



ИЗЪЕМ РЕДАКТОРУ

УДК 577.112.5

ПЕРВИЧНАЯ СТРУКТУРА КАЛЬМОДУЛИНА
ИЗ МОЗГА ЧЕЛОВЕКА

Алахов В. Ю., Северин Е. С.

Институт молекулярной биологии Академии наук СССР, Москва

Винокуров Л. М.

Институт белка Академии наук СССР, г. Пушкино, Моск. обл.

Дудкин С. М.

Институт органической химии им. Н. Д. Зелинского Академии наук СССР, Москва

Регуляторное действие кальция в эукариотических клетках во многих случаях осуществляется посредством связывания Ca^{2+} с мультифункциональным регуляторным белком — кальмодулином [1]. Комплекс кальмодулин· Ca^{2+} активирует ряд ключевых ферментов [2—9] и участвует в регуляции различных клеточных процессов [10—12]. Уникальные свойства этого белка предопределили интенсивное исследование его структурно-функциональных свойств. В настоящее время определена полная аминокислотная последовательность кальмодулина из мозга быка [13, 14] и скелетных мышц кролика [15], а также частичная структура кальмодулина из ряда других источников [16—18]. Во всех случаях структура белка обладала большой консервативностью и все наблюдаемые замены относились к количеству амидов аспарагиновой и глутаминовой кислот. В настоящей работе представлена полная аминокислотная последовательность кальмодулина из мозга человека.

Кальмодулин выделяли по модифицированной методике Дедмана [19], хроматографируя сульфатаммонийную фракцию (57—80% насыщения, pH 4,1) водного экстракта мозга на целлюлозе DE-52 (Whatman, Англия), уравновешенной 0,01 М буфером имидазол — ацетат, pH 6,1, в градиенте хлористого натрия (0,05—0,45 М). Фракцию, содержащую кальмодулин, хроматографировали на ультрагеле АсА 44 (LKB, Швеция). Кальмодулин обнаруживали с помощью электрофореза в 13,5% полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия и 0,1 мМ EDTA или 0,1 мМ хлористого кальция [20]. В результате с выходом 40—50 мг на 1 кг мозга был получен гомогенный белок, дающий одну полосу при электрофорезе, подвижность которой соответствовала подвижности кальмодулина из мозга быка как в присутствии EDTA, так и в присутствии хлористого кальция. Полученный кальмодулин активировал фосфодиэстеразу из мозга быка (pH 8; 0,1 мМ Ca^{2+}) с K_d 1 нМ, что также хорошо соответствует свойствам кальмодулина из мозга быка [21]. Сравнение аминокислотного состава белков из обоих источников показало, что он практически аналогичен и, следовательно, кальмодулины обладают высокой степенью гомологии.

После расщепления кальмодулина трипсином (Worthington, США) в течение 18 ч при pH 7,4 и 37° С с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии на носителях TSK-G-2000-SW (Varian, США) с элюцией 0,1% трифторуксусной кислотой, содержащей 15% ацетонитрил,

Аминокислотная последовательность пептидов, полученных в результате гидролиза кальмодулина из мозга человека трипсином

Пептид	Аминокислотная последовательность *
T-I	¹ Ac-Ala-Asp-Gln-Leu-Thr-Glu-Glu-Gln-Ile-Ala-Glu-Phe-Lys ¹³
T-II	¹³ Glu-Ala-Phe-Ser-Leu-Phe-Asp-Lys ²¹
T-III	¹⁷ Ser-Leu-Phe-Asp-Lys ²¹
T-IV	²² Asp-Gly-Asp-Gly-Thr-Ile-Thr-Thr-Lys ³⁰
T-V	³¹ Glu-Leu-Gly-Thr-Val-Met-Arg ³⁷
T-VI	³⁸ Ser-Leu-Gly-Gln-Asn-Pro-Thr-Glu-Ala-Glu-Leu-Gln-Asp-Met-Ile-Asn-... ⁵³
T-VII	Met-Ala
T-VIII	Met-Lys
T-IX	⁷⁸ Asp-Thr-Asp-Ser-Glu-Glu-Glu-Ile-Arg-Glu-Ala-Phe-Arg-Val-Phe-Asp-Lys ⁹¹
T-X	⁹¹ Val-Phe-Asp-Lys-Asp-Gly-Asn-Gly-Tyr-Ile-Ser-Ala-Ala-Gln-Leu-Arg ¹⁰⁶
T-XI	¹⁰⁷ His-Val-Met-Thr-Asn-Leu-Gly-Glu-Tml-Leu-Thr-Asp-Glu-Glu-Val-Asp- ¹²⁶ Glu-Met-Ile-Arg
T-XII	¹⁴⁴ ...-Met-Met-Thr-Ala-Lys-OH ¹⁴⁸

* Tml — триметиллизин.

Таблица 2

Аминокислотная последовательность пептидов, полученных в результате расщепления кальмодулина из мозга человека бромцианом

Пептид	Аминокислотная последовательность
CB-II	³⁷ Arg-Ser-Leu-Gly-Gln-... ⁴¹
CB-III	⁵² Ile-Asn-Glu-Val-Asp-Ala-Asp-Gly-Asp-Gly-Thr-Ile-Asp-Phe-Pro-Glu- ⁷¹ Phe-Leu-Thr-Met
CB-IV	⁷² Met-Ala-Arg-Lys-Met ⁷⁶
CB-V	⁷⁷ Lys-Asp-Thr-Asp-Ser-... ⁸¹
CB-VI	¹²⁵ Ile-Arg-Glu-Ala-Asp-Ile-Asp-Gly-Asp-Gly-Gln-Val-Asn-Tyr-Glu-Glu- ¹⁴⁴ Phe-Val-Gln-Met

и Ultrasil RP-8 (Altex, США) с элюцией 0,1% трифторуксусной кислотой в градиенте концентрации ацетонитрила (7–76%) с выходом 50–80% было выделено 12 пептидов и свободный лизин. Аминокислотные последовательности пептидов * T-II (14–21), T-III (17–21), T-IV (22–30), T-V (31–37), T-IX (78–94), T-X (91–106), T-XI (107–126), а также N-концевая последовательность (16 остатков) пептида T-VI (38–71) были установлены с помощью автоматического жидкофазного метода Эдмана на модифицированном секвенаторе Beckman 890 C (США) с использованием полибрена [22] (табл. 1). Структура пептидов T-VII (72–73) и T-VIII (76–77) была определена методом Эдмана [23], а последовательность N-

* В скобках приведено положение пептида в полипептидной цепи.

	10		20
Ac-Ala-Asp-Gln-Leu-Thr-Glu-Glu-Gln-Ile-Ala-Glu-Phe-Lys-Glu-Ala-Phe-Ser-Leu-Phe			Asp
	30		40
Lys-Asp-Gly-Asp-Gly-Thr-Ile-Thr-Thr-Lys-Glu		Leu-Gly-Thr-Val-Met-Arg-Ser-Leu-Gly	
	50		60
Gln-Asn-Pro-Thr-Glu-Ala-Glu-Leu-Gln-Asp-Met-Ile-Asn-Glu-Val		Asp-Ala-Asp-Gly-Asp	
	70		80
Gly-Thr-Ile-Asp-Phe-Pro-Glu		Phe-Leu-Thr-Met-Met-Ala-Arg-Lys-Met-Lys-Asp-Thr-Asp	
	90		100
Ser-Glu-Glu-Glu-Ile-Arg-Glu-Ala-Phe-Arg-Val-Phe		Asp-Lys-Asp-Gly-Asn-Gly-Tyr-Ile	
	110		120
Ser-Ala-Ala-Gln		Leu-Arg-His-Val-Met-Thr-Asn-Leu-Gly-Glu-Tml-Leu-Thr-Asp-Glu-Glu	
	130		140
Val-Asp-Glu-Met-Ile-Arg-Glu-Ala		Asp-Ile-Asp-Gly-Asp-Gly-Gln-Val-Asn-Tyr-Glu-Glu	
Phe-Val-Gln-Met-Met-Thr-Ala-Lys-OH			

Полная аминокислотная последовательность кальмодулина из мозга человека. Рамкой обведены аминокислоты, входящие в кальцийсвязывающие домены

концевого ацетилированного пептида T-I (1—13) и C-концевая последовательность пептида T-XII (127—148) были определены с помощью карбоксипептидазы Y (0,1 М бикарбонат аммония, pH 7,4, температура 30° С, отбор проб через 2 мин) (табл. 1). Сравнение полученных аминокислотных последовательностей триптических пептидов с первичной структурой кальмодулина из мозга быка позволило локализовать расположение пептидов, охватывающих 124 из 148 аминокислотных остатков исследуемого кальмодулина.

Для определения полной первичной структуры белка было проведено расщепление кальмодулина бромцианом [24]. При разделении продуктов расщепления на носителе Ultrasil RP-8 было выделено семь пептидов, аминокислотный состав которых соответствовал фрагментам 1—36 (CB-I), 37—51 (CB-II), 52—71 (CB-III), 72—76 (CB-IV), 77—124 (CB-V), 125—144 (CB-VI) и 144—148 (CB-VII). С помощью автоматического твердофазного метода Эдмана (Rank Hilger, Англия) при иммобилизации пептидов за C-концевой гомосерин были установлены полные аминокислотные последовательности пептидов CB-III и CB-VI, а также N-концевые последовательности пептидов CB-II и CB-V (табл. 2): Сравнение всех полученных аминокислотных последовательностей с первичной структурой кальмодулина из мозга быка [13] позволило реконструировать полную аминокислотную последовательность кальмодулина из мозга человека (рисунок). Последний содержит три замены типа амид — кислота в положениях 24, 60 и 129 и две замены типа кислота — амид в положениях 104 и 135. В настоящее время существующие данные не позволяют однозначно оценить функциональную значимость выявленных замен, однако интересно, что все они осуществляются в кальцийсвязывающих доменах [25] (рисунок). Возможно, результатом этого является уменьшение констант диссоциации ионов кальция в соответствующих центрах и/или изменение последовательности взаимодействия последних с кальцийсвязывающими центрами кальмодулина.

Когда настоящая работа была закончена, К. Титани и др. опубликовали полную аминокислотную последовательность кальмодулина из мозга человека [26]. В ней обнаружено по сравнению с кальмодулином из мозга быка две замены типа амид — кислота в положениях 24 и 129 и одна замена типа кислота — амид в положении 135. Наблюдаемые различия в полу-

ченных результатах, по-видимому, не являются следствием неточности определения содержания амидов аминокислот и, возможно, отражают физиологически важную модификацию молекулы кальмодулина. В связи с этим необходимо отметить, что в нашем случае вся структура была определена на препарате кальмодулина, полученном из одного мозга.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Cheung W. Y.* Fed. Proc., 1982, v. 41, № 1, p. 2253-2257.
2. *Cheung W. Y.* Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1970, v. 38, № 3, p. 533-538.
3. *Brostrom C. O., Huang Y.-C., Breckenridge B. McL., Wolff D. J.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1975, v. 72, № 1, p. 64-68.
4. *Dabrowska R., Sherry J. M. F., Aromatorio D. K., Hartshorne D. J.* Biochemistry, 1978, v. 17, № 2, p. 253-258.
5. *Gopinath R. M., Vincenzi F. F.* Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1977, v. 17, № 4, p. 1203-1209.
6. *Anderson J. M., Cormier M. J.* Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1978, v. 84, № 3, p. 595-602.
7. *Cohen P., Burchell A., Foulkes J. G., Cohen P. T. W., Vanaman T. C., Nairn A. C.* FEBS Lett., 1978, v. 92, № 2, p. 287-293.
8. *Schulman H., Greengard P.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1978, v. 75, № 11, p. 5432-5436.
9. *Nagao S., Suzuki Y., Watanabe Y., Nazawa Y.* Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1978, v. 90, № 1, p. 261-268.
10. *DeLorenzo R. J., Freedman S. D., Yohe W. B., Maurer S. C.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1979, v. 76, № 4, p. 1838-1842.
11. *Yamauchi T., Fujisawa H.* Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1979, v. 90, № 1, p. 28-35.
12. *Marcum J. M., Dedman J. R., Brinkley B. R., Means A. R.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1978, v. 75, № 8, p. 3771-3775.
13. *Watterson D. M., Sharief F., Vanaman T. C.* J. Biol. Chem., 1980, v. 255, № 3, p. 962-971.
14. *Kasai H., Kato Y., Isobe T., Kawasaki H., Okuyama T.* Biomed. Res., 1980, v. 1, p. 248-264.
15. *Grand R. J. A., Shenolikar S., Cohen P.* Eur. J. Biochem., 1981, v. 113, № 2, p. 359-367.
16. *Dedman J. R., Jackson R. L., Schreiber W. E., Means A. R.* J. Biol. Chem., 1978, v. 253, № 2, p. 343-346.
17. *Grand R. J. A., Perry S. V.* FEBS Lett., 1978, v. 92, № 1, p. 137-142.
18. *Schreiber W. E., Sasagawa T., Titani K., Wade R. D., Molencik D., Fischer E. H.* Biochemistry, 1981, v. 20, № 18, p. 5239-5245.
19. *Dedman J. R., Potter J. D., Jackson R. L., Johnson J. D., Means A. R.* J. Biol. Chem., 1977, v. 252, № 23, p. 8415-8422.
20. *Burgess W. H., Jemiolo D. K., Kretsinger R. H.* Biochim. et biophys. acta, 1980, v. 623, № 2, p. 257-270.
21. *Мирошников А. И., Бойков В. А., Снежкова Л. Г., Северин С. Е., Швец В. И., Дудкин С. М.* Биоорган. химия, 1983, т. 9, № 1, с. 26-31.
22. *Klapper D. G., Wilde C. E., Capra J. D.* Anal. Biochem., 1978, v. 85, № 1, p. 126-131.
23. *Gray W. R.* Methods in Enzymology, 1972, v. 25, p. 333-350.
24. *Gross E.* Methods in Enzymology, 1967, v. 11, p. 238-255.
25. *Kretsinger R. H.* Annu. Rev. Biochem., 1976, v. 45, p. 239-266.
26. *Sasagawa T., Ericsson L. H., Walsh K. A., Schreiber W. E., Fischer E. H., Titani R.* Biochemistry, 1982, v. 21, № 21, p. 2565-2569.

Поступило в редакцию
4.VIII.1982

PRIMARY STRUCTURE OF CALMODULIN FROM HUMAN BRAIN

ALAKHOV V. U., SEVERIN E. S., VINOKUROV L. M., DUDKIN S. M.

*Institute of Molecular Biology, Academy of Sciences of the USSR, Moscow;
Institute of Protein Research, Academy of Sciences of the USSR, Pushchino;
N. D. Zelinsky Institute of Organic Chemistry, Academy of Sciences of the
USSR, Moscow*

The primary structure of calmodulin from human brain has been determined. As compared to calmodulin from bovine brain, it shows three substitutions of the amide→acid type at positions 24, 60, 129, and two acid→amide changes at positions 104 and 135.