



УДК 577.112.5 : 577.152.461*1'13

**КАТАЛИТИЧЕСКИЙ КОМПОНЕНТ КАЛЬМОДУЛИННЕЗАВИСИМОЙ
АДЕНИЛАТЦИКЛАЗЫ МОЗГА БЫКА. ВЫДЕЛЕНИЕ
И ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЧАСТИЧНОЙ АМИНОКИСЛОТНОЙ
ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ**

*Липкин В. М., Мирзоева С. Ф., Драницына С. М.,
Мошняков М. В., Петров В. М., Чернова М. Н.,
Сурина Е. А., Обухов А. И., Левина Н. Б., Храпцов Н. В.,
Андреева С. Г., Ракитина Т. В., Фещенко Е. А.,
Овчинников Ю. А.*

*Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина
Академии наук СССР,
Москва*

Каталитический компонент кальмодулиннезависимой аденилатциклазы коры головного мозга крупного рогатого скота солюбилизован и очищен до гомогенного состояния. Подобраны условия для препаративной выработки фермента на колонке с иммобилизованными антителами к аденилатциклазе. Доказано, что эти антитела взаимодействуют только с кальмодулиннезависимой формой фермента и не взаимодействуют с кальмодулинзависимой. По данным электрофоретического анализа, молекулярная масса кальмодулиннезависимой аденилатциклазы 140 ± 10 кДа. Определен аминокислотный состав аденилатциклазы, проведено ее расщепление лизилспецифичной протеиназой из *Achromobacter liticus* и установлена аминокислотная последовательность выделенных пептидов, содержащих в сумме 300 аминокислотных остатков. Из клонотеки кДНК мозга быка выделен клон, содержащий вставку кДНК длиной 605 п. о., кодирующий фрагмент полипептидной цепи аденилатциклазы, состоящий из 183 аминокислотных остатков. Выявлена определенная гомология аминокислотной последовательности этого фрагмента с известными последовательностями аденилатциклазы *Escherichia coli* и *Bordetella pertussis*.

Аденилатциклазная система представляет собой трансмембранный ферментативный комплекс, осуществляющий синтез сАМР в ответ на связывание гормона с клеткой-мишенью. Она состоит из трех функционально различных компонентов: рецептора, регуляторных G-белков и собственно каталитического С-белка (КФ 4.6.1.1, АТР-пирофосфат-лиаза (циклизующая)) [1]. Узнающий гормоны участок рецептора локализован на внешней стороне плазматической мембраны, а аденилатциклаза и G-белки ориентированы в цитоплазму. В настоящее время наиболее подробно изучены свойства и структурные особенности G-белков, представляющих собой $\alpha\beta\gamma$ -гетеротримеры.

Каталитическая субъединица — наименее охарактеризованный компонент из-за его нестабильности и небольшого содержания в тканях (менее 0,005% от суммарного мембранного белка).

Настоящая работа посвящена разработке полупрепаративной методики выделения каталитической субъединицы кальмодулиннезависимой формы аденилатциклазы мозга быка, физико-химической характеристике фермента и определению его частичной аминокислотной последовательности.

Мембраны коры головного мозга крупного рогатого скота получали по стандартной методике [2], но перед солюбилизацией дополнительно

Сокращения: БСА — бычий сывороточный альбумин, CHAPS — 3-(3-холамидо-пропил)диметиламмоний-3-пропансульфонат, SDS — додецилсульфат натрия, ИФА — иммуноферментный анализ, PMSF — фенилметилсульфонилфторид, сАМР — 3',5'-циклический аденозинмонофосфат.

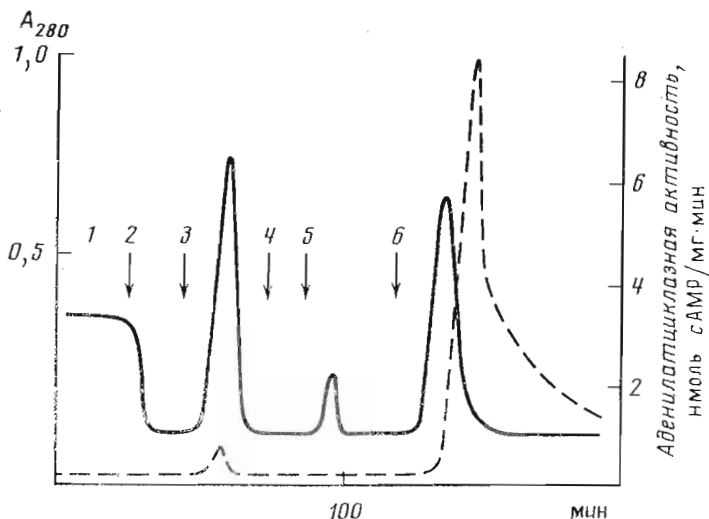


Рис. 1. Ионнообменная хроматография препарата солюбилизованных СНАРС мембранных белков на колонке с DEAE-сефацелом ($2,5 \times 2,5$ см). 1 — Нанесение препарата солюбилизованных мембран на колонку, предварительно уравновешенную буфером А, элюция буфером А (2, 4), буфером А с 2 М NaCl (3), с 1% Lubrol PX (5), с 0,1% Lubrol PX и 1 М NaCl (6). Контроль по белку (сплошная линия) и по активности (пунктирная линия)

обрабатывали буферным раствором, содержащим 2 М NaCl. Эта процедура позволяет избавиться от половины балластного белка за счет удаления периферических мембранных белков (удельная активность мембран при этом возрастает с 50 до 100 пмоль·мг⁻¹·мин⁻¹). Для солюбилизации использовали либо цвиттер-ионный детергент СНАРС, либо общепринятый неионный детергент Lubrol PX. Оба детергента эффективно и избирательно переводят С-белок в раствор, максимально сохраняя активность фермента.

При ионнообменной хроматографии на DEAE-сефацэле мембранных белков, солюбилизованных СНАРС, была достигнута 80-кратная очистка каталитического компонента. Большая часть белков, содержащихся в солюбилизованном препарате, элюируется 2 М NaCl и 0,1% Lubrol PX. Элюция аденилатциклазной активности происходит при промывке сорбента буферным раствором, содержащим 0,1% Lubrol PX и 1 М NaCl (рис. 1).

Полученный после хроматографии на DEAE-сефацэле препарат аденилатциклазы (1% чистоты; уд. акт. 8 нмоль·мг⁻¹·мин⁻¹) использовался для иммунизации мышей линии BALB/c. Проведено несколько независимых гибридизаций спленоцитов иммунных животных с миеломными клетками. Моноклональные антитела, секретируемые гибридами, изучались методом ИФА, с помощью которого отобрано 17 положительных клонов.

Антитела далее исследовались по способности, во-первых, ингибировать ферментативную активность аденилатциклазы, во-вторых, иммунопреципитировать С-белок. Для проведения второго теста антитела предварительно закрепляли на белок-А-сефарозе. Как известно, белок А взаимодействует с константными участками иммуноглобулинов, а участки связывания антигена остаются свободными. Белок-А-сефарозу с иммобилизованными на ней моноклональными антителами далее инкубировали с препаратом С-белка и следили за убылью ферментативной активности (табл. 1). Антитела, обозначенные D, K, M, N, сильнее других препятствуют проявлению каталитической функции С-белка; два первых среди них обладают и наибольшей иммунопреципитирующей способностью (табл. 1).

Результаты проведения обоих тестов позволили отобрать два моноклональных антитела — K и D. Нарработку этих антител производили в асцитной опухоли. Очистку иммуноглобулинов от белков внутрибрю-

Результаты тестирования антител

Антитело	Ингибирование ферментативной активности, %	Тест с белок-А-сефарозой (остаточная активность супернатанта, %)	Антитело	Ингибирование ферментативной активности, %	Тест с белок-А-сефарозой (остаточная активность супернатанта, %)
A	24	82	I	28	72
B	36	79	J	32	76
C	31	80	L	36	74
D	75	42	M	61	82
E	30	75	N	62	89
F	20	90	O	18	84
G	28	78	P	23	79
H	33	75	Q	31	83
K	70	52	Контроль *	25	86

* В качестве контроля использовали иммуноглобулины неиммунизированных мышей.

шинной жидкости проводили преципитацией иммуноглобулинов сульфатом аммония и хроматографией на DEAE-сефацелло.

Антитела К и D были использованы в качестве лигандов при приготовлении иммуносорбентов. Электрофоретический анализ препарата, полученного с иммуносорбента на основе антитела К, показал, что оно связывает антиген с молекулярной массой 42 кДа. По-видимому, этот полипептид представляет собой α -субъединицу одного из G-белков.

Большого внимания заслуживало другое моноклональное антитело. Электрофореграмма препарата, полученного с иммуносорбента на основе антитела D, показала присутствие преимущественно одного полипептида с $M 140 \pm 10$ кДа, что, по литературным данным [3—5], соответствует молекулярной массе каталитического компонента аденилатциклазной системы. Этот препарат, кроме того, содержал два полипептида ($M 180 \pm 10$ и 40 ± 2 кДа), соотношение между которыми варьировало от выделения к выделению.

Необходимо было доказать, что препарат, получаемый с иммуносорбента на основе моноклонального антитела D, является аденилатциклазой. Для этого требовалось разработать специальный метод, поскольку общепринятые способы элюции антигена с иммуносорбента (изменение pH (>11 или <4), введение мочевины, гуанидингидрохлорида, органических растворителей, хаотропных агентов) необратимо инактивируют фермент.

Для получения нативного препарата аденилатциклазы комплекс антиген — антитело разрушали путем восстановления дисульфидных связей между тяжелой и легкой цепями иммуноглобулинов. Иммуносорбент в комплексе с ферментом инкубировали с 0,2 М меркаптоэтанолом. Через 3 ч наблюдалось 16-кратное увеличение аденилатциклазной активности супернатанта по сравнению с контролем (рис. 2). Однако удельная активность полученного таким образом препарата аденилатциклазы ($100 \text{ нмоль} \cdot \text{мг}^{-1} \cdot \text{мин}^{-1}$) оставалась достаточно низкой. Отсутствовали также прямые данные о принадлежности полипептида с $M 140 \pm 10$ кДа к каталитическому компоненту аденилатциклазной системы. Поэтому на белок с $M 140 \pm 10$ кДа была получена поликлональная сыворотка и для проведения функциональных исследований антитела дополнительно очищались при помощи аффинной хроматографии на нерастворимом конъюгате БСА и полипептида с $M 140$ кДа.

Изучение влияния очищенной сыворотки на активность фермента (рис. 3) и на способность полученных антител сорбировать аденилатциклазу (рис. 4) показало, что антитела, специфически связавшиеся с конъюгатом, значительно подавляют аденилатциклазную активность и после иммобилизации на белок-А-сефарозе обладают свойством связывать фермент из раствора, причем эта способность сильно зависит от количества

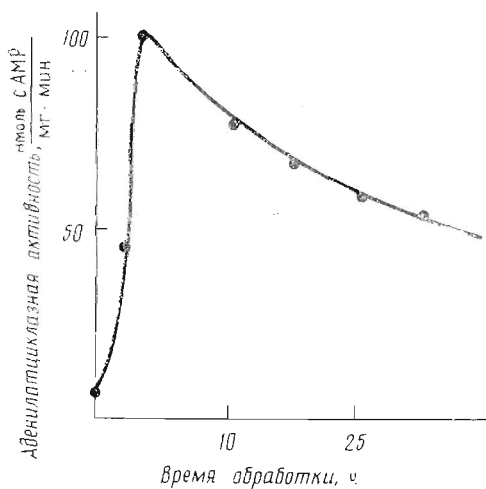


Рис. 2

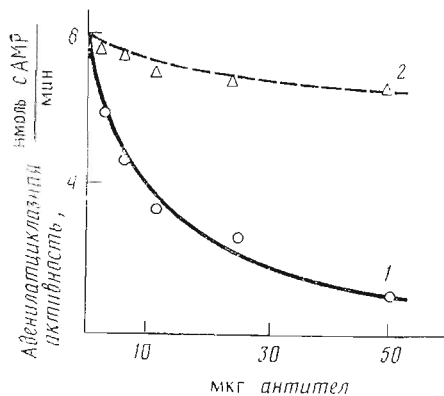


Рис. 3

Рис. 2. Изменение ферментативной активности аденлатциклазы в комплексе с антителами после обработки их 0,2 М меркаптоэтанолом

Рис. 3. Влияние антисыворотки к полипептиду с M 140 кДа на аденлатциклазную активность. Препарат кальмодулиннезависимой аденлатциклазы инкубировали с антителами сыгоротки, связавшимися с нерастворимым конъюгатом БСА и полипептида с M 140 кДа (1) и не связавшимися с конъюгатом (2)

Рис. 4. Иммуноадсорбция аденлатциклазы антисывороткой к полипептиду с M 140 кДа. Полученный после инкубирования с кальмодулин-сефарозой препарат аденлатциклазы был иммуноадсорбирован увеличивающимся количеством антител, как описано в «Экспер. части»: 1 — антитела, связавшиеся с нерастворимым конъюгатом БСА и полипептида с M 140 кДа; 2 — антитела, не связавшиеся с конъюгатом

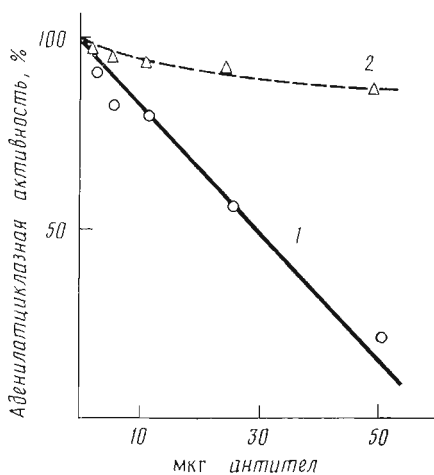


Рис. 4

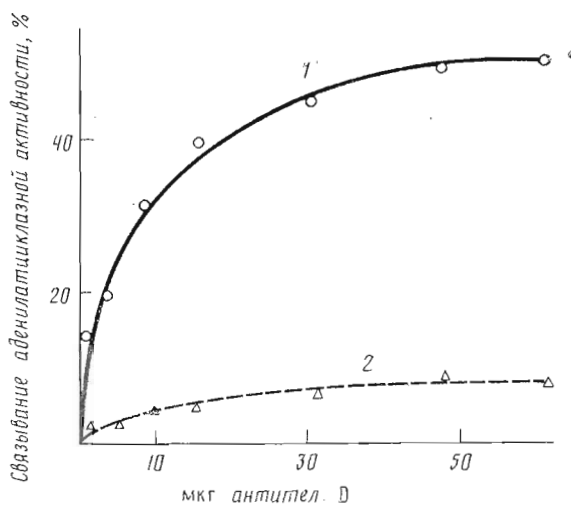
антител в пробе; не сорбирующиеся же на нерастворимом конъюгате антитела не ингибируют и не сорбируют аденлатциклазу.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что полипептид с M 140 \pm 10 кДа является каталитической субъединицей аденлатциклазы.

Как известно, в коре головного мозга млекопитающих присутствуют как минимум две формы аденлатциклазы: кальмодулинзависимая и кальмодулиннезависимая [2]. Из белок-А-теста, представленного графически на рис. 5. видно, что моноклональное антитело D связывает только ту форму аденлатциклазы, которая не сорбируется на иммобилизованном кальмодулине. Его действие на кальмодулинзависимую форму сравнимо с действием иммуноглобулинов, выделенных из неиммунизированных мышей. Таким образом, иммуносорбент, использующий в качестве лиганда антитело D, может быть использован для наработки кальмодулиннезависимой формы фермента.

Луброльный солюбилизат инкубировали с сорбентом в течение 14 ч в присутствии 0,5 М NaCl, затем, после удаления неспецифически сорбированных белков (промывка 1 и 0,1% Lubrol PX с 2 М NaCl), осуществляли специфическую элюцию 3 М роданидом аммония с 1% Lubrol PX.

Рис. 5. Иммунопреципитация иммобилизованными на белок-А-сефарозе антителами D препарата аденилатциклазы, не сорбирующегося (1) и сорбирующегося (2) на кальмодулин-сефарозе



Полученный препарат содержал преимущественно один полипептид с $M 140 \pm 10$ кДа и два минорных полипептида с $M 180 \pm 10$ и 40 ± 2 кДа.

Результаты иммуноблоттинга с моноклональными антителами D (рис. 6) свидетельствуют о том, что из трех полипептидов, выделяемых на D-иммуносорбенте, оба высокомолекулярных дают перекрестную иммунологическую реакцию. Эти же полипептиды дают перекрестную реакцию с поликлональной сывороткой, полученной на полипептид с $M 140 \pm 10$ кДа. Полипептид с $M 40$ кДа, возможно, является представителем семейства G-белков.

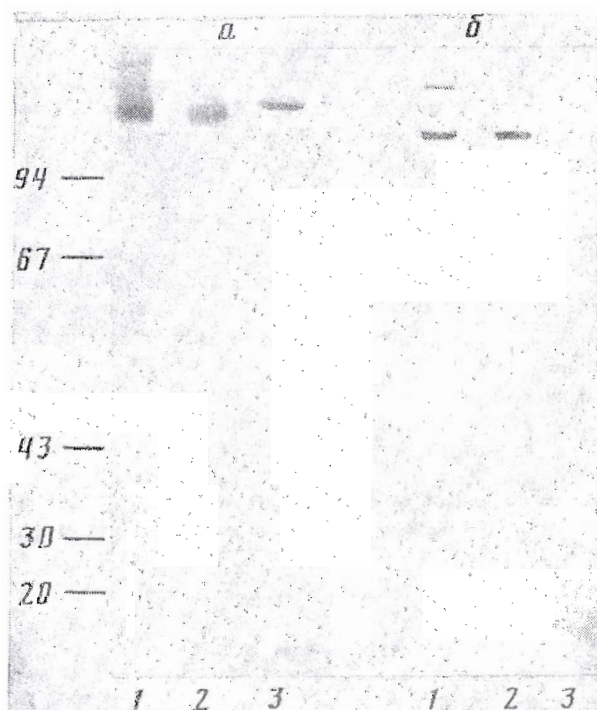


Рис. 6. Электрофореграмма (а) и иммуноблоттинг (б) препарата кальмодулиннезависимой аденилатциклазы из мозга быка: 1 — препарат аденилатциклазы, выделяемый на иммуносорбенте; 2 — препарат аденилатциклазы, дополнительно очищенный электроолюющей из ПААГ; 3 — ДНК-зависимая РНК-полимераза (β -субъединица — 155 кДа, β' -субъединица — 150 кДа). Цифры слева означают молекулярную массу (кДа)

Аминокислотный состав каталитического компонента кальмодулиннезависимой аденилатциклазы из мозга быка

Аминокислота	Число остатков		Мольные %	
	в полипептиде с			
	М 140 кДа	М 180 кДа	М 140 кДа	М 180 кДа
Asp	127	182	10,3	10,6
Thr	89	119	7,2	7,0
Ser	99	140	8,0	8,7
Glu	180	239	14,7	14,0
Pro	83	114	6,8	6,7
Gly	102	149	8,3	8,7
Ala	104	109	8,5	6,4
Val	99	120	8,0	7,0
Met	15	18	1,2	1,1
Ile	58	89	4,7	5,2
Leu	81	110	6,6	6,4
Tyr	31	43	2,5	2,5
Phe	29	64	2,4	3,8
His	25	33	2,0	1,9
Lys	65	118	5,3	6,9
Arg	42	54	3,4	3,2
Число остатков	1228	1701		

Для структурных исследований нами использовался гомогенный препарат С-белка, полученный электроолюцией из полиакриламидного геля белковой полосы, соответствующей $M 140 \pm 10$ кДа. Белок полосы $M 180 \pm 10$ кДа также олюцировался из геля. У обоих полипептидов определяли аминокислотный состав (табл. 2) и N-концевую аминокислотную последовательность. Структуры 14N-концевых аминокислотных остатков в обоих высокомолекулярных полипептидах оказались идентичными: Leu-Gln-Val-Asp-Ile-Val-Pro-Ser-Gln-Gly-Glu-Ile-His-Val-...

Вопрос о том, различаются ли эти белки в С-концевой области, образуются ли они в результате альтернативного сплайсинга мРНК, либо представляют собой полипептиды, имеющие обширные гомологичные участки, является в настоящее время предметом особого изучения.

Для расщепления полипептидной цепи аденилатциклазы первоначально был выбран бромциановый метод, поскольку предполагалось получение достаточно простой смеси пептидов: судя по аминокислотному составу (табл. 2), молекула аденилатциклазы содержит не более 15 остатков метионина. Однако элюированный из геля препарат плохо гидролизовался бромцианом. Можно предположить, что это связано с окислением остатков метионина в процессе выделения белков.

Для ферментативного расщепления С-белка необходимо было выбрать пептидазу, которая, во-первых, расщепляет белок на достаточно большие фрагменты и, во-вторых, способна осуществлять гидролиз при высокой концентрации детергента, так как аденилатциклаза растворяется только в этих условиях. Этим требованиям удовлетворяла лизилэдиопептидаза из *Achromobacter liticus*, гидролизующая связи, образованные α -карбоксыльными группами лизиловых остатков.

Первоначальное фракционирование гидролизата проводилось методом гель-фильтрации на Toyopearl HW 40 (рис. 7а). В результате было получено 8 объединенных фракций. Для дальнейшего разделения была применена высокоэффективная жидкостная хроматография на колонке с обращенной фазой Ultrasphere ODS (рис. 7б, в). В результате разделения продуктов расщепления аденилатциклазы лизилспецифичной протеиназой выделено 22 индивидуальных пептида. В табл. 3 представлены установленные структуры пептидов.

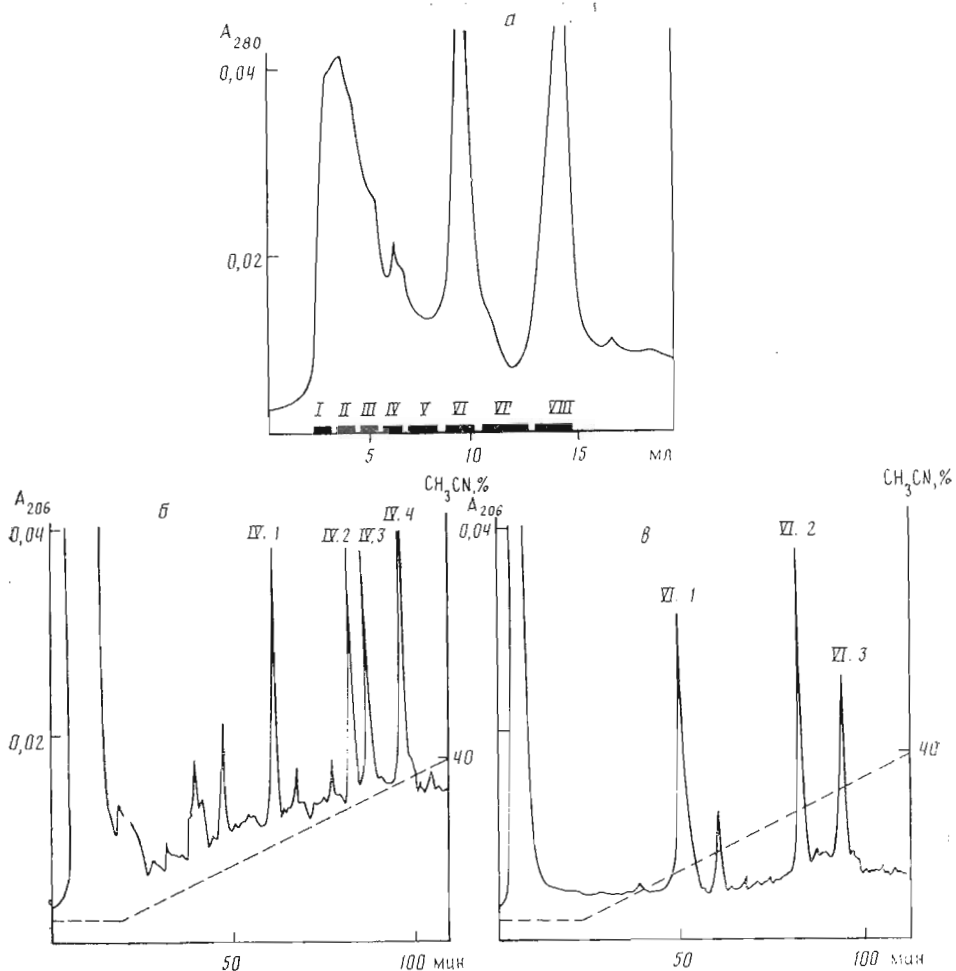


Рис. 7. Разделение пептидов аденилатциклазы, полученных в результате гидролиза лизилэндопептидазой из *A. liticus*: гель-фильтрация на колонке Toyopearl HW 40 (1 × 80 см), уравновешенной раствором уксусная кислота — ацетонитрил — вода (1 : 2 : 7) (а); ВЭЖХ объединенной фракции IV (б) и VI (в) на колонке Ultrasphere ODS (4,6 × 150 мм)

Таким образом, методами белковой химии определена последовательность 300 аминокислотных остатков, что составляет около 24% структуры полипептидной цепи аденилатциклазы. На основе установленной аминокислотной последовательности пептида V.1 (-Lys)-Trp-Tyr-Asp-Ala-) осуществляется синтез смеси 14-звенных олигодезоксирибонуклеотидных зондов $5' AA_A^GTCGTA_C^TGA_C^TGC 3'$ и с их помощью в клонотеке кДНК ($2 \cdot 10^5$ рекомбирантов), созданной с использованием poly(A⁺)-РНК из мозга быка, выявлен клон рАс 111, дающий положительный сигнал гибридизации. Затем с помощью радиоактивно меченного методом пик-трансляции фрагмента кДНК этого клона в клонотеке обнаружены клоны рАс 87 и рАс 73. Взаимное расположение, а также нуклеотидная последовательность кДНК этих клонов и выведенная из них аминокислотная последовательность представлены на рис. 8. Определенная нуклеотидная последовательность содержит 605 п.о., в положении 550—552 находится TAG-кодон терминации трансляции (клоны рАс 111 и рАс 73). Таким образом, установлена аминокислотная последовательность С-концевого участка полипептидной цепи аденилатциклазы (183 аминокислотных остатка). В настоящее время проводится поиск клонов, вставки кДНК которых кодируют другие участки белка.

При сравнении аминокислотной последовательности, выведенной из установленной структуры кДНК, со структурой изученных пептидов:

Аминокислотная последовательность пептидов кальмодулиннезависимой формы аденилатциклазы

Пептид	Структура
I.1	Gly-Pro-Val-Glu-Ala-Lys-Pro-Glu-His-Glu-His-Lys-Lys
I.2	Thr-Gln-Pro-Val-Arg-Glu-Pro-Ser-Ala-Pro-Lys
I.3	Ala-Gly-Gln-Glu-Asn-Ala-Ser-Ile-Thr-Leu-Lys
I.4	Pro-Ala-Ala-Pro-Glu-Val-Gln-Thr-Val-Pro-Asn-Xaa-Ala-Ser-Asn...
I.5	Gln-Asp-Asp-Gly-Gly-Ser-Pro-Ile-Arg-His-Tyr-Leu-Val-Lys
I.6	Asn-Ala-Pro-Thr-Pro-Gln-Glu-Phe-Arg-Glu-Gly-Glu-Asp-Ala-Val-Ile-Val-His-Asp-Val-Val-Ser-Leu-Pro-Pro...
II.1	Ala-Ser-Trp-Thr-Arg-Pro-Glu-Lys
II.2	Gly-Arg-Asp-Val-Ile-Leu-Lys
II.3.1	Asn-Asp-Glu-Ala-Glu-Tyr-Val-Cys-Ile-Ala-Gly-Asn-Lys
II.3.2	Glu-Pro-Ile-Val-Phe-Val-Ser-Ala-Arg-His-Thr-Trp...
II.4	Leu-Gln-Val-Asp-Ile-Val-Pro-Ser-Gln-Gly-Glu-Ile-Xaa-Val...
II.5	Leu-Ile-Gln-Tyr-Asn-Ala-Ala-Gly-Glu-Tyr-Val-Val-Xaa-Ala-Lys
III.1	Ala-Ser-Trp-Thr-Arg-Pro-Glu-Lys
III.2	Ala-Glu-Trp-Arg-Ala-Met-Gly-Glu-Glu-Val-Trp-His-Ser-Lys
III.3	Gly-Leu-Gly-Glu-Ile-Ser-Ala-Ala-Ser-Glu-Phe-Lys
IV.1	Leu-Pro-Phe-Lys-Ile-Leu-Lys
V.1	Trp-Tyr-Asp-Ala-Lys
V.2	Asp-Ile-Ser-Trp-Phe-Ser-Asn-Pro-Gly-Glu-Lys
V.3	Ser-Leu-Asp-Trp-Asn-Ala-Glu-Tyr-Glu-Val-Tyr-Val-Val-Ala-Glu-Asn-Gln-Gln-Gly-Lys
VI.1	Tyr-Leu-Phe-Ser-Asp-Asp-Ser-Asp-Glu-Leu-Asp-Arg-Lys
VI.2	Lys-Ile-Phe-Gln-Lys
VI.3	Gly-Xaa-Asp-Thr-Asn-Ala-Glu-Tyr-Glu...

(табл. 3) было найдено, что последовательность 4 пептидов (I.5, III.3, V.1, V.3 в табл. 3) полностью совпадает с выведенной, а в последовательности пятого — I.2 (Thr-Gln-Pro-Val-Arg-Glu-Pro-Ser-Ala-Pro-Lys) между четвертым остатком валина и пятым остатком аргинина имеется вставка в пять аминокислотных остатков (His-Ser-Pro-Leu-Pro). Этот факт можно объяснить несколькими способами: 1) существует несколько генов, кодирующих разные формы кальмодулиннезависимой аденилатциклазы и имеющих большое структурное сходство; 2) имеется один ген, но присутствуют несколько типов мРНК, т. е. существует альтернативный сплайсинг; 3) пептид I.2 в неизменном виде находится в другой области белка.

При сравнении установленной нами частичной аминокислотной последовательности кальмодулиннезависимой аденилатциклазы из мозга быка со структурой аденилатциклаз из *Escherichia coli* [6], из *Saccharomyces cerevisiae* [7] и из *Bordetella pertussis* [8] была обнаружена значительная структурная гомология прилегающего к С-концу участка полипептидной цепи длиной в 111 аминокислотных остатков с N-концевыми областями аденилатциклаз из *E. coli* (29 идентичных аминокислот) и *B. pertussis* (33 идентичные аминокислоты). В то же время гомология кальмодулиннезависимой аденилатциклазы из мозга быка и аденилатциклазы из *S. cerevisiae*, а также аденилатциклаз из *E. coli* и *B. pertussis* не является столь очевидной (16 и 12 идентичных аминокислот соответственно) (рис. 9).

Поскольку известно, что N-концевые области аденилатциклаз из *E. coli* [6] и *B. pertussis* [8] отвечают за каталитическую активность фермента, можно предположить, что гомологичная им С-концевая область кальмодулиннезависимой аденилатциклазы из мозга быка также входит в состав каталитического участка. Наличие в установленной нами аминокислотной последовательности структуры Ala-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Gly-Lys-(Ser), где Xaa — любой аминокислотный остаток, характерной для одного из центров связывания нуклеотидов [9], может также свидетельствовать в пользу этого.

Особого внимания заслуживает последовательность Asp-(Xaa)₃₋₆-Arg-(Xaa)₁₋₂-Tyr-Leu, общая для всех четырех аденилатциклаз, которая, возможно, является частью активного центра фермента.

pAc 111 \rightarrow

1 AAG TGG TAT GAT GCC AAG GAA GCC AGC ATG GAG GGC ATC GTC ACC ATC GTG GGC CTC AAG
 1 Lys-Trp-Tyr-Asp-Ala-Lys-Glu-Ala-Ser-Met-Glu-Gly-Ile-Val-Thr-Ile-Val-Gly-Leu-Lys-

61 CCC GAG ACC ACG TAC GCA GTC CGG CTG GCG GCC CTC AAC GCC AAG GGC CTG GGC GAG ATC
 21 Pro-Glu-Thr-Thr-Tyr-Ala-Val-Arg-Leu-Ala-Ala-Leu-Asn-Gly-Lys-Gly-Leu-Gly-Glu-Ile-

121 AGC GCC GCC TCT GAG TTC AAG ACG CAG CCA GTC CAT AGC CCT CTT CCA CGG GAA CCC AGT
 41 Ser-Ala-Ala-Ser-Glu-Phe-Lys-Thr-Gln-Pro-Val-His-Ser-Pro-Leu-Pro-Arg-Glu-Pro-Ser-

181 GCA CCT AAG CTC GAA GGG CAG ATG GGA GAG GAT GGA AAC TCT ATT AAG GTG AAG CTG ATC
 61 Ala-Pro-Lys-Leu-Glu-Gly-Gln-Met-Gly-Glu-Asp-Gly-Asn-Ser-Ile-Lys-Val-Lys-Leu-Ile-

241 AAG CAA GAC GAC GGC GGC TCC CCC ATC CGA CAC TAC CTG GTC AAA TAC CGA GGC CTC TCC
 81 Lys-Gln-Asp-Asp-Gly-Gly-Ser-Pro-Ile-Arg-His-Tyr-Leu-Val-Lys-Tyr-Arg-Ala-Leu-Ser-

pAc 87 \rightarrow G

301 TCC GAG TCG AAA CCA GAG ATC AGG CTC CCG TCT GGC ATT GAC CAC GTC ATG CTC AAG TCC
 101 Ser-Glu-Trp-Lys-Pro-Glu-Ile-Arg-Leu-Pro-Ser-Gly-Ile-Asp-His-Val-Met-Leu-Lys-Ser-

361 CTG GAC TGG AAT GCC GAG TAC GAG GTC TAT GTG GTG GCC GAG AAC CAG CAG GGC AAG TCC
 121 Leu-Asp-Trp-Asn-Ala-Glu-Tyr-Glu-Val-Tyr-Val-Val-Ala-Glu-Asn-Gln-Gln-Gly-Lys-Ser-

pAc 73 \rightarrow \leftarrow pAc 87

421 AAA GCG GCG CAC TTT GTG TTC AGG ACC TCG GCC CAG CCC ACA GCC ATC CCA CGG ACC TTG
 141 Lys-Ala-Ala-His-Phe-Val-Phe-Arg-Thr-Ser-Ala-Gln-Pro-Thr-Ala-Ile-Pro-Ala-Thr-Leu-

481 GGA GGC TCC TCC GCA TCC TAC ACC TTT GTC TCA TTG CTT TTC TCT GCA GTG ACT CTT CTC
 161 Gly-Gly-Ser-Ser-Ala-Ser-Tyr-Thr-Phe-Val-Ser-Leu-Leu-Phe-Ser-Ala-Val-Thr-Leu-Leu-

541 TTG CTC TGT TAG GAAC TTGAACACACATACACAAAAATTTAAATGTCTTAAAAAGCTCAGTCTT
 181 Leu-Leu-Cys-stop

Рис. 8. Нуклеотидная последовательность фрагментов, кодирующих кальмодулин-зависимую аденилатциклазу из мозга быка, и соответствующая аминокислотная последовательность С-концевого участка полипептидной цепи фермента. Подчеркнута аминокислотная последовательность, установленная путем анализа пептидов. В положении 337—339 в кДНК клона pAc 111 находится триплет АТТ, кодирующий Ile, а в клоне pAc 87 — АГТ, кодирующий Ser. Стрелками обозначены начало и конец фрагментов кДНК

Экспериментальная часть

В работе использовали активированную бромцианом сефарозу 4В, DEAE-сефацель, белок-А-сефарозу (Pharmacia, Швеция), дитиотреит, роданид аммония, соевый лецитин, PMSF (Serva, ФРГ), Lubrol PX, CHAPS, аprotенин, лейпептин, пепстатин, фенантролин, АТФ, сАМФ, трис, азид натрия (Sigma, США), EDTA, EGTA, MgCl₂, CaCl₂, MnSO₄, трифторуксусную кислоту (Merck, ФРГ), акриламид, N,N'-метилевбисакриламид, персульфат аммония, тетраметилэтилендиамин, бромфеноловый синий, кумасси ярко-голубой G-250, SDS, бацитрацин (Bio-Rad, США), [α -³²P]АТФ (удельная радиоактивность 3 Ки/ммоль; Amersham, Англия), лизилэндопептидазу (3 ед. акт./мг; Wako purechemical industries, Япония). Все остальные реактивы имели квалификацию ос.ч.

Состав буферного раствора А: 20 мМ трис-HCl (pH 7,4), 0,2 М сахараза, 5 мМ MgCl₂, 1 мМ EDTA, 1 мМ EGTA, 1 мМ дитиотреит, 1 мМ PMSF, 0,02% азид натрия.

§ Состав буферного раствора В: 0,1 М фосфат натрия (pH 7,5), 0,15 М NaCl.

Смесь ингибиторов протеолитических ферментов (мг/мл): бацитрацин — 10, трипсиновый ингибитор из сои (Calbiochem, США) — 10,

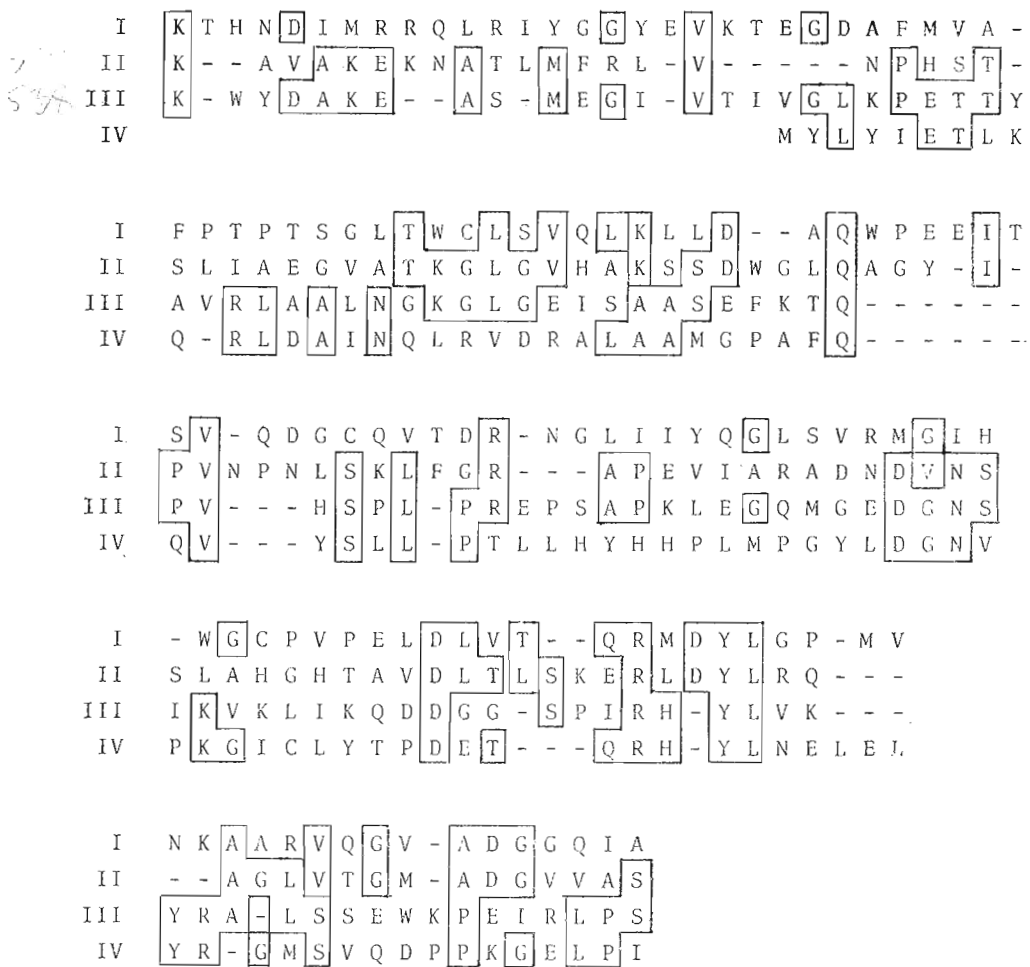


Рис. 9. Гомологичные участки аминокислотных последовательностей аденилатциклазы из *S. cerevisiae* (I), *B. pertussis* (II), мозга быка (III) и *E. coli* (IV). Обведены идентичные аминокислотные остатки

апротенин — 5, пепстатин — 5, лейпентин — 5, фенантролин — 10. Добавляли 2 мкл смеси на 1 мл раствора. Все работы проводились при 4° С.

Определение аденилатциклазной активности. Ферментативную активность определяли по методу Соломона [10] с использованием [α-³²P]АТФ. Количество белка в пробе варьировало от 0,01 до 10 мкг. Концентрацию белка определяли по методу [11], используя БСА в качестве стандарта.

Получение мембран коры головного мозга быка. Мембраны выделяли по методике [2]. Полученные мембраны ресуспендировали в буфере А с 2 М NaCl (100 г мембран на 2 л буфера), инкубировали 30 мин и осаждали центрифугированием (12 000 об/мин, 20 мин). Затем осадок дважды промывали буфером А.

Получение препарата солюбилизованных мембран. Мембраны гомогенизировали при помощи стеклянного гомогенизатора Ругех 7725 в буфере А, содержащем 1% Lubrol PX или 0,6% CHAPS и смесь ингибиторов протеолитических ферментов. Солюбилизацию Lubrol PX проводили при соотношении 1 г мембран на 7 мл раствора, солюбилизацию CHAPS — в соотношении 1 г мембран на 100 мл раствора.

Ионообменная хроматография на DEAE-сефацелле. На колонку с DEAE сефацелем (2,5 × 2,5 см), уравновешенную буфером А, наносили 420 мл препарата солюбилизованных CHAPS белков. Колонку промывали (10 мл/ч) буфером А, буфером А с 2 М NaCl, снова буфером А и буфером А с 1% Lubrol PX. Элюцию проводили буфером А с 0,4% Lubrol PX и 1 М NaCl. Объединяли фракции, обладающие аденилатциклазной активностью.

Иммунизация мышей. Мышей линии BALB/c иммунизировали препаратом аденилатциклазы после хроматографии на DEAE-сефацэле (содержание С-белка не более 1%) путем введения внутривнутрино 4 раза с 2-недельными интервалами по 100 мкг антигена.

Слияние и клонирование клеток. Для получения миелом использовали миеломную клеточную линию X63 Ag⁸⁶³³. Слияние проводили по модифицированному методу Келлера и Мильштейна [12]. Через 10—14 сут после появления гибридных клонов проводили тестирование на синтез специфических антител с помощью метода ИФА [13]. В качестве проявляющих антител использовали коммерческую кроличью сыворотку против иммуноглобулинов мыши, конъюгированную с пероксидазой хрена, в разведении 1 : 1000. Гибридомы клонировали методом лимитирующего разведения.

Получение асцитов. Мышам линии BALB/c, предварительно обработанным пристаном (2,6,10,14-тетраметилдеканом, Aldrich Chemical Co., США), вводили внутривнутрино $5 \cdot 10^8$ живых гибридных клеток. Через 10—14 сут отбирали асцитную жидкость.

Иммуноблоттинг. Для выявления иммунореактивных белков полипептиды с ПААГ переносили на нитроцеллюлозу (Trans-Blot transfer medium, Bio-Rad, США) электрофорезом в поперечном направлении. Идентификацию полос антигена на нитроцеллюлозной реплике проводили с помощью кроличьих антител против иммуноглобулинов мыши, конъюгированных с пероксидазой хрена, в разведении 1 : 1000.

Влияние антител на ферментативную активность аденилатциклазы. К 50 мкл препарата аденилатциклазы добавляли 25 мкл асцитной жидкости, содержащей 0,5 мкг белка, либо увеличивающееся количество антител (2—60 мкг). После инкубирования при встряхивании в течение 14 ч при 4° С определяли аденилатциклазную активность препаратов.

Иммунопреципитация аденилатциклазы. 500 мкг белок-А-сефарозы инкубировали при 30° С с 1 мл раствора иммуноглобулинов (концентрация варьировала от 2 до 60 мкг/мл). После промывки буфером А сорбент инкубировали 14 ч при 4° С с 200 мкл препарата аденилатциклазы. Результаты иммунопреципитации определяли по убыли ферментативной активности в супернатанте.

Приготовление иммуносорбента. Моноклональные антитела из асцитной жидкости фракционировали путем осаждения сульфатом аммония и последующей ионообменной хроматографией на DEAE-сефацэле [14]. Имобилизацию антител на активированную бромистым цианом сефарозу проводили по стандартной методике [15] с плотностью посадки 1 мг белка на 1 мл влажного сорбента.

Аффинная хроматография на иммуносорбенте. Препарат солиобилизованных Lubrol PX белков инкубировали с иммуносорбентом при встряхивании 14 ч в присутствии 0,5 М NaCl. Сорбент переносили в колонку, промывали буфером А с 0,1% Lubrol PX, содержащим 2 М NaCl, затем буфером А с 1% Lubrol PX. Специфическую элюцию проводили либо 3 М роданидом аммония с 1% Lubrol PX, либо 4 М MgCl₂ с 1% Lubrol PX.

Получение антисыворотки к аденилатциклазе. Кролика иммунизировали электрофоретически чистым препаратом полипептида с M 140 кДа, выделенным электроэлюцией из ПААГ. Инъекции проводили с интервалом в 2 нед. На одну иммунизацию брали 100 мкг полипептида в 0,2 мл буфера В. Первую иммунизацию осуществляли в смеси с равным количеством полного адьюванта Фрейнда, последующие — с неполным адьювантом Фрейнда. Кровь брали спустя 7 сут после третьей иммунизации. Титр полученной антисыворотки определяли методом ИФА.

Очистка моноспецифических антител. Очистку проводили при помощи аффинной хроматографии на нерастворимом конъюгате БСА с полипептидом с M 140 кДа. Для получения конъюгата 25 мг БСА и 0,26 мг полипептида с M 140 кДа растворяли в 0,4 мл буфера В, содержащего 2% SDS. К полученному раствору добавляли глутаровый альдегид до концентрации 1,5%. Реакцию вели 20 ч при 20° С. Образовавшийся осадок тщательно гомогенизировали, промывали буфером В и инкубировали с 3 мг поли-

клональных антител из сыворотки кролика при 4° С. Через 14 ч аффинный сорбент промывали буфером В, вымывая не связавшиеся с конъюгатом антитела; специфические антитела элюировали 0,2 М глициновым буфером (рН 2,5).

Аффинная хроматография на кальмодулин-сефарозе. Кальмодулин выделяли по методу [16] и иммобилизовали на активированную бромцианом сефарозу с плотностью 0,7 мг на 1 мл влажного сорбента согласно [17]. Аффинную хроматографию на кальмодулин-сефарозе проводили как описано в [18].

Электрофоретический анализ. Препарат С-белка предварительно концентрировали ультрафильтрацией на мембране ХМ-50 (Amicon, Дания), осаждали 70% холодным метанолом и центрифугировали 20 мин при 3000 об/мин. Осадок растворяли в буфере для нанесения. Электрофорез проводили по методу [19] в 8% разделяющем геле в присутствии 0,1% SDS.

Электроэлюция белковых полос из ПААГ. 1/20 часть белков, наносимых на ПААГ, флуоресцентно метили по методу [20]. Полипептиды элюировали из геля электрофоретически по модифицированной методике [21] в 50 мМ трис-боратном буфере (рН 8,4).

Определение аминокислотного состава. Аминокислотный анализ проводили на приборе D-500 (Durrum, США) после гидролиза образцов в 5,7 н. HCl в течение 24 ч под вакуумом.

Гидролиз аденилатциклазы бромцианом. К 2 нМ лиофильно высушенного препарата аденилатциклазы, выделенного электроэлюцией из ПААГ, добавляли 200 мкл 70% трифторуксусной кислоты и 3 мг бромциана. Гидролиз вели при комнатной температуре 24 ч.

Гидролиз лизилэндопептидазой из A. liticus и разделение пептидов. 4 нМ лиофильно высушенного препарата аденилатциклазы, выделенного электроэлюцией из ПААГ, растворяли в 25 мМ трис-HCl-буферном растворе (рН 9,1), содержащем 0,1% SDS, и добавляли фермент из соотношения фермент/субстрат 1 : 60. Реакционную смесь инкубировали 40 ч при 37° С. Первоначальное фракционирование проводили методом гель-фильтрации на колонке Toyopearl HW 40 (1×80 см), уравновешенной смесью уксусной кислоты, ацетонитрила и воды (1 : 2 : 7). Полученные фракции разделяли на колонке Ultrasphere ODS (4,6 × 150 мм) градиентом ацетонитрила от 5 до 70% в 0,1% трифторуксусной кислоте. Пептиды детектировали при 206 и 280 нм. Скорость подачи элюента 0,8 мл/мин.

Определение аминокислотной последовательности проводили при помощи автоматической деградации на газофазном секвенаторе 470 А (Applied Biosystems, США) с идентификацией ФТГ-производных аминокислот по методике [22].

Выделение клона, содержащего вставку кДНК аденилатциклазы. Тотальную РНК из коры головного мозга быка получали по методу [23], poly(A⁺)-РНК выделяли хроматографией на oligo(dT)-целлюлозе [24]. Первую и вторую цепи кДНК синтезировали по методике [25], в качестве затравки при синтезе первой цепи использовали статистический набор олигодезоксирибонуклеотидов длиной от 8 до 20 оснований. кДНК лигировали с предварительно расщепленной рестриктазой SmaI и дефосфорилированной плазмидой рС 8 в соотношении 1 : 10 по весу. Рекомбинантными плазмидами трансформировались клетки *E. coli*, штамм JM-101, по методике [26]. Ник-трансляцию фрагментов кДНК и эксперименты по гибридизации с олигодезоксирибонуклеотидными зондами и ник-трансированными пробами выполняли согласно [27]. Синтез олигодезоксирибонуклеотидных зондов проводили на автоматическом синтезаторе (Applied Biosystems, США).

Определение нуклеотидной последовательности ДНК осуществляли методом Максама — Гилберта [28] в твердофазном варианте [29].

ЛИТЕРАТУРА

1. Gilman A. G. // Cell. 1984. V. 36. № 3. P. 577—579.
2. Andreasen T. J., Heideman W., Rosenberg G. B., Storm D. R. // Biochemistry. 1983 V. 22. № 44. P. 2757—2762.

3. Yeager R. E., Heideman W., Rosenberg G. B., Storm D. R. // *Biochemistry*. 1985. V. 24. № 14. P. 3776—3783.
4. Smigel M. D. // *J. Biol. Chem.* 1986. V. 261. № 4. P. 1976—1982.
5. Pfeuffer E., Dreker R.-M., Metzger H., Pfeuffer T. // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 1985. V. 82. № 10. P. 3086—3090.
6. Aiba H., Mori K., Fanaka M., Doi F., Roy A., Danchin A. // *Nucl. Acids Res.* 1984. V. 12. № 24. P. 9427—9440.
7. Kalaoka T., Broek D., Wigler M. // *Cell*. 1985. V. 43. № 3. P. 493—505.
8. Glaser P., Ladant D., Sezer O., Pichot F., Ullman A., Danchin A. // *Mol. Microbiol.* 1988. V. 2. № 1. P. 19—30.
9. Möller W., Amons R. // *FEBS Lett.* 1985. V. 186. № 1. P. 1—7.
10. Solomon Y., Londos G., Rodbell M. // *Anal. Biochem.* 1974. V. 58. № 2. P. 541—548.
11. Grossberg G. // *Anal. Biochem.* 1977. V. 79. № 1. P. 544—552.
12. Köhler G., Milstein C. // *Nature*. 1975. V. 256. № 5516. P. 498—501.
13. Clark R., Engvall E. *Enzyme-Immunoassay* / Ed. Maggio E. T. Florida: Boca Raton, 1981. P. 167—179.
14. Hudson L., Hay F. C. *Practical Immunology*. London, Edinburg, Boston, Melburn: Black Well Sci. Publ. (2nd Ed.), 1980. P. 156—169.
15. Eveleigh J. W., Levy D. E. // *J. Solid-phase Biochem.* 1977. V. 2. P. 45—78.
16. Watterson D. M., van Eldik L. J., Smith R. E., Vanaman T. C. // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 1976. V. 73. № 8. P. 2711—2715.
17. Westcott K. R., La Porte D. R., Storm D. R. // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 1979. V. 76. № 1. P. 204—208.
18. Зайцева Ф. Б., Петров В. М., Елустратова Е. Ю., Липкин В. М. // *Биол. мембраны*. 1988. Т. 5. № 11. С.
19. Laemmly U. K. // *Nature*. 1979. V. 227. № 5259. P. 680—685.
20. Eng P. R., Parkes C. O. // *Anal. Biochem.* 1974. V. 59. № 1. P. 323—325.
21. Stralfors P., Belfrage S. // *Anal. Biochem.* 1983. V. 128. № 1. P. 7—10.
22. Овчинников Ю. А., Липкин В. М., Тележинская И. П., Шуваева Т. М., Обухов А. Н., Ищенко К. А., Шемякин В. В. // *Биоорганическая химия*. 1985. Т. 11. № 10. С. 1301—1314.
23. Chirgwin J. M., Przybyla A. E., MacDonald R. J., Rutter W. J. // *Biochemistry*. 1979. V. 18. № 24. P. 5294—5299.
24. Aviv P., Leder P. // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 1972. V. 69. № 5. P. 1408—1412.
25. Gubler U., Hoffman B. J. // *Gene*. 1983. V. 75. № 2/3. P. 263—269.
26. Hanahan D. // *DNA Cloning* / Ed. Glover D. M. Oxford: IRL Press, 1985. V. 1. P. 109—135.
27. Maniatis T., Fritsch E. F., Sambrook J. *Molecular Cloning a Laboratory Manual*. N. Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1982.
28. Maxam A., Gilbert W. // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 1977. V. 74. № 2. P. 560—564.
29. Chuvpilo S. A., Kravchenko V. V. // *FEBS Lett.* 1984. V. 179. № 1. P. 34—36.

Поступила в редакцию
16.VI.1988

CATALYTIC COMPONENT OF CALMODULIN-INDEPENDENT ADENYLATE CYCLASE FROM BOVINE BRAIN. ISOLATION AND DETERMINATION OF PARTIAL AMINO ACID SEQUENCE

LIPKIN V. M., MIRZOEVA S. F., DRANITSINA S. M., MOSHNYAKOV M. V.,
PETROV V. M., CHERNOVA M. N., SURINA E. A., OBUKHOV A. N., LEVINA N. B.,
KHRAMTSOV N. V., ANDREEVA S. G., RAKITINA T. V., FESHCHENKO E. A.,
ОВЧИННИКОВ Ю. А.

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

The catalytic component of calmodulin-independent adenylylase of cattle cerebral cortex was solubilized and purified to the homogeneous state. The conditions for preparative obtaining of the enzyme on the column with immobilized antibodies to adenylylase were found. These antibodies were proved to interact with the calmodulin-independent rather than the calmodulin-dependent form of the enzyme. Molecular mass of the calmodulin-independent adenylylase determined electrophoretically is 140 ± 10 kDa. Amino acid composition of the enzyme and sequences of its fragment⁸ (in total 300 amino acid residues) obtained upon treatment with lysyl-specific proteinase from *Achromobacter luteus* were determined. Clone containing a cDNA 605 bp insertion coding for the 53 amino acid residue fragment of adenylylase was isolated from the bovine brain cDNA library. Homology of this fragment to the known sequences of *Escherichia coli* and *Bordetella pertussis* adenylylases was revealed.