



УДК 547.962.02 : 577.112.5

ФРАГМЕНТЫ ОГРАНИЧЕННОГО ТРИПСИНОЛИЗА
НАТИВНОГО α -АКТИНИНА*Симоидзе М. Ш., Куридзе К. Ш., Надирашвили Н. Ш.,
Заалтшвили М. М.**Институт физиологии им. И. С. Бериташвили
Академии наук ГССР, Тбилиси*

Инкубирование нативного α -актинина с трипсином приводит к образованию сравнительно устойчивых к дальнейшему действию фермента промежуточных фрагментов (M 98, 85, 80, 70, 64, 55, 38, 30, 15 кДа). Исследование этих фрагментов позволило установить ход трипсинолиза и расположить их в полипептидной цепи субъединицы α -актинина.

Мышечное сокращение — сложный процесс, в который вовлечены как основные белковые компоненты сократительного аппарата — актин и миозин, так и целый ряд белков, представленных в мышце в незначительном количестве. Одним из таких минорных белков является α -актинин, который присутствует не только в мышечной ткани, но и в других типах тканей и клеток [1]. α -Актинин из поперечно-полосатой мышцы кролика — это стержнеобразная молекула, содержащая две одинаковые или очень близкие по молекулярным массам субъединицы, N-концевые аминокислоты которых ацилированы.

В нашей предыдущей работе [2] приводились результаты, полученные при исследовании структуры α -актинина (выделенного из поперечно-полосатой мышцы кролика) с помощью ограниченного трипсинолиза. Методом электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии SDS была исследована кинетика расщепления нативного α -актинина трипсином и найдено, что при трипсинолизе образуются пептиды, сравнительно устойчивые к дальнейшему действию фермента, и что стабильный фрагмент с M 30 кДа не является продуктом деградации фрагмента с M 55 кДа, т. е. эти фрагменты не перекрывают друг друга в полипептидной цепи [3]. Однако полученные результаты не позволили расположить фрагменты по полипептидной цепи исходной молекулы α -актинина. Для решения этой задачи в данной работе выделены и охарактеризованы стабильные промежуточные фрагменты ограниченного трипсинолиза α -актинина.

При инкубации нативного α -актинина с трипсином на разных стадиях трипсинолиза образуются относительно стабильные промежуточные фрагменты с M 98 (T_1), 85 (T_2), 80 (T_3), 70 (T_4), 64 (T_5), 55 (T_6), 38 (T_7), 30 (T_8) и 15 кДа (T_9), которые при увеличении времени инкубации постепенно гидролизуются (рис. 1). Чтобы охарактеризовать фрагменты ограниченного трипсинолиза α -актинина, смесь, полученную после гидролиза белка, разделяли электрофорезом в ПААГ в присутствии SDS. Белковые зоны из окрашенных гелей выделяли электроэлюированием и их гомогенность оценивали с помощью электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии SDS и определением N-концевых аминокислот. В результате в гомогенном виде выделено восемь фрагментов (T_2 — T_9). Фрагмент T_1 (M 98 кДа) содержал примесь следовых количеств α -актинина.

Определение аминокислотной последовательности автоматическим методом Эдмана позволило установить структуру N-концевых участков фрагментов (таблица). При этом прослеживаются три отличающиеся друг от

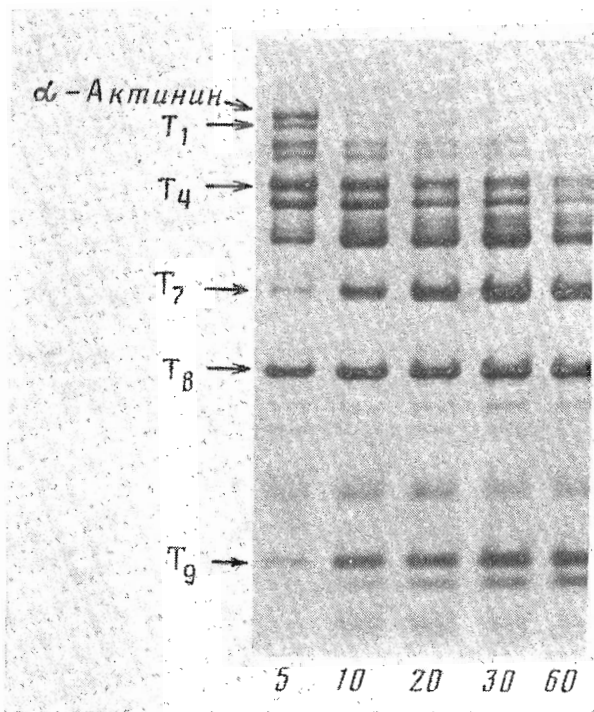


Рис. 1. Электрофорез в ПААГ в присутствии SDS смеси продуктов триптического гидролиза α -актинина, окрашенных кумасси бриллиантовым синим G-250 (цифры указывают время гидролиза в минутах). Концентрация белка 2 мг/мл, фермент-субстратное соотношение 1 : 50, температура 37° С

друга аминокислотные последовательности, согласно которым фрагменты можно разделить на три группы: 1) фрагменты с M 98 и 30 кДа; 2) с M 85, 80 и 15 кДа; 3) с M 70, 64, 55 и 38 кДа. Становится ясным, что расщепление нативного α -актинина трипсином начинается с образования фрагмента с M 98 кДа, у которого N-концевая аминокислота не блокирована, т. е. с самого начала α -актинин укорачивается за счет отщепления N-концевого пептида. Далее укороченный фрагмент быстро распадается на фрагменты с M 30 и 70 кДа. Сравнительно устойчивый фрагмент с M 30 кДа, который содержит одну экспонированную и три «маскированные» SH-группы [3], накапливается в гидролизате. Фрагмент с M 70 кДа претерпевает дальнейший ступенчатый гидролиз в С-концевой части молекулы, образуя фрагменты с M 64 и 55 кДа с идентичными N-концевыми аминокислотными последовательностями.

При увеличении времени инкубации фрагмент с M 55 кДа, укорачиваясь с С-концевой части, частично превращается во фрагмент с M 38 кДа. Данные аминокислотной последовательности (одинаковые у фрагментов с M 98 и 30 кДа) позволяют считать, что фрагмент с M 30 кДа расположен

Фрагмент	M , кДа	N-Концевая аминокислотная последовательность
T ₁	98	Glu-Gly-Pro-Phe-Ala-Gly-Gly-
T ₂	85	Phe-Ala-Ile-Gln-
T ₃	80	Phe-Ala-Ile-Gln-
T ₄	70	Val-Leu-Ala-Val-Asn-Gln-
T ₅	64	Val-Leu-Ala-Val-Asn-Gln-Glu-Asn-Glu-Lys-Leu-Met-Asn-X-Tyr-
T ₆	55	Val-Leu-Ala-Val-Asn-Gln-Glu-Asn-Glu-Lys-Leu-Met-
T ₇	38	Val-Leu-Ala-Val-Asn-Gln-Glu-Asn-Glu-Lys-
T ₈	30	Glu-Gly-Pro-Phe-Ala-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Tyr-Met-Gln-Glu-
T ₉	15	Phe-Ala-Ile-Gln-Asp-Ile-Ser-Val-Gln-

в N-концевой части субъединицы α -актинина, фрагмент с M 55 кДа представляет собой середину субъединицы, а С-концевая часть белка является хорошо доступной для фермента и распадается на мелкие пептиды (существование которых показывают фореграммы), которые нами пока не выделены. Таким образом, исследование частичных аминокислотных последовательностей триптических фрагментов α -актинина позволило установить их расположение в полипептидной цепи субъединицы α -актинина (рис. 2). Являются ли фрагменты с M 30, 70 кДа продуктами точечного расщепления субъединицы α -актинина или образуются в результате отщепления мелких пептидов (или пептида), пока утверждать не можем.

Образование промежуточных фрагментов с M 85, 80 и 15 кДа указывает на существование еще одного пути триптического гидролиза α -актинина, который является менее выраженным и заключается в следующем: субъединица α -актинина укорачивается, образуя промежуточный фрагмент с M 85 кДа, и затем после отщепления N-концевого пептида с M 15 кДа (у фрагментов с M 85 и 15 кДа идентичные N-концевые аминокислотные последовательности) образуется фрагмент с M 70 кДа. Последний в ходе гидролиза постепенно лишается С-концевого участка, образуя фрагменты с M 64, 55, 38 кДа, т. е. процесс идет по основному пути.

Экспериментальная часть

α -Актинин получали из спинных мышц кролика по методу Пинтера [4]. Триптический гидролиз нативного α -актинина проводили при 37°C в буфере, содержащем 20 мМ трис-НСl, 1 мМ EDTA, 2 мМ β -меркаптоэтанол, рН 8,0, варьируя фермент-субстратное соотношение и время гидролиза. Высокомолекулярный фрагмент (M 98 кДа) получали при соотношении фермент — субстрат 1 : 180 (время гидролиза 15 мин), а остальные — при соотношении 1 : 30 (время гидролиза 20 мин). Для гидролиза было взято 8 мг белка с концентрацией 2,5 мг/мл. Действие трипсина прекращали добавлением к реакционной смеси соевого ингибитора, смесь высушивали лиофильно.

Электрофорез в ПААГ в присутствии SDS проводили в градиенте концентрации полиакриламида 9–25% по методу Леммли на пластинках $20 \times 20 \times 0,2$ см [5]. Фрагменты выделяли электроэлюированием белковых зон из полиакриламидных гелей [6]. Мелко порезанные полоски окрашенного геля суспендировали 2 ч в 0,25 М NH_4HCO_3 с 0,5% SDS и затем перенесли в камеру для электроэлюции, заполненную 0,25 М NH_4HCO_3 , содержащим 0,1% SDS. После окончания элюции вначале отсасывали буфер над окрашенной зоной, а затем образец. Элюированный материал осаждали охлажденной смесью уксусной кислоты с 0,1 н. HCl и пересаждали чистым ацетоном. Таким образом, белковый материал освобождался от SDS и красителя. Гомогенность элюированного материала проверяли электрофорезом и определением N-концевой аминокислоты дансильным методом. Автоматическое определение N-концевой аминокислотной последовательности фрагментов проводили на секвенаторе модели APS-240 (Rank-Hilger) [7].

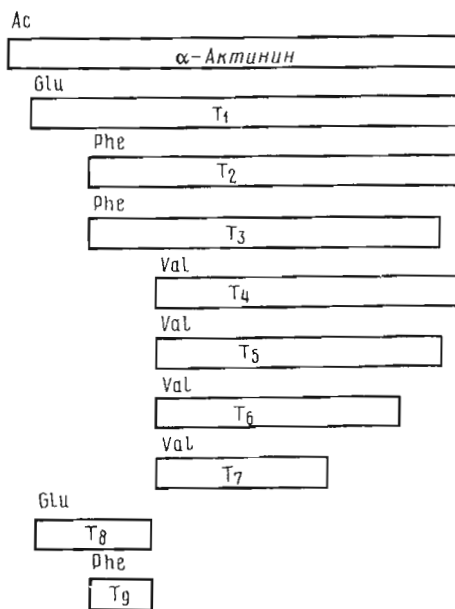


Рис. 2. Расположение фрагментов ограниченного трипсинолиза α актинина по полипептидной цепи субъединицы белка

Фенилтиогидантоиновые производные аминокислот идентифицировали на хроматографе модели HP 1080A (США) с колонкой Ultrasphere ODS (4,6×250 мм, 5 мкм) в градиенте концентрации метаполя (33–55%) в 0,008 М калий-фосфатном буфере, pH 4,8.

Авторы выражают признательность д-ру хим. наук Ю. Б. Алахову (Ин-т белка АН СССР) и мл. научн. сотр. Л. М. Вишукорову за ценные советы при обсуждении результатов и за техническую помощь в проведении данной работы.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Duhaiman A. S., Bamburg J. R.* Biochemistry, 1984, v. 23, p. 1600–1608.
2. *Симоидзе М. Ш., Куридзе К. Ш., Надирашвили Н. Ш., Бокочадзе Н. Н., Заалишвили М. М., Шрайбман Ф. О.* Изв. АН ГССР, 1984, т. 113, № 1, с. 157–160.
3. *Куридзе К. Ш., Симоидзе М. Ш., Надирашвили Н. Ш., Заалишвили М. М.* Био-орган. химия, 1985, т. 11, № 3, с. 316–320.
4. *Pinter K., Janeso A., Biro E. N. A.* Acta biochim. et biophys. Acad. sci. hung., 1980, v. 15, № 3, p. 217–222.
5. *Laemmli U. K.* Nature, 1970, v. 227, p. 680–685.
6. *Kelly Ch., Totty N. F., Waterfield M. D., Crumpton M. G.* Biochemistry Int., 1983, v. 6, № 4, p. 535–544.
7. *Laurson R. H., Horn M. I., Bonner A. G.* FEBS Lett., 1972, v. 21, № 1, p. 67–72.

Поступила в редакцию
29.III.1985.

LIMITED TRYPSINOLYSIS FRAGMENTS OF NATIVE α -ACTININ

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

*I. S. Beritashvili Institute of Physiology, Academy of Sciences
of the Georgian SSR, Tbilisi*

Incubation of native α -actinin with trypsin leads to the formation of intermediate fragments that are quite resistant to further enzyme action (*M* 98, 85, 80, 70, 64, 55, 38, 30, 15 kDa). Analysis of these fragments made it possible to elucidate the course of trypsinolysis and to localize the fragments in the polypeptide chain of α -actinin subunit.