



УДК 577.112 (012.6 + 083.3)

© 1994 Д. И. Ларин, М. И. Шахпаронов,
М. Б. Костина, Н. Н. Модянов

ИЗУЧЕНИЕ ТРАНСМЕМБРАННОЙ ОРГАНИЗАЦИИ С-КОНЦЕВОГО
ДОМЕНА α -СУБЪЕДИНИЦЫ Na^+, K^+ -АТФ-азы С ПОМОЩЬЮ
ПОЛИКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ К ЕЕ ПРИМЕМБРАННЫМ
ФРАГМЕНТАМ

Институт биоорганической химии им М. М. Шемякина и
Ю. А. Овчинникова РАН, Москва

Ключевые слова: Na^+, K^+ -АТФ-аза; антитела; белки гибридные.

Пять фрагментов α -субъединицы Na^+, K^+ -АТФ-азы свиньи (с координатами 825—842, 868—886, 928—945, 946—967, 962—978) синтезированы в *E. coli* в виде гибридных белков с фактором некроза опухолей человека. Ко всем пяти гибридным белкам получены поликлональные антитела. С помощью иммуоферментного анализа на интактных, лизированных и солиобилизованных эмбриональных клетках почек свиньи показано, что фрагменты 825—842, 928—945 и 962—978 содержат внутриклеточные эпитопы и не содержат внеклеточных, а фрагменты 868—886 и 946—967 вообще не содержат экспонированных эпитопов. На основании полученных данных предложены новые элементы трансмембранной организации Na^+, K^+ -АТФ-азы.

Na^+, K^+ -Транспортирующая аденозинтрифосфатаза (Na^+, K^+ -АТФ-аза, или натриевый насос) является одной из наиболее распространенных систем активного транспорта ионов. Этот фермент присутствует в мембранах всех эукариотических клеток и участвует во многих физиологических процессах, таких, как проведение нервного импульса, сокращение сердечной мышцы, водно-солевой обмен в коже и почках, и осуществляет транспорт ионов Na^+ и K^+ через цитоплазматическую мембрану против градиентов их электрохимических потенциалов за счет энергии гидролиза АТФ (для обзора см. [1]). Молекула фермента состоит из эквимольных количеств субъединиц двух типов субъединиц: α (110 кДа) и β (белковая часть 35 кДа, углеводная — 10 кДа). К настоящему времени определены аминокислотные последовательности обеих субъединиц фермента [2—5], локализованы участки каталитической субъединицы, участвующие в связывании АТФ и фосфорилировании [6, 7], связывании сердечных гликозидов [8]. Однако механизм

транспорта ионов и его сопряжения с фосфорилированием и дефосфорилированием фермента до сих пор остается неизвестным.

Чтобы попытаться понять основные принципы функционирования Na^+, K^+ -АТФ-азы, необходимо изучить ее трансмембранную организацию при различных функциональных состояниях, т. е. установить, какие участки полипептидной цепи экспонированы на наружную и внутреннюю поверхности мембраны, а какие расположены в липидном матриксе. Со времени определения первичной структуры обеих субъединиц фермента из различных видов животных было предложено большое количество «двумерных» моделей трансмембранной организации Na^+, K^+ -АТФ-азы [2, 3, 9—14]. Все они основываются главным образом на анализе профилей гидрофобности полипептидных цепей фермента. Основными методами экспериментальной проверки этих моделей являются ограниченный протеолиз, позволяющий выявить экспонированные участки фермента [15], мечение гидрофобными [16, 17] или непроникающими [18] реагентами для определения погруженных в мембрану фрагментов полипептидной цепи, а также иммунохимический подход [19—22], который мы и применили в настоящей работе.

Ранее для получения информации о пространственной организации фермента и его субъединиц в мембране с помощью иммунологических методов использовали обычно следующую последовательность операций: сначала получали набор моноклональных антител к препаратам Na^+, K^+ -АТФ-азы или ее субъединиц (или больших фрагментов этих субъединиц), затем изучали расположение эпитопов этих антител относительно цитоплазматической мембраны и параллельно определяли, какие аминокислотные последовательности образуют эти эпитопы. Основные трудности при использовании такого подхода возникают на стадии локализации эпитопа в полипептидной цепи, а именно при хроматографическом разделении пептидов, получающихся в результате химического или ферментативного гидролиза АТФ-азы, взаимодействующий с антителом пептид трудно выделить в индивидуальном виде. Поэтому, несмотря на использование в подобном рода исследованиях дорогостоящих методов (моноклональные антитела, ВЭЖХ, N-концевой аминокислотный анализ), они зачастую приводят к противоречивым результатам [22, 23]. Только после точного установления эпитопов таких моноклональных антител с помощью синтетических пептидов имеет смысл изучение их расположения относительно цитоплазматической мембраны [21, 24].

В этой работе нами был предложен другой подход в иммунохимическом анализе трансмембранной организации α -субъединицы Na^+, K^+ -АТФ-азы, заключающийся в наработке генно-инженерным способом небольших фрагментов фермента (17—22 аминокислоты), получении поликлональных антител к ним и исследовании с помощью этих антител расположения выбранных фрагментов относительно цитоплазматической мембраны.

Пять фрагментов интенсивно изучаемого в последнее время С-концевого домена α -субъединицы Na^+, K^+ -АТФ-азы свиньи было выбрано для исследования: 825—842, 868—886, 928—945, 946—967, 962—978. В соответствии с различными моделями трансмембранной организации фермента их располагают либо внутри, либо снаружи клетки, либо внутри цитоплазматической мембраны [2, 3, 9—14, 25].

Для наработки выбранных фрагментов α -субъединицы Na^+, K^+ -АТФ-азы в больших количествах, необходимых при иммунизации кроликов, тестировании полученных поликлональных антител и очистке этих антител с помощью аффинной хроматографии, был выбран генно-инженерный подход как наиболее эффективный. Фрагменты АТФ-азы были экспрессированы в *E. coli* в составе гибридных белков с фактором некроза опухолей человека (TNF) [26]. Очищенными гибридными белками были иммунизированы кролики. TNF выступал при этом в качестве белка-носителя, замедляющего разрушение присоединенного к его С-концевому аминокислотному остатку фрагмента АТФ-азы и облегчающего его поглощение антигенпрезентирующими клетками (аналогично широко используемым белкам-носителям — гемоцианину улитки и бычьему сывороточному альбумину, которые химически присоединяются к пептидам [27]).

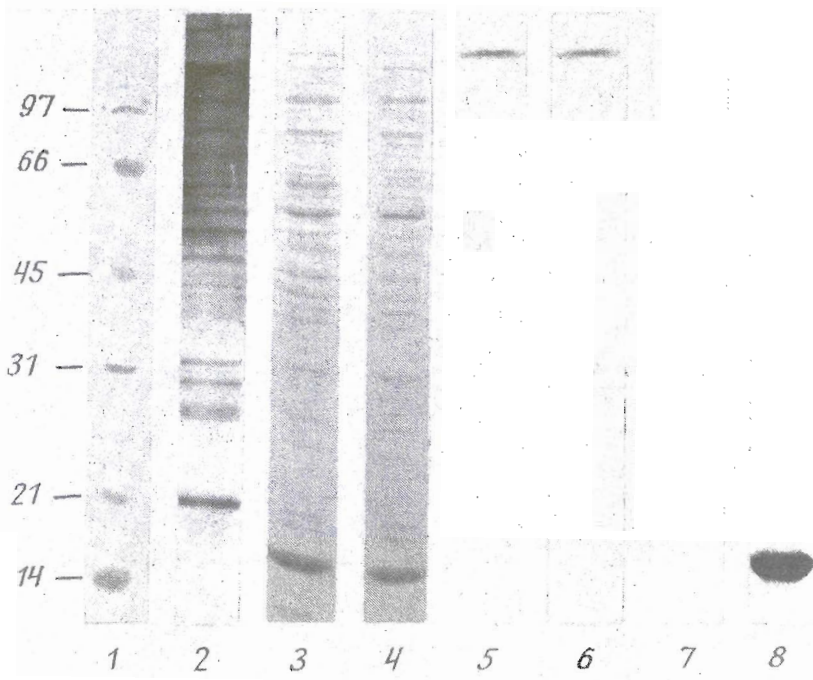


Рис. 1. Иммуноблоттинг с поликлональными антителами к фрагменту 825—842 после переноса белков из 10% SDS-ПААГ. 1 — белковые стандарты молекулярной массы, кДа (Bio-Rad, США); 2, 5, 6 — суммарные белки микросом почек свиньи; 3, 7 — TNF; 4, 8 — гибридный белок, состоящий из TNF и фрагмента 825—842 α -субъединицы Na^+, K^+ -АТФ-азы свиньи. 1—4 — окрашены амидовым черным; 5, 7, 8 — обработаны поликлональными антителами к фрагменту 825—842, 6 — обработано моноклональным антителом 4С1. Поликлональные антитела к другим изучавшимся в этой работе фрагментам Na^+, K^+ -АТФ-азы дают при иммуноблоттинге с соответствующим гибридным белком, TNF и суммарными белками микросом почек аналогичную картину

Поликлональные антитела к фрагментам АТФ-азы были очищены в две стадии с помощью аффинной хроматографии на колонках с ковалентно иммобилизованными на BrCN-сефарозе гибридными белками TNF-(фрагмент Na^+, K^+ -АТФ-азы) или TNF. Очищенные поликлональные антитела взаимодействовали с соответствующими гибридными белками при иммуноблоттинге, не взаимодействовали с TNF и «узнавали» единственную полосу размером около 110 кДа при иммуноблоттинге суммарных белков из микросом почек свиньи (рис. 1) (с этой же полосой взаимодействовало также охарактеризованное ранее [28] антитело 4С1 к Na^+, K^+ -АТФ-азе).

Для определения расположения выбранных фрагментов α -субъединицы Na^+, K^+ -АТФ-азы относительно цитоплазматической мембраны с полученными к ним поликлональными антителами были проведены две серии опытов. В первой из них антитела в различных разведениях инкубировали в модифицированной Дульбекко среде Игла (DMEM) с интактными или лизированными гипотоническим шоком клетками линии РКЕ (эмбриональные клетки почек свиньи), после чего клетки (или полученные в результате их лизиса плазматические мембраны) вместе со связавшимися с ними антителами осаждали центрифугированием и после отмывок вносили в лунки полистиролового планшета, где с помощью конъюгированных с пероксидазой хрена антикроличьих иммуноглобулинов определяли относительное количество связавшихся со своими эпитопами антител. Результаты (рис. 2) показывают, что поликлональные антитела, полученные к фрагментам 825—842, 928—945 и 962—978, способны связываться с лизирован-

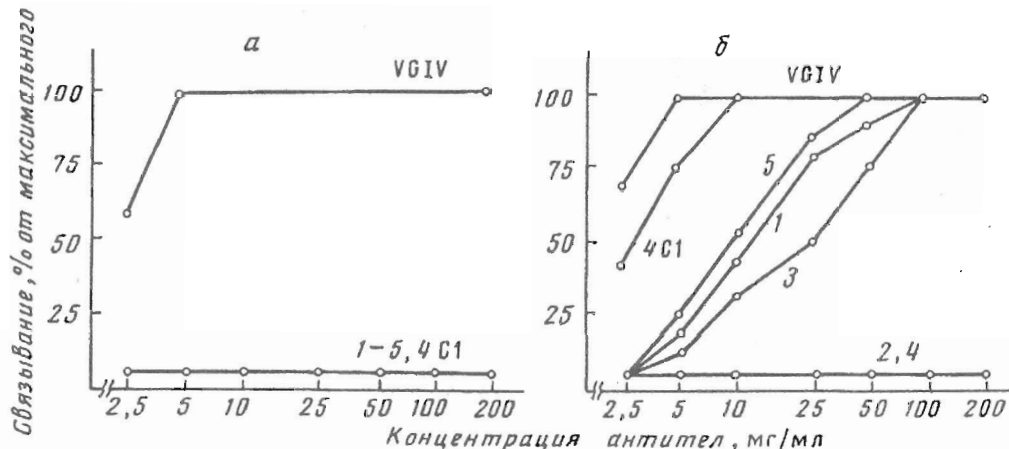


Рис. 2. Иммуноферментный анализ связывания intactных клеток РКЕ (а) и фракции плазматических мембран этих клеток (б) с поликлональными антителами к фрагментам α -субъединицы Na^+, K^+ -АТФ-азы с координатами 825—842 (1), 868—886 (2), 928—945 (3), 946—967 (4), 962—978 (5). По оси ординат отложен натуральный логарифм концентрации антител. Моноклональные антитела VGIV и 4C1 использовались в качестве контролей на соответственно вне- и внутриклеточный эпитоп

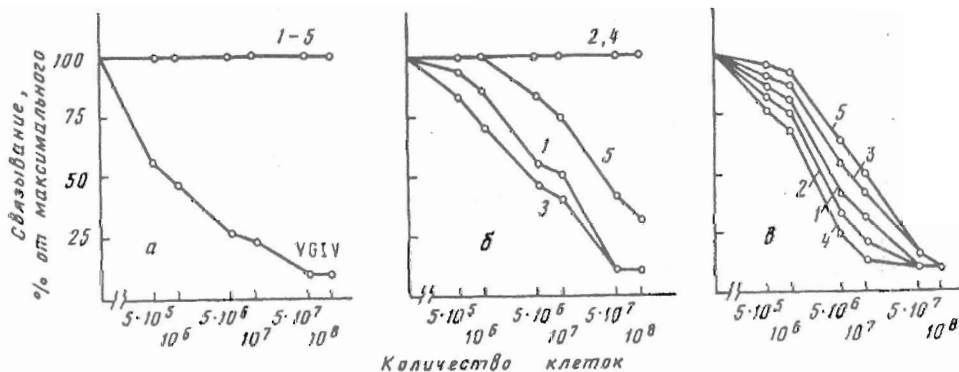


Рис. 3. Ингибирование intactными клетками РКЕ (а), фракцией плазматических мембран этих клеток (б) и солюбилизованными плазматическими мембранами (в) связывания с денатурированной Na^+, K^+ -АТФ-азой поликлональных антител к фрагментам α -субъединицы Na^+, K^+ -АТФ-азы с координатами 825—842 (1), 868—886 (2), 928—945 (3), 946—967 (4), 962—978 (5) в конкурентном иммуноферментном анализе. По оси абсцисс отложен десятичный логарифм количества клеток. Моноклональное антитело VGIV использовалось в качестве контроля на внешний эпитоп

ными, но не с intactными клетками. А антитела к фрагментам 868—886 и 946—967 не взаимодействуют ни с intactными, ни с лизированными клетками, несмотря на их способность узнавать α -субъединицу Na^+, K^+ -АТФ-азы на блоте.

Во второй серии опытов изучали способность intactных клеток РКЕ, плазматических мембран этих клеток или солюбилизованных додецилсульфатом натрия плазматических мембран ингибировать связывание поликлональных антител с денатурированной Na^+, K^+ -АТФ-азой в конкурентном иммуноферментном анализе. Из рис. 3 видно, что intactные клетки РКЕ не способны ингибировать взаимодействие с денатурированной Na^+, K^+ -АТФ-азой полученных поликлональных антител. Фракция плазматических мембран лизированных клеток РКЕ ингибировала связывание с АТФ-азой антител к фрагментам 825—842, 928—945 и 962—978. Солюбилизованные мембраны ингибировали связывание с денатурированной Na^+, K^+ -АТФ-азой поликлональных антител ко всем пяти фрагментам, причем приблизительно в одинаковой степени.

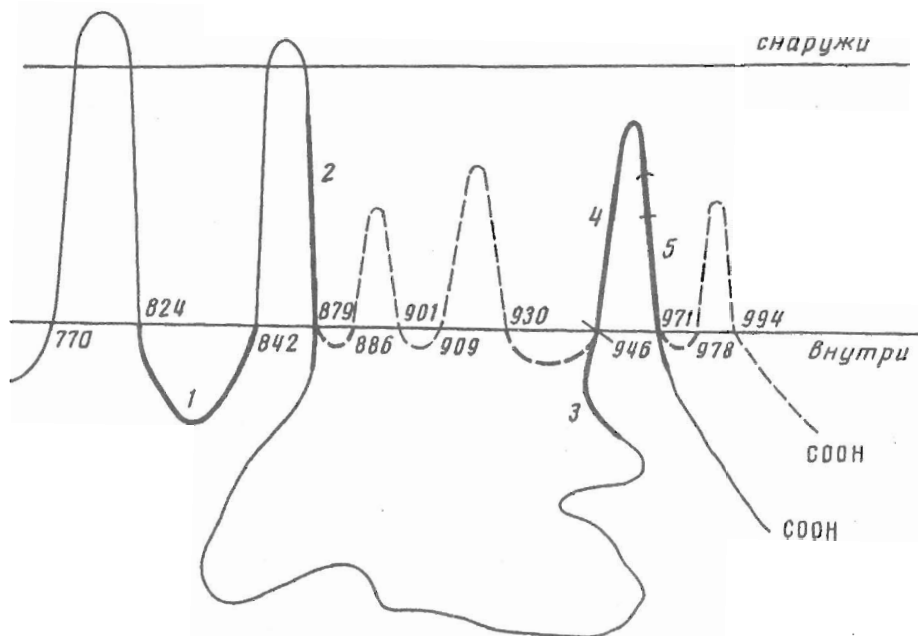


Рис. 4. Предполагаемая «двумерная» модель трансмембранной организации С-концевого домена α -субъединицы Na^+, K^+ -АТФ-азы свиньи. Жирной линией выделены фрагменты полипептидной цепи, локализация которых изучалась в этой работе: 1 — 825—842, 2 — 868—886, 3 — 928—945, 4 — 946—967, 5 — 962—978. Штриховой линией обозначена альтернативная возможность укладки полипептидной цепи. С-Концевая граница фрагмента 3 и обе границы фрагмента 4 отмечены черточками. N-Концевая граница фрагмента 5 обозначена скобкой

Результаты проделанных опытов по определению расположения фрагментов α -субъединицы Na^+, K^+ -АТФ-азы относительно цитоплазматической мембраны позволяют сделать следующие выводы: фрагменты 825—842, 928—945 и 962—978 содержат внутриклеточные эпитопы и не содержат внеклеточных, а фрагменты 868—886 и 946—967 вообще не содержат экспонированных эпитопов, т. е. целиком погружены в липидный матрикс.

Недавно Бернс и Прайс [29] сообщили о том, что замена единственного аминокислотного остатка $\alpha 1$ -изоформы каталитической субъединицы Na^+, K^+ -АТФ-азы овцы Т 797 (соответствующего остатку Т 798 Na^+, K^+ -АТФ-азы свиньи) на N генерирует устойчивый к уабаину фермент. По-видимому, этот остаток принимает участие в связывании уабаина, а значит, располагается либо снаружи клетки, либо внутри мембраны ближе к ее внеклеточной поверхности. В сочетании с этим фактом продемонстрированное в нашей работе наличие внутри- и отсутствие внеклеточных эпитопов в составе фрагмента 825—842 свидетельствует о том, что фрагмент 770—824, по-видимому, дважды пересекает липидный бислой (рис. 4). При этом погруженными в мембрану оказываются 6 отрицательно заряженных аминокислотных остатков (Е 781, D 803, D 807, Е 817 и Е 820). Джевэлмотс и Лингрел [30] с помощью сайт-направленного мутагенеза показали функциональную значимость Е 781 (Е 778 в случае исследовавшейся этими авторами $\alpha 2$ -изоформы каталитической субъединицы Na^+, K^+ -АТФ-азы крысы), D 803 и D 807. Учитывая эти результаты, а также данные Шани-Зеклер с соавт. [31] и Аргуэло и Каплана [32] об участии карбоксильных групп в формировании катионсвязывающих доменов Na^+, K^+ -АТФ-азы и Капасо с соавт. [33] о внутримембранном расположении катионсвязывающих центров Na^+, K^+ -АТФ-азы, можно

предположить участие отрицательно заряженных аминокислотных остатков фрагмента 770—824 в транспорте катионов через мембрану.

Наличие внутриклеточных эпитопов в составе фрагмента 825—842 и отсутствие экспонированных последовательностей в составе фрагмента 868—886 говорят о том, что и между этими фрагментами есть, по-видимому, небольшой внеклеточный участок (рис. 4).

Наличие внутриклеточных эпитопов в составе фрагментов 928—945 и 962—978 и отсутствие экспонированных участков в составе фрагмента 946—967 свидетельствуют о том, что фрагмент 946—967, по-видимому, представляет собой не пронизывающую мембрану α -спираль, а погруженный в липидный матрикс гидрофобный участок полипептидной цепи (рис. 4). Следует также заметить, что максимальное поглощение (A_{492}) в иммуноферментном анализе с лизированными клетками РКЕ и поликлональными антителами к фрагменту 962—978 было значительно ниже, чем в случае антител к фрагментам 825—842 и 928—945 (в среднем $0,42 \pm 0,07$ против $1,52 \pm 0,12$). Таким образом, фрагмент 962—978, по всей видимости, большей частью погружен в мембрану, и лишь небольшой его участок экспонирован в цитоплазму.

Вполне возможно, что погруженные в мембрану со стороны цитоплазмы гидрофобные фрагменты α -субъединицы длиной 15—20 аминокислотных остатков являются общим элементом пространственной укладки молекулы Na^+, K^+ -АТФ-азы. В этом случае не исключено, что относительно гидрофобные фрагменты 909—930, 978—994, а также, возможно, 886—901 погружены в мембрану со стороны цитоплазмы (рис. 4, штриховая линия).

Таким образом, трансмембранная организация Na^+, K^+ -АТФ-азы характеризуется, по-видимому, наличием не только гидрофобных трансмембранных столбов, но и сильно отрицательно заряженных трансмембранных фрагментов, а также гидрофобных участков полипептидной цепи, погруженных в мембрану, но не пересекающих ее. Возможно, отрицательно заряженные трансмембранные фрагменты играют ключевую роль в переносе катионов через мембрану, а погруженные в мембрану фрагменты участвуют в формировании правильной укладки фермента в мембране.

Экспериментальная часть

В работе использовали: полный и неполный адьюванты Фрейнда (Gibco, США), сефарозу 4В (Pharmacia, Швеция), бромциан (Merck, Германия), акрил-амид, N, N' -метиленбисакриламид, персульфат аммония, тетраэтилметилендиамин, β -меркаптоэтанол, додецилсульфат натрия, кумасси G250, конъюгированные с пероксидазой кроличьи антитела против иммуноглобулинов мыши, конъюгированные с пероксидазой козы антитела против иммуноглобулинов кролика (Bio-Rad, США).

Экспрессию и очистку гибридных белков, состоящих из TNF и присоединенных к его С-концевой области фрагментов α -субъединицы Na^+, K^+ -АТФ-азы свиньи, мы описали ранее [26]. Иммунизацию кроликов этими гибридными белками проводили по схеме Уолтера и соавт. [34].

Поликлональные антитела очищали с помощью аффинной хроматографии на колонках с ковалентно иммобилизованными на ВгСN-сефарозе гибридными белками TNF-фрагмент Na^+, K^+ -АТФ-азы) или TNF. Активацию сефарозы бромцианом и связывание ее с гибридным белком или TNF проводили, как описано в работе [35].

Электрофорез образцов в полиакриламидном геле в присутствии SDS проводили по методу Лэммли [36]. Электроперенос разделенных белков на нитроцеллюлозные пластинки и их последующее иммуноокрашивание с помощью полученных поликлональных антител осуществляли как описано в работе [37].

Выделение Na^+, K^+ -АТФ-азы из наружного мозгового слоя почек свиньи проводили по модифицированному методу Йоргенсена [38, 39].

Эксперименты по локализации эпитопов антител снаружи или внутри клетки проводили с помощью прямого и конкурентного иммуноферментного анализа на клетках линии РКЕ. Образец, содержащий 10^6 клеток, осаждали центрифугированием при 300g в центрифуге Eppendorf в течение 10 мин, осадок ресуспендировали в 500 мкл среды DMEM и центрифугировали еще раз при тех же условиях. Далее образцы разделяли на две части; одну часть вновь ресуспендировали в 200 мкл среды DMEM, а другую лизировали гипотоническим шоком в 500 мкл воды с последующими центрифугированиями при 1000g (для удаления ядер и митохондрий) и 100 000g (для осаждения плазматических мембран) и ресуспендированием в 200 мкл среды DMEM. К интактным и лизированным клеткам добавляли различные количества антител к фрагменту Na^+, K^+ -АТФ-азы (200, 100, 50, 25, 10, 5 или 2,5 мкг) и инкубировали 2 ч при 20°C , после чего центрифугировали 30 мин при 100 000g. Осадок промывали 2 раза средой DMEM, содержащей 0,05% твин-20, и ресуспендировали в 200 мкл среды DMEM. Клеточные фрагменты со связавшимися с ними антителами наносили на плашки для иммуноферментного анализа по 50 мкл на лунку и инкубировали 1 ч при 37°C . Лунки промывали 4 раза буфером ТТБС, содержащим 50 мМ трис-НСl (рН 7,5), 150 мМ NaCl и 0,05% твин-20, и после забивки бычьим сывороточным альбумином добавляли конъюгат антикроличьих антител с пероксидазой хрена (Bio-Rad, США) в разведении 1 : 2000. Инкубировали 2 ч при 37°C , промывали 4 раза буфером ТТБС и добавляли субстрат (*o*-фенилендиамин и перекись водорода). Реакцию останавливали 10% серной кислотой. Поглощение измеряли при длине волны 492 нм с помощью прибора Multiscan (Flow Laboratories, Шотландия). Каждый опыт проводили 4 раза. Интактность клеток контролировалась микроскопически. В качестве контролей на внешний и внутренний эпитопы использовались охарактеризованные ранее моноклональные антитела: соответственно VG IV [22] и 4Cl [28].

Для проведения конкурентного иммуноферментного анализа по 5 мкг денатурированной Na^+, K^+ -АТФ-азы (солюбилизированной 5% SDS, а затем осажденной метанолом и растворенной в 0,05% твине-20) иммобилизовали в лунках иммунологического планшета. После забивки бычьим сывороточным альбумином в лунки вносили по 20 мкг антител к фрагменту АТФ-азы, предварительно инкубированных в течение 2 ч при 20°C с различными количествами ($5 \cdot 10^5$, 10^6 , $5 \cdot 10^6$, 10^7 , $5 \cdot 10^7$ или 10^8) интактных клеток РКЕ или полученных в результате их лизиса плазматических мембран или солюбилизированных додецилсульфатом натрия (с последующим осаждением метанолом и перерастворением в 0,05% твине-20) плазматических мембран и затем подвергали иммуноферментному анализу, как описано выше.

Работа выполнялась при финансовой поддержке Международного научного фонда (грант М4N000), Министерства науки (программа «Белковая инженерия») и Российского фонда фундаментальных исследований (грант 93-04-20327).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Модянов Н. Н., Аристархова Е. А., Кочергинская С. А. // Биол. мембраны. 1988. Т. 5. № 4. С. 341—385.
2. Kawakami K., Ohta T., Nojima H., Nagano K. // J. Biochem. 1986. V. 100. P. 389—397.
3. Shull M. M., Pugh D. G., Lingrel J. B. // J. Biol. Chem. 1989. V. 264. P. 17532—17543.
4. Ovchinnikov Y. A., Monastyrskaya G. S., Broude N. E., Ushkaryov Y. A., Melkov A. M., Smirnov Y. V., Malyshev I. V., Allikmets R. L., Kestina M. B., Dulubova I. E., Kijatkin N. I., Grishin A. V., Modjanov N. N., Sverdlov E. D. // FEBS Lett. 1988. Y. 233. P. 87—94.
5. Бродде Н. Е., Монастырская Г. С., Петрухин К. Е., Гришин А. В., Кияткин Н. И., Мелков А. М., Смирнов Ю. В., Свердлов В. Е., Мальшев И. В., Модянов Н. Н. // Биоорган. химия. 1986. Т. 13. С. 14—18.
6. Джанджузян К. Н., Луценко С. В., Модянов Н. Н. // Биол. мембраны. 1986. Т. 3. № 8. С. 858—868.

7. Kirley T., Wang T., Wallick E., Lane L.//Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1985. V. 130. № 2. P. 732—738.
8. Nogushi S., Ohta T., Takeda K., Chesabo M., Kawamura M.//Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1988. V. 155. P. 1237—1243.
9. Овчинников Ю. А., Арсенян С. Г., Броуде Н. Е., Петрухин К. Е., Гришин А. В., Алданова Н. А., Арзамазова Н. М., Аристархова Е. А., Мелков А. М., Смирнов Ю. В., Гурьев С. О., Монастырская Г. С., Модянов Н. Н.//Докл. АН СССР. 1986. Т. 285. С. 1490—1495.
10. Овчинников Ю. А., Броуде Н. Е., Петрухин К. Е., Гришин А. В., Кияткин Н. И., Арзамазова Н. М., Гевондян Н. М., Чертова Е. Н., Мелков А. М., Смирнов Ю. В., Малышев И. В., Монастырская Г. С., Модянов Н. Н.//Докл. АН СССР. 1986. Т. 287. № 6. С. 1490—1495.
11. Nogushi S., Noda M., Takahashi H., Kawakami K., Ohta T., Nagano K., Hirose T., Unayama S., Navasida H., Miyata T., Numa S.//FEBS Lett. 1986. V. 321. P. 429—431.
12. Арзамазова Н. М., Аристархова Е. А., Гевондян Н. М., Гаврильева Е. Е., Азизова Г. И., Чертова Е. Н., Клименко А. С., Модянов Н. Н.//Биол. мембраны. 1987. Т. 4. № 6. С. 590—599.
13. Modyanov N., Lutsenko S., Chertova E., Efremof R., Gulyaev D.//Acta physiol. scand. 1992. V. 146. P. 49—58.
14. Canfield V. A., Levenson R.//Biochemistry. 1993. V. 32. P. 13782—13786.
15. Jorgensen P. L.//Biochim. et biophys. acta. 1975. V. 401. P. 399—415.
16. Jorgensen P. L., Brunner J.//Biochim. et biophys. acta. 1983. V. 735. P. 291—296.
17. Nicholas R. A.//Biochemistry. 1984. V. 23. P. 888—898.
18. Dzhandzhugazyan K. N., Jorgensen P. L.//Biochim. et biophys. acta. 1985. V. 817. P. 165—167.
19. Джанджугазян К. Н., Модянов Н. Н., Овчинников Ю. А.//Биоорганическая химия. 1981. Т. 7. № 12. С. 1790—1800.
20. Jorgensen P. L., Hansen O., Glynn I. M., Caviers J. D.//Biochim. et biophys. acta. 1973. V. 281. № 3. P. 795—800.
21. Kano I., Satoh K., Nagai F., Ushiyama K.//Biochem. Cell. Biol. 1990. V. 68. P. 1262—1267.
22. Arystarkhova E., Gasparian N., Modyanov N. N., Sweadner K. J.//J. Biol. Chem. 1992. V. 267. № 19. P. 13694—13701.
23. Овчинников Ю. А., Лунева Н. М., Аристархова Е. А., Гевондян Н. М., Арзамазова Н. М., Козхич А. Т., Несмеянов В. А., Модянов Н. Н.//FEBS Lett. 1988. V. 227. P. 230—234.
24. Feschenko M. S., Zvaritch E. I., Hofmann F., Shakhparonov M. I., Modyanov N. N., Vorherr T., Carafoli E.//J. Biol. Chem. 1992. V. 267. № 6. P. 4097—4101.
25. Karlsh S. J. D., Goldshleger R., Jorgensen P.//J. Biol. Chem. 1993. V. 268. № 5. P. 3471—3478.
26. Ларин Д. И., Шахпаронов М. И., Ортис Э., Костина М. Б., Модянов Н. Н.//Биол. мембраны. 1994. Т. 11. № 5.
27. Mariani M., Bracci L., Presentini R., Nucci D., Neri P., Antoni G.//Mol. Immunol. 1987. V. 24. P. 297—303.
28. Ларин Д. И., Шахпаронов М. И., Ортис Э., Костина М. Б., Модянов Н. Н.//Биол. мембраны. 1994. Т. 11. № 6.
29. Burns E. L., Price E. M.//J. Biol. Chem. 1993. V. 268. № 34. P. 25632—25635.
30. Jewellmotz E. A., Lingrel J. B.//Biochemistry. 1993. V. 32. № 49. P. 13523—13530.
31. Shani-Sekler M., Goldshleger R., Tal D. M., Karlsh S. J. D.//J. Biol. Chem. 1988. V. 263. № 36. P. 19331—19341.
32. Arguello J. M., Kaplan J. H.//J. Biol. Chem. 1991. V. 266. № 22. P. 14627—14635.
33. Capasso J. M., Hoing S., Tal D. M., Goldshleger R., Karlsh S. J. D.//J. Biol. Chem. 1993. V. 268. № 2. P. 1150—1158.
34. Walter G., Scheidtmann K. H., Carbone A.//Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1980. V. 77. P. 5197—5200.
35. March S. C., Parikh I., Cuatrecasas P.//Anal. Biochem. 1974. V. 60. P. 149—152.
36. Laemmly U. K.//Nature. 1970. V. 227. P. 680—685.
37. Феценко М. С., Зварич Е. И., Шахпаронов М. И., Модянов Н. Н.//Биол. мембраны. 1991. Т. 8. № 12. С. 1237—1247.
38. Jorgensen P. L.//Biochim. et biophys. acta. 1974. V. 356. P. 53—67.
39. Джанджугазян К. Н., Модянов Н. Н., Овчинников Ю. А.//Биоорганическая химия. 1981. Т. 7. № 6. С. 847—857.

Поступила в редакцию
17.III.1994

D. I. Larin, M. I. Shakhaparonov, M. B. Kostina, N. N. Modyanov

A STUDY ON TRANSMEMBRANE ORGANISATION OF THE C-TERMINAL DOMAIN OF THE Na⁺,K⁺-ATPase WITH POLYCLONAL ANTIBODIES TO THE CLOSE-TO-THE-MEMBRANE FRAGMENTS EXPRESSED IN *E. coli*

M. M. Shemyakin and Yu. A. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow

Key words: Na⁺,K⁺-ATPase; antibodies; fusion proteins.

The fragments 825—842, 868—886, 928—945, 946—967, 962—978 of the α -subunit of the porcine Na⁺,K⁺-ATPase were expressed in *E. coli* as fusion proteins with human tumour necrosis factor. Polyclonal antibodies were obtained to these fragments. The location of the chosen fragments according to the plasma membrane was determined with the polyclonal antibodies by ELISA on intact, lysed or solubilized pig kidney embryo cells. The fragments 825—842, 928—945, and 962—978 contained intracellular epitopes and did not contain extracellular ones; the fragments 868—886 and 946—967 did not contain any exposed epitopes.