provided they have access to the inner surface of the cell membrane.— *Biochim. et biophys. acta*, 1973, v. 291, № 3, p. 795–800.
12. Купер Э. Сравнительная иммунология. М.: Мир, 1980, с. 302–305.
13. Oppenheim J. D., Nachbar M. S. Immunochemistry of bacterial ATP-ase.— In: *Immunochemistry of enzymes and their antibodies*/Ed. Salton M. R. J. New York – London – Sydney – Toronto: John Wiley, 1977, p. 89–124.
14. Jean D. H., Albers R. W., Koval G. J. Sodium-potassium activated adenosine triphosphatase of electrophorus electric organ (immunological properties).— *J. Biol. Chem.*, 1975, v. 250, № 3, p. 1035–1040.
15. Smith T. W., Wagner H. Effects of $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$ specific antibodies on enzymatic activity and monovalent cation transport.— *J. Membrane Biol.*, 1975, v. 25, № 3/4, p. 341–360.
16. Smith T. W. Discussion.— *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1974, v. 242, p. 382–383.
17. Jorgensen P. L. Purification and characterization of the $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$. VI. Differential tryptic modification of catalytic functions of the purified enzyme in presence of NaCl and KCl.— *Biochim. et biophys. acta*, 1976, v. 466, № 1, p. 97–109.
18. Karlisch S. J. D., Yates D. W. Tryptophan fluorescence of $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$ as a tool for study of the enzyme mechanism.— *Biochim. et biophys. acta*, 1978, v. 527, № 1, p. 115–130.
19. Whittam R., Chipperfield A. R. The reaction mechanism of the sodium pump.— *Biochim. et biophys. acta*, 1975, v. 415, № 2, p. 149–171.
20. Hopkins B. E., Wagner H., Jr., Smith T. W. Sodium- and potassium-activated adenosine triphosphatase of the nasal salt gland of the duck (*Anas platyrhynchos*).— *J. Biol. Chem.*, 1976, v. 251, № 14, p. 4365–4371.
21. Kyte J. The reaction of sodium- and potassium-ATPase with specific antibodies. Implications for the mechanism of active transport.— *J. Biol. Chem.*, 1974, v. 249, № 11, p. 3652–3660.
22. Kyte J. Purification of the sodium- and potassium-dependent adenosine triphosphatase from canine renal medulla.— *J. Biol. Chem.*, 1971, v. 246, № 13, p. 4157–4165.
23. Ruoho A., Kyte J. Photoaffinity labelling of the ouabain-binding site on $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-adenosinetriphosphatase}$.— *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1974, v. 71, № 6, p. 2352–2356.
24. Rhee H. M., Hokin L. E. Inhibition of the purified sodium-potassium activated adenosinetriphosphatase from the rectal gland of *Squalus acanthias* by antibody against the glycoprotein subunit.— *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, 1975, v. 63, № 4, p. 1139–1145.
25. Benedict A. A., Yamada K. Immunoglobulins and antibody production in avian species.— In: *Comparative immunology*/Ed. Marchalonis J. J. Oxford: Blackwell Scientific Publ., 1976, p. 335–375.
26. Кейрс М. Экстракция липидов.— *Техника липидологии*. М.: Мир, 1975, с. 72–77.
27. Сидорова Е. В., Трудолобова М. Г. Иммунохимический метод выделения индивидуальных полирибосом.— В кн.: *Современные методы в биохимии*/Ред. Орехович Н. Н. М.: Медицина, 1977, с. 293–299.
28. Guttman R. M., Tebo T., Edwards J., Barböriak J. J., Fink J. N. The immune response of the pigeon (*Columba livia*).— *J. Immunol.*, 1971, v. 106, № 2, p. 392–396.
29. Брок П. Выделение иммуноглобулина G.— В кн.: *Иммунологические методы*/Ред. Фримель Х. М.: Мир, 1979, с. 265.
30. Porter R. R. The hydrolysis of rabbit γ -globulin and antibodies with crystalline papain.— *Biochem. J.*, 1959, v. 73, p. 119–127.
31. Hjelm H., Sjöquist Y. Использование и иммобилизованного протеина А из *Staphylococcus aureus* для выделения и изучения иммуноглобулинов.— В кн.: *Иммуносорбенты в очистке белков*/Ред. Руослахти Э. М.: Медицина, 1979, с. 77–87.
32. Herbert W. J. Passive haemagglutination with special reference to the tanned cell technique.— In: *Handbook of experimental immunology*/Ed. Weir D. H. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1979, p. 20.1–20.20.
33. Lachman P. J., Hobart M. J. Complement technology.— In: *Handbook of experimental immunology*/Ed. Weir D. H. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1979, p. 5A.1–5A.23.

34. *Steck T. L.* Preparation of impermeable inside-out and right-side-out vesicles from erythrocyte membranes.— In: *Methods in membrane biology*/Ed. Korn E. D. New York — London: Plenum Press, 1974, v. 2, p. 250—252.
35. *Вернер X.* Выделение лимфоцитарных мембран.— В кн.: *Иммунологические методы*/Ред. Фримель X. М.: Мир, 1979, с. 244—245.
36. *Green J., Mammaerts W. F. H. II.* Adenosine triphosphatase systems of muscle. I. An electrotitrimetric method of measurement.— *J. Biol. Chem.*, 1953, v. 202, № 2, p. 541—549.

Поступила в редакцию
29.VI.1981

Na⁺-K⁺-ACTIVATED ADENOSINE TRIPHOSPHATASE FROM PIG KIDNEY. II. IMMUNOCHEMICAL APPROACHES TO THE ENZYME TOPOGRAPHY

DZHANDZHUGAZYAN K. N., MODYANOV N. N., OVCHINNIKOV Yu. A.

*M. M. Shemyakin Institute of Biorganic Chemistry, Academy
of Sciences of the USSR, Moscow*

Spatial organization in the membrane of Na⁺-K⁺-ATPase from pig kidney was studied using antibodies to the enzyme and its subunits as a highly specific impermeable reagent. It was shown that rabbit antibodies against Na⁺-K⁺-ATPase are specific to the enzyme region exposed on the inner surface of the cell membrane, completely abolish catalytic activity and recognize antigenic determinants of the α -subunit only. The fraction of antibodies specific to enzyme region of the outer membrane surface was isolated from pigeon antiserum to the enzyme by the immunoadsorption technique. This fraction of antibodies inhibits the catalytic activity and reacts with antigenic determinants of both subunits — α and β . Localization of antigenic determinants of the α -subunit on the outer surface of the cell membrane was proved also using the antibodies against this renatured subunit. Basing on the transmembrane spatial organization of the α -subunit, it is assumed that it is the α -subunit that participates in the formation of cation-specific transmembrane pathway in the enzyme molecule.
