



УДК 547.962.02:577.112.5

ОГРАНИЧЕННЫЙ ТРИПСИНОЛИЗ α -АКТИНИНА И РАСПРЕДЕЛЕНИЕ СУЛЬФИДРИЛЬНЫХ ГРУПП ПО ФРАГМЕНТАМ МОЛЕКУЛЫ

*Куридзе Б. Ш., Симонидзе М. Ш., Надирашвили Н. Ш.,
Заалишвили М. М.*

*Институт физиологии им. И. С. Бериташвили Академии наук ГССР,
Тбилиси*

Ингибирование α -актинаина с трипсином приводит к образованию нескольких фрагментов с M_r 55 000, 38 000, 30 000 и 15 000, сравнительно устойчивых к дальнейшему действию протеиназы. Из пяти экспонированных остатков цистеина, модифицируемых N-этилмалеимидом в полипептидной цепи субъединицы, два находятся во фрагменте с M_r 55 000, один – во фрагменте 30 000, а два, по-видимому, в участке полипептидной цепи, которая деградирует до мелких пептидов в результате действия трипсина. «Маскированные» SH-группы локализируются во фрагменте с M_r 30 000.

α -Актинин, первоначально обнаруженный в качестве минорного компонента скелетных мышц кролика [1], в настоящее время найден во всех мышечных и неммышечных двигательных системах, которые были испытаны на его присутствие (например, [2–4]). α -Актинин из скелетных мышц кролика имеет $M_r \sim 200\ 000$ и состоит из двух, скорее всего идентичных, полипептидных цепей [5]. Было показано, что α -актинины из сердечной мышцы крупного рогатого скота, скелетных мышц свиньи, мышцы желудка птиц, грудной мышцы птиц имеют одну и ту же C-концевую аминокислоту и ацетилированную N-концевую α -аминогруппу [6].

Бретшером с сотр. [7] было показано, что α -актинины из гладких и скелетных мышц цыплят значительно различаются по иммунологическим и некоторым химическим свойствам. Более того, Кобаяши с сотр. [8] показали, что α -актинины из различных скелетных мышц также отличаются друг от друга. Существование разных форм α -актинаина в скелетных мышцах обусловлено различиями в их первичной структуре. Эти различия должны быть небольшими, поскольку аминокислотные составы α -актининов из различных источников очень близки.

При определении сульфгидрильных групп в α -актинаине из сердечной мышцы крупного рогатого скота [5] и скелетных мышц кролика [9] в отсутствие денатурирующих агентов обнаруживаются шесть групп на 1 моль α -актинаина (принимая для α -актинаина M_r 200 000), а в денатурирующих условиях выявляется 16–18 сульфгидрильных групп на молекулу и не обнаруживаются дисульфидные связи.

Ранее нами было показано [9,10], что при модификации трех-четырех SH-групп α -актинаина на 60% уменьшается способность последнего увеличивать скорость полимеризации актина и создавать поперечные связи между α -актиновыми нитями. На основании этих данных можно предположить, что часть экспонированных SH-групп существенна для взаимодействия α -актинаина с F-актином или для взаимодействия субъединиц α -актинаина.

Данная работа посвящена изучению локализации экспонированных и «маскированных» сульфгидрильных групп в отдельных фрагментах молекулы α -актинаина из спинных мышц кролика. Нами использован метод ограниченного трипсинолиза, поскольку ранее было показано, что при

Сокращение: SDS – додецилсульфат натрия.

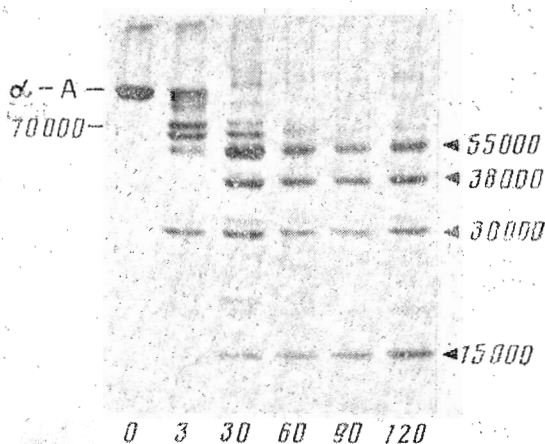


Рис. 1. Электрофорез в ПААГ в присутствии SDS смеси продуктов триптического гидролиза α -актинина (окрашивание кумасси бриллиантовым синим G-250). Цифры указывают время гидролиза в минутах. Концентрация белка 1,6 мг/мл в буфере, содержащем 0,5% NH_4HCO_3 (pH 8,1), 1 mM EDTA, 2 mM дитиотреит. Фермент-субстратное соотношение 1:30, 37° C

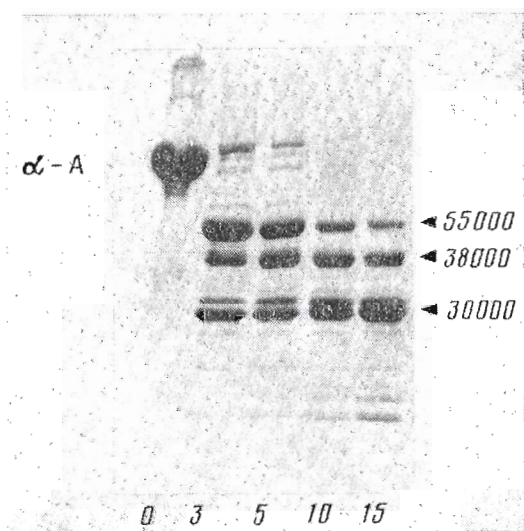


Рис. 2. Флуорография SDS-электрофореграммы в ПААГ продуктов трипсинолиза α -актинина, модифицированного N-этил- ^{14}C малеимидом. Концентрация белка 2 мг/мл в буфере 0,1 M трис-HCl с 2 mM EDTA, pH 8,0. Фермент-субстратное соотношение 1:50, 37° C (цифры указывают время гидролиза в минутах)

действию протеиназ на α -актинин в неденатурирующих условиях его молекула распадается на ограниченное число фрагментов [7].

На рис. 1 приведен ход триптического гидролиза α -актинина в зависимости от времени. Ход гидролиза мало зависит от концентрации α -актинина (0,5–2,5 мг/мл), фермент-субстратного соотношения (1:25–1:500), температуры реакции (25–43° C), а также от присутствия нейтральных солей и SH-защитных реагентов. В результате варьирования условий реакции изменяется скорость гидролиза α -актинина. Из кинетики гидролиза видно, что первоначально из исходной молекулы образуются фрагменты с M_r 70 000 и 30 000; последний наиболее устойчив к дальнейшему

Содержание экспонированных сульфгидрильных групп во фрагментах ограниченного трипсинолиза α -актинина

Полипептид $M_r \cdot 10^{-3}$	Площадь пика по денситограмме	Количество вещества		Удельная радиоактивность		Количество SH-групп, моль/моль
		мкг	нмоль	имп/(мин·нмоль)	имп/(мин·моль) SH-групп	
100	25 200	40,0	0,40	9625	1925	5
55	18 600	29,5	0,54	4030	1925	2,09(2)
38	30 700	48,7	1,28	2812	1925	1,46(1)
30	39 700	63,0	2,10	2362	1925	1,23(1)

протеолизу. Промежуточный фрагмент с M_r 70 000 быстро претерпевает ступенчатое расщепление с образованием фрагментов с M_r 55 000, 38 000 и 15 000. Таким образом, в результате ограниченного трипсинолиза субъединица молекулы α -актинина распадается на несколько сравнительно устойчивых фрагментов.

Полученные данные пока не позволяют расположить фрагменты по полипептидной цепи исходной молекулы, однако с помощью метода ограниченного трипсинолиза удалось выяснить распределение остатков цистеина в нативной молекуле белка, экспонированных или скрытых при образовании третичной структуры.

Для выяснения распределения экспонированных сульфгидрильных групп α -актинина был модифицирован N-этил- ^{14}C малеимидом в неденатурирующих условиях. Полнота модификации проверялась спектрофотометрически с помощью реактива Элмана. В выбранных условиях модификации в молекулу α -актинина было введено 10 N-этилмалеимидных групп (пять на одну полипептидную цепь). Радиоактивно меченный белок далее был подвергнут ограниченному трипсинолизу и ход гидролиза анализировался электрофорезом в ПААГ в присутствии SDS с последующей флуорографией полиакриламидного геля (рис. 2). Оказалось, что экспонированные остатки цистеина содержатся во всех фрагментах гидролизата.

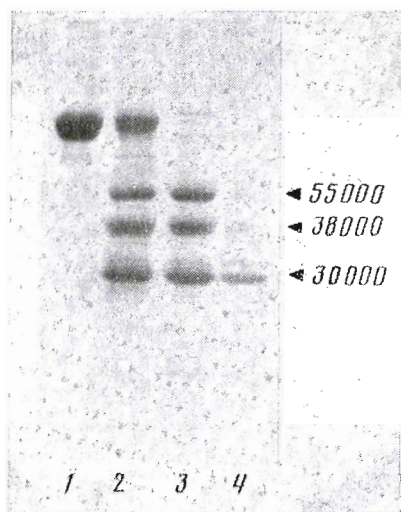
Для количественного определения распределения SH-групп в продуктах ограниченного трипсинолиза α -актинина, меченный N-этил- ^{14}C малеимидом по экспонированным SH-группам, был подвергнут ограниченному трипсинолизу в течение 10 мин в условиях предыдущего опыта и продукты гидролиза разделены электрофорезом в ПААГ в присутствии SDS. В качестве внутреннего стандарта к гидролизату был добавлен α -актинин, модифицированный N-этил- ^{14}C малеимидом, с известной концентрацией и удельной радиоактивностью. После электрофореза и окраски гель сканировали для определения количества каждого фрагмента и определяли количество радиоактивной метки в каждой полосе (таблица).

Таким образом, в результате количественного обсчета обнаружено, что фрагмент с M_r 55 000 содержит две экспонированные SH-группы, а фрагмент с M_r 30 000 — одну. Поскольку в исходном белке модифицируются пять остатков цистеина на полипептидную цепь, а во фрагментах содержится около трех остатков цистеина, то два цистеина, по-видимому, входят в состав мелких пептидов, являющихся продуктами деградации.

Для локализации «маскированных» остатков цистеина α -актинина был модифицирован в неденатурирующих условиях немеченым N-этилмалеимидом и затем подвергнут ограниченному трипсинолизу в течение 10 мин в условиях предыдущего эксперимента. Затем продукты ограниченного трипсинолиза после их денатурации SDS были обработаны N-этил- ^{14}C малеимидом и проанализированы электрофорезом в ПААГ в присутствии SDS с последующей флуорографией.

Оказалось (рис. 3), что все «маскированные» остатки цистеина локализованы во фрагменте с M_r 30 000. Из этих результатов следует, что основной фрагмент с M_r 30 000 не является продуктом деградации фрагмента с M_r 55 000, а возникает в результате отщепления от исходной полипептидной цепи.

Рис. 3. Флуорография SDS-электрофореграммы в ПААГ α -актинаина (1) и продуктов трипсинолиза α -актинаина, радиоактивно меченных N-этил-[^{14}C]малеимидом по экспонированным (2, 3) и «маскированным» (4) SH-группам. (Условия трипсинолиза — см. рис. 2; время инкубации 10 мин)



Из полученных данных ясно, что полипептидная цепь субъединицы α -актинаина имеет сложную структурную организацию и экспонированные сульфгидрильные группы распределены во всех фрагментах полипептидной цепи, а «внутренние» сконцентрированы только в одном фрагменте.

Экспериментальная часть

В работе использованы N-этил-[2,3- ^{14}C]малеимид (Amersham, Англия), 5,5'-дитиобис(2-нитро)бензойная кислота (Serva, ФРГ), трипсин (Worthington, США), сефадекс G-25 (Pharmacia, Швеция), набор реактивов для диск-электрофореза в полиакриламидном геле (Bio-Rad, США), рентгеновская пленка X-Omat (Kodak, США). Все остальные реактивы имели квалификацию ос. ч.

α -Актинин был получен из спиных мышц кролика по методу, описанному в работе [11].

Концентрацию белка определяли спектрофотометрически при 280 нм, принимая величину удельного поглощения для α -актинаина $A_{278}^{1\%}$ равной 9,71 [5].

Количество SH-групп определяли по методу, описанному в работе [12].

Электрофорез в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия проводили в градиенте концентрации полиакриламида 9–25% по методу Леммли [13]. Для определения молекулярных масс α -актинаина и фрагментов ограниченного трипсинолиза использовали стандартную смесь (в скобках приведена относительная молекулярная масса), содержащую фосфоорилазу Б (97 400), бычий альбумин (66 000), яичный альбумин (45 000), альдолазу (29 000), соевый ингибитор трипсина (20 100), α -лактальбумин (14 200).

Флуорографию полиакриламидных гелей проводили по методу, описанному в работе [14]. Экспозиция электрофореграммы продуктов трипсинолиза α -актинаина, меченного N-этил-[^{14}C]малеимидом по экспонированным SH-группам, составляла 120 ч, а для продуктов трипсинолиза α -актинаина, меченного по «маскированным» SH-группам, — 60 ч.

Сканирование окрашенных электрофореграмм для количественной оценки хода ограниченного трипсинолиза и распределения радиоактивной метки в продуктах трипсинолиза проводили на сканирующем спектрофотометре-флуориметре MQ-3 (Opton, ФРГ), снабженном интегратором 3373 В и калькулятором 9810 А (Hewlett-Packard, США).

Модификация SH-групп в α -актинаине N-этил-[^{14}C]малеимидом. Для модификации экспонированных SH-групп к раствору α -актинаина (4 мг/мл) в 5 мл 0,1 М трис-НСl-буфера, рН 8,0, 1 мМ EDTA добавляли 1 мл раствора (30 мкмоль) N-этил-[^{14}C]малеимида (уд. акт. 8,4 мКи/ммоль). Смесь инкубировали 30 мин при 25°С, затем реакцию останавливали до-

бавлением раствора дитиотрепта до концентрации 1 мМ (13 мкл 0,5 М раствора) и смесь обессоливали на колонке с сефадексом G-25, уравновешенным тем же буфером. Для модификации «маскированных» SH-групп реакцию проводили аналогично с немеченым N-этилмалеимидом, а затем в тех же условиях модифицировали продукты ограниченного трипсинолиза N-этил-[¹⁴C]малеимидом.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ebashi S., Ebashi F. J. Biochem., 1965, v. 58, № 1, p. 7-12.
2. Schollmeyer J. E., Goll D. E., Tilney L., Mooseker M., Robson R. M., Stromer M. H. J. Cell Biol., 1974, v. 63, № 2, p. 304a.
3. Yeltman D. K., Jung G., Carraway K. L. Biochim. et biophys. acta, 1981, v. 668, № 2, p. 201-208.
4. Schook W., Ores C., Puzshkin S. Biochem. J., 1978, v. 175, № 1, p. 63-72.
5. Suzuki A., Goll D. E., Singh I., Allan R. E., Robson R. M., Stromer M. H. J. Biol. Chem., 1976, v. 251, № 21, p. 6860-6870.
6. Singh I., Goll D. E., Robson R. M., Stromer M. H. Biochim. et biophys. acta, 1977, v. 491, № 1, p. 29-45.
7. Bretscher K., Vanderkerckhove J., Weber K. Eur. J. Biochem., 1979, v. 100, № 1, p. 237-243.
8. Kobayashi R., Itoh H., Tashima J. Eur. J. Biochem., 1983, v. 133, № 3, p. 607-611.
9. Симоидзе М. Ш., Надирашвили Н. Ш., Заалишвили М. М. Изв. АН ГССР. Сер. биол., 1980, т. 6, № 3, с. 285-287.
10. Надирашвили Н. Ш., Симоидзе М. Ш. Биофизика, 1982, т. 27, вып. 4, с. 554-556.
11. Pinter K., Jancso A., Biro E. N. A. Acta biochim. et biophys. Acad. sci. hung., 1980, v. 15, № 3, p. 217-222.
12. Торчинский Ю. М. Сера в белках. М.: Наука, 1977, с. 127-129.
13. Laemmli U. K. Nature, 1970, v. 227, p. 680-685.
14. Остерман Л. А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот. М.: Наука, 1981, с. 113-116.

Поступила в редакцию
14.VI.1984
После доработки
18.IX.1984

LIMITED TRYPSINOLYSIS OF α -ACTININ AND DISTRIBUTION OF SULFHYDRYL GROUPS IN THE FRAGMENTS OF MOLECULE

KURIDZE K. Sh., SIMONIDZE M. Sh., NADIRASHVILI N. Sh.,
ZAALISHVILI M. M.

*Institute of Physiology, Academy of Sciences of the Georgian
SSR, Tbilisi*

Incubation of α -actinin with trypsin leads to the formation of several fragments with molecular weight of 55 000, 38 000, 30 000 and 15 000 which are rather resistant against further proteinase action. Two from five exposed cycteine residues modified by N-ethylmaleimide in the polypeptide chain of the subunit are located in the 55 000 fragment, one in the 30 000 fragment, and the remaining two appear to belong to those parts of the polypeptide chain that are subject to degradation to small peptides under the action of trypsin. Masked SH-groups are localized to the 30 000 fragment.