

УДК 577.1

© 1993 г. М. П. ПАНЧЕНКО, М. Г. СТАРИКОВА, А. В. ГРИШИН,  
Е. В. НЮПЕНКО, Н. В. КАБАЕВА, Ю. А. РОМАНОВ, А. С. АНТОНОВ,  
В. А. ТКАЧУК

### СИГНАЛ-ПРОВОДЯЩИЕ И НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫЕ GTP-СВЯЗЫВАЮЩИЕ БЕЛКИ ЛЕГКИХ И ЭНДОТЕЛИЯ: ЛОКАЛИЗАЦИЯ В МЕМБРАНАХ И ЦИТОЗОЛЕ, ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ с F-АКТИНОМ

*Ключевые слова:* сигнал-проводящие и низкомолекулярные GTP-связывающие белки, F-актин, легкие, эндотелий.

В легких и эндотелии млекопитающих с использованием [<sup>32</sup>P]ADP-рибозилирования бактериальными ADP-рибозилтрансферазами, иммуно- и [<sup>α-32</sup>P]GTP-блоттингов были идентифицированы 41-(G<sub>i</sub>1α), 40-(G<sub>i</sub>2α), 41-(G<sub>i</sub>3α), 40- и 45 кДа-формы G<sub>s</sub>α, 36 кДа β<sub>1</sub>- и 35 кДа β<sub>2</sub>-субъединицы сигнал-проводящих GTP-связывающих белков (G-белков), а также 19—26 кДа низкомолекулярные GTP-связывающие белки (SMG-белки): gas, rho, gac, G<sub>25</sub>K (G<sub>p</sub>), ARF-белки и SMG-белки, связывающие с высоким сродством [<sup>α-32</sup>P]GTP. Данные G- и SMG-белки содержатся в разных соотношениях в мембранной и цитозольной фракциях исследуемой ткани (клеток). Выявлено, что G<sub>i</sub>2α- и G<sub>s</sub>α-субъединицы (но не β<sub>1</sub>-субъединица и SMG-белки) могут частично (~1%) высвобождаются из мембран в раствор под действием аналогов GTP (GTPγS или Gpp(NH)p) в присутствии ионов магния. Показано, что при экстракции буферным раствором низкой ионной силы в присутствии ЭДТА из мембран высвобождаются чувствительная к коклюшному токсину G<sub>i</sub>2α- и β<sub>1</sub>-субъединицы. Установлено, что содержащиеся в цитозоле функционально сопряженные в αβγ-гетеротример субъединицы G<sub>i</sub>-белков (преимущественно G<sub>i</sub>2α- и β<sub>1</sub>-субъединицы), а также SMG-белки, выявляемые [<sup>α-32</sup>P]GTP-блоттингом, но не SMG-белки, чувствительные к ботулиническому C<sub>3</sub>-экзоферменту (rho/gac) или ARF, могут взаимодействовать с F-актином. Около 20% этих белков выявляется и в тритон X-100-нерастворимой (цитоскелетной) фракции эндотелия. Сделано предположение, что одной из причин, приводящих к формированию «полидисперсных» структур G- и SMG-белков в клетке, может быть их взаимодействие с актиновыми филаментами.

Сигнал-проводящие GTP-связывающие белки (G-белки), участвующие в трансмембранном проведении внешнего гормонального сигнала от рецепторов к эффекторным системам клетки — аденилатциклазе, фосфолипазам C и A<sub>2</sub>, ионным каналам и т.д. — представляют собой обширное семейство гетеротримерных белков, состоящих из 39—50 кДа α-, 35—36 кДа β- и 6—10 кДа γ-субъединиц [1—3]. Локализация в плазматической мембране гидрофильной GTP-связывающей α-субъединицы может определяться ее взаимодействием с мембраносвязанным β/γ-комплексом [4]. Это взаимодействие в свою очередь зависит от миристилолирования N-концевого остатка Gly α-субъединицы [5—7]. Мембранное расположение β/γ-комплекса определяется посттрансляционным процессингом γ-субъединицы, включающим метилирование и присоединение C<sub>20</sub> геранил-геранильного изопреноидного «хвоста» соответственно к карбоксильной и тиоловой группам C-терминального остатка Cys [8—10].

Приняты сокращения: ХТ — холерный токсин, КТ — коклюшный токсин, БС<sub>3</sub> — ботулинический C<sub>3</sub>-экзофермент, SMG-белки — низкомолекулярные GTP-связывающие белки, АНП — атрионарийуретический пептид, ФМСФ — фенилметилсульфонилфторид.

Активация G-белка под действием гормон-рецепторного комплекса в цитозольной клетке [11] и активация G-белка в изолированных препаратах мембран под действием GTP и холерного токсина [15], а также негидролизуемых аналогов GTP: GTPγS или Gpp(NH)p [12—14] или ограниченный протеолиз α-субъединицы по N-концу [16] могут приводить к частичному высвобождению α-субъединицы («программированного мессенджера» [17]) из плазматической мембраны. α-Субъединицы помимо плазмалеммы были выявлены во внутриклеточных компартментах клетки: эндоплазматическом ретикулеуме [18], секреторных гранулах [19], а также в цитозоле [13, 19—23].

В клетках эукариот экспрессируется более 30 представителей семейств низкомолекулярных GTP-связывающих белков с молекулярной массой 20—30 кДа, так называемые SMG-белки [24]. SMG-белки вовлечены в обеспечение таких важных клеточных процессов, как рост, дифференцировка, организация цитоскелета, везикулярный транспорт и секреция [24, 25]. При злокачественной трансформации клеток некоторые SMG-белки экспрессируются в онкогенных формах, отличающихся от обычных [26]. Для встраивания в мембрану многие SMG-белки проходят посттрансляционный процессинг, заключающийся в полизопренилировании тиоловой [27—31] и метилировании [31—33] карбоксильной групп C-терминального остатка Cys, а также в пальмитировании другого (181 или 184) остатка Cys [27, 34]. Установлено, что некоторые SMG-белки фосфорилируются различными протеинкиназами [35—39] и при этом высвобождаются из плазмалеммы [36, 40].

Функциональное сопряжение G- и SMG-белков с рецептор-эффекторными системами клетки меняется при перестройках клеточного цитоскелета: микротрубочек тубулина, актиновых микрофиламентов. В свою очередь сборка филаментов и микротрубочек регулируется G- и SMG-белками [41—48]. Некоторые G-белки непосредственно взаимодействуют с тубулином [45, 49—51], цитоскелетными белками [52].

В настоящем исследовании мы провели идентификацию ряда гетеротримерных и SMG-белков, содержащихся в легочной ткани и культивируемых эндотелиальных клетках сосудов, и проанализировали их распределение между мембранной и цитозольной фракциями. Показано, что G<sub>i</sub> и некоторые SMG-белки, находящиеся в цитозольной фракции, способны к ассоциации с актиновыми филаментами.

### МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Выделение и хранение плазматических мембран и цитозоля из легких свиньи проводили как описано ранее [53]. Первичные культуры эндотелиальных клеток из аорты человека получали как описано ранее [54]. Клетки культивировали до состояния конфлюэнтного монослоя на чашках Петри (d = 10 см), предварительно покрытых 0,2%-ным желатином. Монослой клеток (после 7—9 дней культивирования) промывали сбалансированным солевым раствором Эрла, снимали 0,05%-ным трипсином с добавлением 0,02%-ного ЭДТА и пассировали в соотношении 1 : 3. В опытах использовали эндотелий 3 пассажа. Для получения суммарной мембранной фракции и цитозоля из эндотелия клетки с пяти чашек Петри промывали средой 199, а затем холодным буфером, содержащим 10 мМ трис-HCl, pH 7,5, и 150 мМ NaCl. Клетки снимали механически и пересаживали центрифугированием при 600 г в течение 10 мин в 10 мл того же буфера. Осадок гомогенизировали при 4° стеклянным гомогенизатором в 1 мл буфера, содержащего 20 мМ трис-HCl, pH 8,0, 1 мМ ЭДТА, 100 мкМ фенилметилсульфонилфторид (ФМСФ) и 5 мкг/мл лейпептина, и ультрацентрифугировали при 50 000 об/мин в течение 60 мин в роторе Ti-65 («Beckman», США) при 4°. Прозрачный супернатант (цитозоль) осторожно отбирали, а осадок мембран суспендировали до концентрации белка 1—2 мг/мл в буфере гомогенизации. Фракции цитозоля и мембран замораживали в жидком азоте и хранили при -70°.

Экстракция плазматических мембран легких. Плазматические мембраны суспендировали до конечной концентрации белка 1 мг/мл в 250 мкл буфера А, содержащего 10 мМ HEPES-Na, pH 7,5, 1 мМ ЭДТА, 1 мМ дитиотреитол, 100 мкМ ФМСФ, 5 мкг/мл лейпептина, в отсутствие или в присутствии 5 мМ MgCl<sub>2</sub> или в 250 мкл буфера А, дополнительно содержащего 5 мМ MgCl<sub>2</sub>, в отсутствие или в присутствии 100 мкМ GDP, GDPβS, GTP, GTPγS или Gpp(NH)p и инкубировали в течение 60 мин при 37°. Затем пробы ультрацентрифугировали в роторе LP-42Ti («Beckman») при 35 000 об/мин в течение 60 мин при 4°.

Супернатанты осторожно отбирали (200 мкл), а осадки суспандировали в 150 мкл буфера, содержащего 10 мМ HEPES-Na, pH 7,5, 1 мМ ЭДТА. В экспериментальную пробу брали 150 мкл супернатанта или 25 мкл мембранной суспензии.

F-Актинзависимое гелеобразование в цитозольной фракции проводили по методу [55]. Свежевыделенный цитозоль легких или эндотелиальных клеток подвергали в течение 18 ч диализу при 4° против буфера, содержащего 5 мМ трис-HCl, pH 8,0, 1 мМ ЭДТА, 1 мМ дитиотреитол, 100 мкМ ФМСФ и 5 мкг/мл лейпептина, а затем — ультрацентрифугированию в роторе Ti-65 при 50 000 об/мин в течение 60 мин при 4°. К алликутам полученного цитозоля (1 мл) добавляли 25 мкл следующих растворов: 40 мМ CaCl<sub>2</sub>, 200 мМ MgCl<sub>2</sub>, 20 мМ АТР и 4 мМ KCl, или их комбинаций до конечных концентраций соответственно 1, 5, 0,5 и 100 мМ. Пробу инкубировали при 37° в течение 60 мин, а затем ультрацентрифугировали в роторе Ti-65 при 50 000 об/мин в течение 60 мин при 4°. Супернатанты осторожно собирали, а осадки, содержащие F-актин, быстро ополаскивали холодным буфером (5 мМ трис-HCl, pH 8,0, 1 мМ ЭДТА) и суспандировали в 150 мкл того же буфера.

Экстракция эндотелиальных клеток тритоном X-100 проводили по методу [56].

[<sup>32</sup>P]ADP-рибозилирование мембранных и цитозольных белков проводили, как описано ранее [21], с небольшими модификациями. 3,5—35 мкг мембранного белка или 30—80 мкг белка цитозоля инкубировали при 37° в течение 60 мин в 100 мкл среды, содержащей 50 мМ трис-HCl, pH 7,5, 1 мМ ЭДТА, 2 мМ MgCl<sub>2</sub>, 10 мМ дитиотреитол, 10 мМ тимидин, 10 мМ NAD, 1 мМ NADP, 1 мМ АТР, 2 мкКи [<sup>32</sup>P]NAD, в отсутствие или в присутствии холерного токсина (50 мкг/мл), коклюшного токсина (КТ) (20 мкг/мл) или ботулинического С<sub>3</sub>-экзофермента (БС<sub>3</sub>) (5 мкг/мл). При использовании КТ и БС<sub>3</sub> среда ADP-рибозилирования дополнительно содержала 0,1%-ный луброл РХ. Реакцию останавливали добавлением 33 мкл 4-кратного буфера для образцов [57]. Пробу инкубировали в течение 5 мин и подвергали электрофорезу в присутствии DS-Na в 12%-ном ПААГ [57]. После фиксации, окрашивания куамси G-250 и высушивания гели автордиографировали с использованием рентгеновской пленки отечественного производства («Тасма») в течение 16—20 ч в кассете с усиливающим экраном при -70°.

Для проведения иммуно- или [<sup>32</sup>P]GTP-блоттингов содержащиеся в мембранах или цитозоле белки после разделения электрофорезом в ПААГ в присутствии DS-Na переносили на нитроцеллюлозу («Schleicher & Schuell», ФРГ), как описано в [58], при 300 мА в течение 14 ч. Нитроцеллюлозный фильтр с перенесенными белками визуализировали с красителем Ропсау-S, разрежали на полоски, которые затем выдерживали при комнатной температуре в течение 2 ч в растворе А, содержащем 50 мМ трис-HCl, pH 7,5, 150 мМ NaCl, 5%-ный бычий сывороточный альбумин и 0,2%-ный Nonidet P-40 (для [<sup>32</sup>P]GTP-блоттинга Nonidet P-40 заменялся на 0,05%-ный твин-20), а затем промывали 3 раза по 10 мин буфером, содержащим 50 мМ трис-HCl, pH 7,5, 150 мМ NaCl и 0,05%-ный твин-20 (для [<sup>32</sup>P]GTP-блоттинга использовали буфер В, содержащий 50 мМ трис-HCl, pH 7,5, 0,3%-ный твин-20, 6 мМ MgCl<sub>2</sub> и 1 мМ ЭДТА). В случае иммуноблоттинга полоски нитроцеллюлозы инкубировались в течение 2 ч при комнатной температуре в буфере А, содержащем первые антитела в следующих разведениях: антисыворотка 584 (1 : 500), анти-(G<sub>1</sub>α) антисыворотка (1 : 10), антисыворотка А-54 (1 : 500), антисыворотка А-56 (1 : 500), антисыворотка А-10 (1 : 200), антисыворотка А-9 (1 : 1000), антисыворотка AS-7 (1 : 1000), антисыворотка MS-1 (1 : 1000), антисыворотка U-49 (1 : 5000), антисыворотка GC-2 (1 : 200), анти-(G<sub>25</sub>K) антисыворотка (1 : 500), анти-(ras<sub>common</sub>) антисыворотка (1 : 200), анти-(ARF) антисыворотка (1 : 400), анти-(sec-4) антисыворотка (1 : 200), анти-(ras<sub>common</sub>) моноклональные антитела (1 : 1000) или анти-(β-тубулин) моноклональные антитела (1 : 200). Белковые полосы, меченные первыми антителами, выявляли, используя меченные [<sup>125</sup>I] или конъюгированные с пероксидазой анти-IgG кролика или мыши с последующей 24-часовой автордиографией в кассете без усиливающего экрана или окраской с 4-хлор-1-нафтолом в присутствии перекиси водорода. В случае [<sup>32</sup>P]GTP-блоттинга полоски нитроцеллюлозы инкубировались 1 ч при комнатной температуре в буфере В, содержащем 2 мкКи/мл [<sup>32</sup>P]GTP, отмывались 3 раза по 20 мин буфером В. Белковые полосы, связавшие метку, визуализировались 8—12 ч автордиографией в кассете без усиливающего экрана.

Белок определяли методом Петерсона [59], используя в качестве стандарта бычий сывороточный альбумин.

Работу проводили на коммерческих реактивах, использовавшихся в предыдущих исследованиях [21, 60]. Коклюшный токсин любезно предоставлен В. О. Рыбиным (Кардиологический научный центр РАМН, Москва); ботулинический С<sub>3</sub>-экзофермент — А. И. Ефименко (Институт эпидемиологии и микробиологии РАМН, Москва); антисыворотки А-9, А-10, А-54, А-56, GC-2 и 584 — J. D. Robishaw (Weiss Center, Geisinger Clinic, Danville, PA); антисыворотка U-49 — S. M. Mumby и A. G. Gilman (Department of Pharmacology, Southwestern Graduate School, University of Texas Health Science Center, Dallas, TX); антисыворотка анти-(G<sub>1</sub>α) — J. M. Stadel (Department of Molecular Pharmacology, Smith Kline and French Laboratories, Philadelphia, PA); анти-(ARF) антисыворотка — D. M. Gill (Tufts University, Boston, Mass.); анти-(G<sub>25</sub>K) и анти-(ras<sub>common</sub>) антисыворотки — P. Polakis

(Department of Molecular Biology, Cetus Corporation, Emeryville, CA) и T. Evans (Department of Developmental Biology, Genentech, Inc., South San Francisco, CA); анти-(Sec-4) антисыворотка — P. Novick (Department of Cell Biology, Yale University School of Medicine, New Haven, CT). Антисыворотки MS-1 и AS-7 и мышиный моноклон анти-ras<sub>common</sub> (pan-11) были получены от E. I. Du Pont de Nemours & Co., NEN Products, Boston, Mass., а мышиный моноклон анти-(β-tubulin) (Tub 2.1) — ICN Immuno Biologicals.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Одной из особенностей α-субъединиц G-белков — G<sub>s</sub>, G<sub>i1</sub>, G<sub>i2</sub>, G<sub>i3</sub>, G<sub>o</sub>, G<sub>1r</sub>, G<sub>1c</sub> и некоторых SMG-белков — rho, ras, H-ras, ARF является их способность подвергаться высокоселективному NAD-зависимому моно-ADP-рибозилированию бактериальными ADP-рибозилтрансферазами [61—64]. Мы воспользовались тремя доступными препаратами бактериальных ADP-рибозилтрансфераз: холерным токсином (ХТ), коклюшным токсином (КТ) и ботулиническим С<sub>3</sub>-экзоферментом (БС<sub>3</sub>) для выявления G- и SMG-белков в препаратах плазматических мембран и цитозоля.

В плазматических мембранах и цитозоле легких свиньи ХТ ADP-рибозилирует 42 (мажорную) и 45 (минорную) кДа-формы α-субъединицы G<sub>s</sub>-белка. В цитозоле дополнительно выявляются белки с молекулярной массой 55—57 кДа. ХТ-Зависимое ADP-рибозилирование белков в мембранах зависит от присутствия GTP или его аналогов — Gpp(NH)p или GTPγS и практически не наблюдается в отсутствие гуаниловых нуклеотидов, а также в присутствии GDP или GDPβS. Аналогичная картина наблюдается и в цитозоле (рис. 1, А).

В плазматических мембранах и цитозоле легких КТ вызывает ADP-рибозилирование ~ 40 кДа α-субъединиц G<sub>i</sub>-белков. КТ-Зависимое ADP-рибозилирование происходит в отсутствие экзогенного гуанилового нуклеотида, однако эта реакция усиливается в присутствии GDPβS и ослабляется в присутствии GTPγS (рис. 1, Б).

В этих же мембранах и цитозоле БС<sub>3</sub> ADP-рибозилирует 24 кДа (мажорный) и 26 кДа (минорный) SMG-белки (рис. 1, В). БС<sub>3</sub>-Зависимое ADP-рибозилирование белков цитозоля и мембран существенно не изменяется в присутствии экзогенных гуаниловых нуклеотидов: GDPβS и GTPγS (данные не приведены).

Удельное содержание ХТ-, КТ- и БС<sub>3</sub>-чувствительных белков (соответственно 42—45, ~40 и 24—26 кДа белков) составляет: в плазматических мембранах легких — 2, 30 и 15 пмоль на 1 мг белка мембран, в цитозоле — 0,2, 1 и 15 пмоль на 1 мг белка цитозоля. Около 90% общего количества ХТ- и КТ-чувствительных α-субъединиц G<sub>s</sub>- и G<sub>i</sub>-белков, содержащихся в гомогенате легочной ткани, приходится на суммарную мембранную фракцию (осадок 200 000 г, полученный из гомогената легких), а 7—10% этих белков содержится в цитозоле (супернатант 200 000 г). На цитозоль и суммарную мембранную фракцию приходится соответственно 60 и 40% от общего количества БС<sub>3</sub>-чувствительных 24—26 кДа белков, содержащихся в гомогенате легких (данные не приведены).

Некоторые SMG-белки сохраняют способность связывать GTP после электрофореза в ПААГ в присутствии DS-Na и переноса их на нитроцеллюлозу [65, 66]. В цитозоле и плазматических мембранах легких свиньи [<sup>32</sup>P]GTP-блоттингом выявляется 5—6 белковых полос с молекулярными массами 19—26 кДа. Мажорной GTP-связывающей полосой в плазматических мембранах является 26 кДа белок (белки). В цитозоле максимальную GTP-связывающую активность проявляют 26, 25 и 19 кДа белки (рис. 1, Г).

Методом иммуноблоттинга с использованием различных антисывороток в плазматических мембранах и цитозоле легких свиньи выявляются следующие белки: анти-G<sub>s</sub>α антисыворотка (584) выявляет 42 кДа (мажорный) и 45 кДа (минорный) белки; анти-G<sub>i1</sub>α антисыворотка — 41 кДа белок; анти-G<sub>i2</sub>α анти-

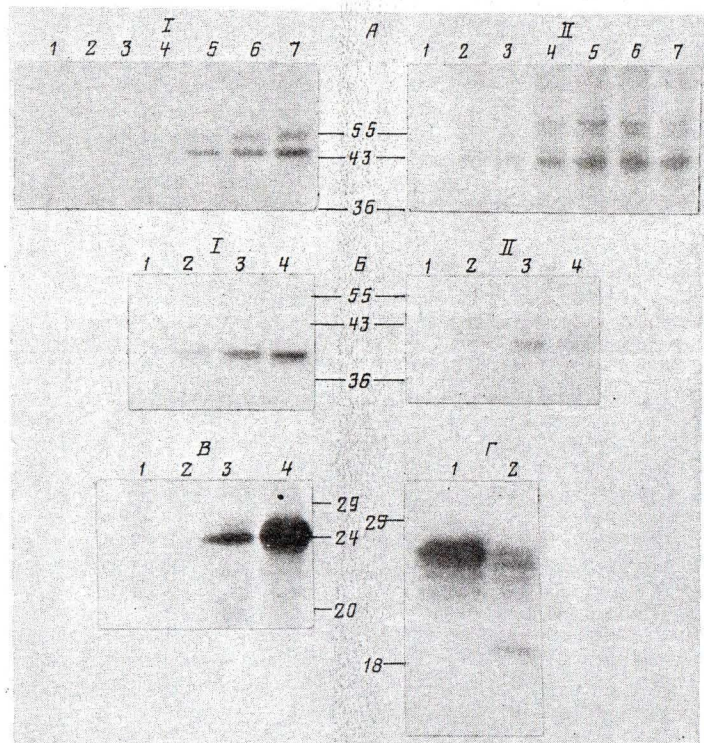


Рис. 1.  $[^{32}\text{P}]$ ADP-рибозилирование бактериальными токсинами и  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ GTP-блоттинг белков плазматических мембран и цитозоля легких свиньи. А — ADP-рибозилирование холерным токсином. Количество белка мембран (I) и цитозоля (II) в среде ADP-рибозилирования, не содержащей (1) или содержащей (2-7) 50 мкг/мл ХТ, составляло соответственно 35 и 80 мкг. Среда ADP-рибозилирования дополнительно содержала 100 мкМ гуанилового нуклеотида — GDP $\beta$ S (3), GDP (4), GTP (5), Gpp(NH)p (6), GTP $\gamma$ S (7). Б — ADP-рибозилирование коклюшным токсином. Количество белка мембран (I) и цитозоля (II) в среде ADP-рибозилирования, не содержащей (1) или содержащей (2-4) 20 мкг/мл КТ, составляло соответственно 3,5 и 50 мкг. ADP-рибозилирование проводили в отсутствие (3) и в присутствии 100 мкМ GTP $\gamma$ S (2) или GDP $\beta$ S (4). В — ADP-рибозилирование ботулиническим С<sub>3</sub>-экзоферментом. Количество белка мембран (1,3) и цитозоля (2,4) в среде ADP-рибозилирования, не содержащей (1,2) или содержащей (3,4) 5 мкг/мл БС<sub>3</sub>, составляло соответственно 5 и 30 мкг. Г —  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ GTP-блоттинг. Количество белка мембран (1) и цитозоля (2) составляло соответственно 50 и 200 мкг (Линиями указаны подвижности белков-стандартов)

сыворотка (А-54) — 40 кДа белок; анти-G<sub>3</sub> $\alpha$  антисыворотка (А-56) — 41 кДа белок; анти-G $\beta$ <sub>1</sub> антисыворотка (U-49) — 36 кДа белок; анти-G $\beta$ <sub>2</sub> антисыворотка (GC-2) — 35 кДа белок; анти-G<sub>25</sub>K (G<sub>p</sub>) антисыворотка — 25 кДа белок; анти-ARF антисыворотка — 19 кДа белок; анти-gas<sub>common</sub> антисыворотка — 21 кДа белок. Анти-gas<sub>common</sub> моноклональные антитела (рап-11) в мембранах и цитозоле легких взаимодействуют с 21 кДа белком. Ни мембраны, ни цитозоль легких не содержат выявляемых количеств 39 кДа  $\alpha$ -субъединицы G<sub>0</sub>-белка, а также SMG-белка — sec-4. В отличие от 36 кДа  $\beta$ <sub>1</sub>-субъединицы 35 кДа  $\beta$ <sub>2</sub>-субъединица G-белков выявляется только в мембранной фракции легких (рис. 2).

В мембранной и цитозольной фракциях эндотелиальных клеток КТ и БС<sub>3</sub> ADP-рибозилируют соответственно 40 кДа  $\alpha$ -субъединицы G<sub>i</sub>-белков и 24—

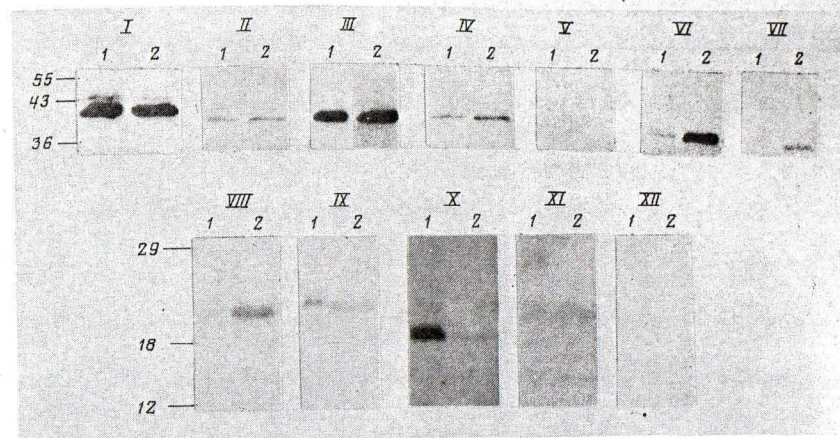


Рис. 2. Иммуноблоттинг содержащихся в плазматической мембране и цитозоле легких свиньи  $\alpha$ - и  $\beta$ <sub>1</sub>-субъединиц G-белков и SMG-белков. Количество белка цитозоля (1) и мембран (2), использованное в эксперименте, составляло соответственно 200 и 50 (I), 100 и 5 (II-V), 100 и 20 (VI, VII), 200 и 50 (VIII-XII) мкг. Полоски нитроцеллюлозы обрабатывали соответственно I — анти-G<sub>3</sub> $\alpha$  антисывороткой (584); II — анти-G<sub>i</sub>1 $\alpha$  антисывороткой; III — анти-G<sub>i</sub>2 $\alpha$  антисывороткой (А-54); IV — анти-G<sub>3</sub> $\alpha$  антисывороткой (А-56); V — анти-G<sub>0</sub> $\alpha$  антисывороткой (А-10); VI — анти-G $\beta$ <sub>1</sub> антисывороткой (U-49); VII — анти-G $\beta$ <sub>2</sub> антисывороткой (GC-2); VIII — анти-gas<sub>common</sub> моноклональными антителами (рап-11); IX — анти-G<sub>25</sub>K (G<sub>p</sub>) антисывороткой; X — анти-ARF антисывороткой; XI — анти-gas<sub>common</sub> антисывороткой; XII — анти-sec4 антисывороткой и вторыми мечеными  $[^{125}\text{I}]$  антителами

26 кДа SMG-белки (рис. 3, А).  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ GTP-блоттингом в этих фракциях выявляются 23—26 кДа SMG-белки (рис. 3, Б). Иммуноблоттингом с анти-G<sub>i</sub>2 $\alpha$  (А-54) и анти-G<sub>3</sub> $\alpha$  (А-56) антисыворотками в мембранах эндотелия выявляется мажорная 40 кДа  $\alpha$ <sub>2</sub>-субъединица и минорная 41 кДа  $\alpha$ <sub>3</sub>-субъединица. Анти-G $\beta$ <sub>1</sub> (U-49) антисыворотка идентифицирует в этой фракции мажорную 36 кДа  $\beta$ <sub>1</sub>-субъединицу, а анти-G $\beta$ <sub>2</sub> (GC-2) антисыворотка — минорную 35 кДа  $\beta$ <sub>2</sub>-субъединицу. Анти-G<sub>3</sub> $\alpha$  (584) антисыворотка выявляет в мембранной фракции 42—45 кДа-формы  $\alpha$ -субъединиц G<sub>s</sub>-белка. Иммуноблоттингом в мембранах эндотелия также выявляется 21 кДа gas-белки и 24—25 кДа дублет G<sub>25</sub>K (G<sub>p</sub>) белков (рис. 3, В).

Нами было исследовано влияние некоторых агонистов на содержание G- и SMG-белков в мембранах эндотелиальных клеток. Изопротеренол —  $\beta$ -адренергический агонист, повышающий в эндотелии уровень сАМР и соответственно изменяющий свойства белков, фосфорилируемых киназой А. Гистамин — гормон, активирующий в эндотелии аденилатциклазу и фосфолипазу С и соответственно изменяющий свойства белков, фосфорилируемых киназами А и/или С. Атрионарийуретический пептид (АНП) — гормон, стимулирующий в эндотелии АНП-чувствительную гуанилатциклазу и внутриклеточный уровень сGMP и изменяющий свойства белков, фосфорилируемых киназой G. Разная по длительности (от 10 до 180 мин) инкубация клеток с этими агентами не приводила к сколько-нибудь заметному изменению содержания  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединиц G<sub>s</sub>-, G<sub>i</sub>2- и G<sub>i</sub>3-белков, а также SMG-белков в мембранах эндотелиальных клеток (рис. 4).

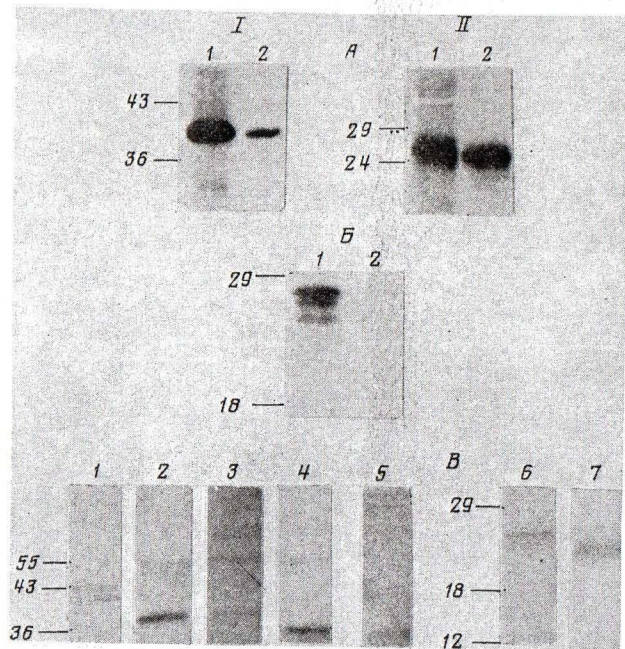


Рис. 3. Идентификация G- и SMG-белков в мембранах и цитозоле эндотелиальных клеток аорты человека. А —  $[^{32}\text{P}]$ ADP-рибозилирование под действием КТ и БС<sub>3</sub>. Количество белка мембран (1) и цитозоля (2) в среде ADP-рибозилирования, содержащей 100 мкМ GTP, 20 мкг/мл КТ (I) или 5 мкг/мл БС<sub>3</sub> (II), составляло соответственно 5 и 35 мкг. Б —  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ GTP-блоттинг мембранных и цитозольных белков. Количество белка мембран (1) и цитозоля (2), использовавшегося в эксперименте, составляло 30 мкг. В — Иммуноблоттинг мембранных белков с анти-G<sub>2</sub>α, анти-G<sub>1</sub>α, анти-Gβ и анти-SMG антисыворотками. Количество белка мембран, использовавшегося в эксперименте, составляло 50 мкг. Полоски нитроцеллюлозы обрабатывали: 1 — анти-G<sub>2</sub>α (584); 2 — анти-G<sub>1</sub>2α (A-54); 3 — анти-G<sub>1</sub>3α (A-56); 4 — анти-Gβ<sub>1</sub> (U-49); 5 — анти-Gβ<sub>2</sub> (GC-2); 6 — анти-G<sub>25</sub>K (G<sub>p</sub>) антисыворотками, а 7 — анти-gas<sub>common</sub> (pan-11) моноклональными антителами, а затем вторыми мечеными  $[^{125}\text{I}]$  антителами

Экстракция (60 мин) плазматических мембран легких свиньи в буферном растворе низкой ионной силы, содержащем 1 мМ ЭДТА, вызывает частичное (~5%) высвобождение 43 кДа актина, G<sub>1</sub>α- и Gβ-субъединиц, но не 57 кДа β-тубулина. Присутствие 5 мМ MgCl<sub>2</sub> в среде экстракции препятствует высвобождению этих белков из мембран (рис. 5). Однако внесение в среду экстракции, содержащую 5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 100 мкМ Gpp(NH)p или GTPγS (но не GDP, GDPβS или GTP), приводит к частичному (~1%) высвобождению из мембран G<sub>1</sub>α-субъединиц (рис. 6). При этом 36 кДа β<sub>1</sub>-субъединица (рис. 6) и SMG-белки, чувствительные к БС<sub>3</sub> или выявляемые  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ GTP-блоттингом (данные не приведены), из мембран не высвобождаются.

Добавление к легочному цитозолу 2 мМ CaCl<sub>2</sub>, 5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 100 мМ KCl, 0,5 мМ АТР или их комбинация приводит к полимеризации G-актина и образованию F-актина, легко осаждающегося при ультрацентрифугировании в виде плотного прозрачного осадка. Анализ белкового состава цитозоля, осадка F-актина и супернатанта, полученного после осаждения F-актина, показывает, что с F-актином избирательно сосаждаются некоторые мажорные белки

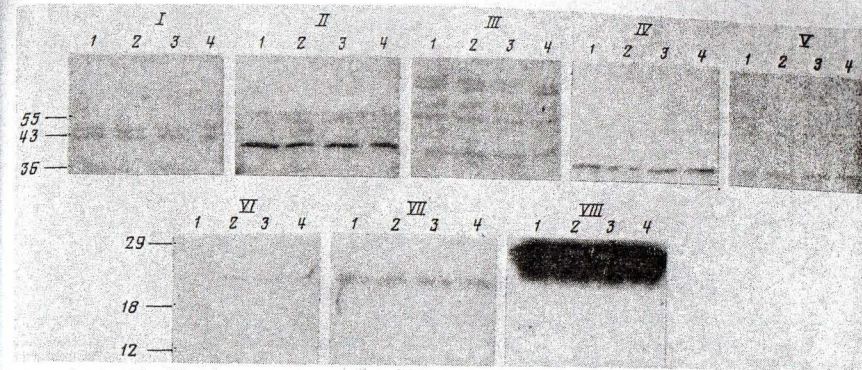


Рис. 4. Содержание α- и β-субъединиц G<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>- и SMG-белков в мембранах эндотелия аорты человека, выделенных из контрольных и обработанных изопроterenолом, гистамином или АНП клеток. Конфлюэнтный монослой эндотелия (восемь чашек Петри с диаметром 10 см, ~7 млн. клеток в каждой) выдерживали в течение 60 мин при 37° в 2 мл бессывороточной среды без добавок (1) и в присутствии 10 мкМ изопроterenола (2), 10 мкМ гистамина (3) или 1 мкМ АНП (4). Среда быстро удаляли, клетки промывали средой 199, добавляли 2 мл холодного буфера, содержащего 5 мМ трис-HCl, рН 8,0, 1 мМ ЭДТА, 100 мкМ ФМСФ и 5 мкг/мл лейпептина. Клетки лизировали замораживанием-размораживанием в жидком азоте. Мембраны выделяли как описано в разделе «Методы исследования». Иммуноблоттинг с: I — анти-G<sub>2</sub>α (584); II — анти-G<sub>1</sub>2α (A-54); III — анти-G<sub>1</sub>3α (A-56); IV — анти-Gβ<sub>1</sub> (U-49); V — анти-Gβ<sub>2</sub> (GC-2); VI — анти-G<sub>25</sub>K (G<sub>p</sub>) антисыворотками; VII — анти-gas<sub>common</sub> (pan-11) моноклональными антителами, а затем вторыми мечеными  $[^{125}\text{I}]$  антителами (I—VII); VIII —  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ GTP-блоттинг. Количество белка мембранных фракций, использовавшихся в эксперименте, составляло 50 мкг

цитозоля: > 200 кДа белок (миозин), 55 кДа белок (виментин). В то же время другие мажорные белки цитозоля, например 67 кДа белок (сывороточный альбумин) или белки с молекулярной массой менее 14 кДа, остаются в супернатанте (рис. 7, А). Цитозольные ~40 кДа α-субъединицы G<sub>1</sub>-белков эффективно сосаждаются с F-актином. Так, при индукции полимеризации цитозольного G-актина под действием MgCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub>+KCl, MgCl<sub>2</sub>+KCl+АТР или KCl+АТР 80% КТ-чувствительных ~40 кДа белков выявлялось в осадке F-актина (рис. 7, Б). Количественное сосаждение (80%) с F-актином было характерно и для цитозольной 36 кДа β<sub>2</sub>-субъединицы (рис. 7, Г), а также и для SMG-белков, связывающих  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ GTP на нитроцеллюлозе (рис. 7, В). Папротив, 24—26 кДа БС<sub>3</sub>-чувствительные белки цитозоля плохо взаимодействуют с F-актином (рис. 7, Б). Инкубация легочного цитозоля в отсутствие индукторов полимеризации G-актина и последующее ультрацентрифугирование не приводило к осаждению актина, КТ- или БС<sub>3</sub>-чувствительных белков, β<sub>1</sub>-субъединицы или SMG-белков, связывающих  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ GTP на нитроцеллюлозе (рис. 7).

Добавление в среду полимеризации гуаниловых нуклеотидов: GDP, GDPβS, GTP, GTPγS или Gpp(NH)p (в концентрациях до 100 мкМ) не изменяло характера перераспределения G- и SMG-белков между супернатантом и осадком, содержащим F-актин (данные не приведены).

Добавление индукторов полимеризации G-актина — KCl+MgCl<sub>2</sub> — к цитозолу, полученному из эндотелиальных клеток, также вызывает практически полный переход G-актина в F-актин, осаждающийся при ультрацентрифугировании (рис. 8, А). С F-актином сосаждаются такие мажорные белки, как > 200 кДа миозин, 55 кДа виментин (рис. 8, А). Более 80% содержащихся в цитозоле ~40 кДа α-субъединиц G<sub>1</sub>-белков, ADP-рибозилирующихся КТ и/или

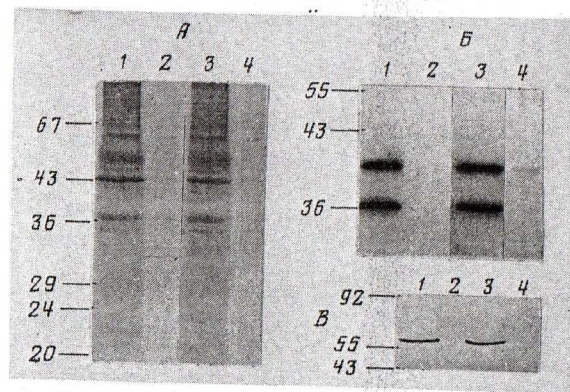


Рис. 5. Высвобождение актина,  $\alpha$ - и  $\beta_1$ -субъединиц  $G_i$ -белков из плазматических мембран легких свиньи в отсутствие и в присутствии  $MgCl_2$ . Экстракцию мембран проводили как описано в разделе «Методы исследования». 1 и 2 — осадок и супернатант, полученные после экстракции мембран буфером А, содержащим 5 мМ  $MgCl_2$ ; 3 и 4 — осадок и супернатант, полученные после экстракции исходных мембран буфером А, не содержащим  $MgCl_2$ . Актин выявляли по его электрофоретической подвижности, используя для окраски геля кумасси G-250 (А). Распределение по фракциям  $\alpha$ - и  $\beta_1$ -субъединиц  $G_i$ -белка или  $\beta$ -тубулина выявляли иммуноблоттингом соответственно с анти- $G_i\alpha_{common}$  (AS-7) и анти- $G\beta_{common}$  (MS-1) антисыворотками (Б) или анти- $\beta$ -тубулин-моноклональными антителами (В) и соответствующими вторыми антителами: меченными [ $^{125}I$ ] (Б) или конъюгированными с пероксидазой (В)



Рис. 6. Индуцированное негидролизуемым аналогом GTP высвобождение  $\alpha$ -субъединицы  $G_i$ -белков из плазматических мембран легких. Экстракцию мембран проводили как описано в разделе «Методы исследования». Содержащиеся во фракциях  $G_i\alpha$ - и  $\beta_1$ -субъединицы выявляли иммуноблоттингом с комбинацией анти- $G_i\alpha_{common}$  (AS-7) и анти- $G\beta_{common}$  (MS-1) антисывороток и вторыми меченными [ $^{125}I$ ] антителами. Осадки (1-6) и супернатанты (7-12), полученные после экстракции исходных мембран буфером А, содержащим 5 мМ  $MgCl_2$ , в отсутствие (1 и 7) и в присутствии GDP (2 и 8),  $GDP\beta S$  (3 и 9), GTP (4 и 10),  $Gpp(NH)p$  (5 и 11) или  $GTP\gamma S$  (6 и 12)

узнающихся анти- $G_i\alpha_{common}$  антисывороткой — AS-7 (рис. 8, Б, В), 36 кДа  $\beta_1$ -субъединицы, выявляемой иммуноблоттингом с анти- $G\beta_{common}$  антисывороткой — MS-1 (рис. 8, В), и SMG-белков, детектируемых [ $\alpha$ - $^{32}P$ ]GTP-блоттингом (рис. 8, Г), сосаждается с F-актином. В то же время более 80% содержащихся в цитозоле 24—26 кДа  $BC_3$ -чувствительных белков с F-актином не осаждаются и остаются в супернатанте (рис. 8, Д).

Цитозольные КТ-чувствительные  $G_i$ -белки и SMG-белки, выявляемые в цитозоле [ $\alpha$ - $^{32}P$ ]GTP-блоттингом, проявляли актинзависимое поведение и в других экспериментах. Так, например, гель-фильтрация цитозоля на Ultrogel

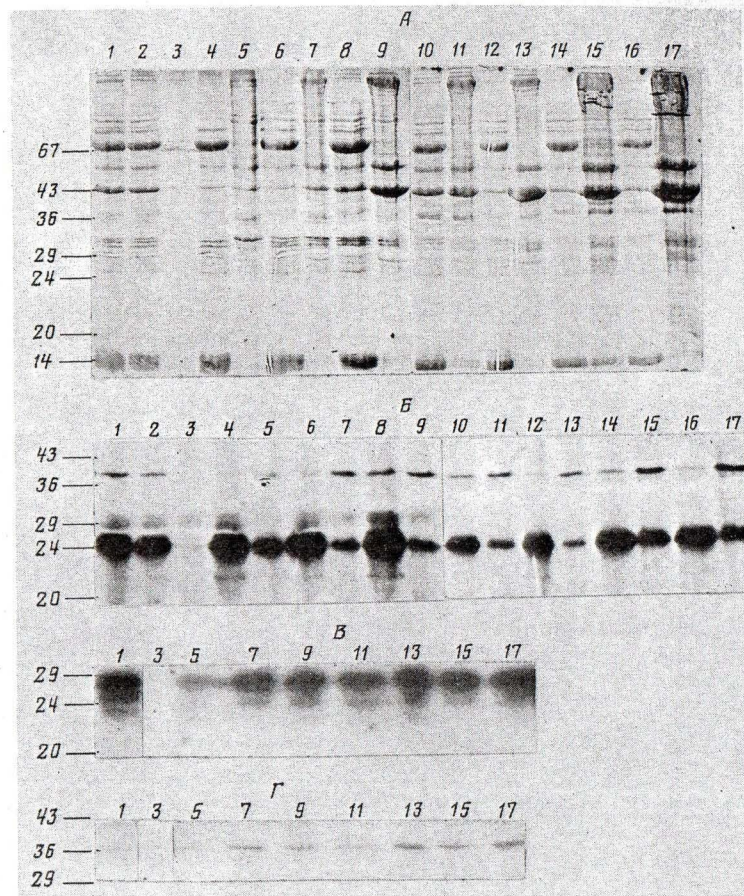


Рис. 7. F-Актинзависимое распределение содержащихся в легочном цитозоле КТ- и  $BC_3$ -чувствительных белков,  $\beta_1$ -субъединицы и SMG-белков, связывающих GTP на нитроцеллюлозе. Легочный цитозоль (1), супернатанты и осадки F-актина, полученные после инкубации цитозоля при 37° в течение 60 мин в отсутствие (2 и 3) и в присутствии 1 мМ  $CaCl_2$  (4 и 5), 5 мМ  $MgCl_2$  (6 и 7), 0,5 мМ АТФ (8 и 9), 100 мМ КСl (10 и 11), 5 мМ  $MgCl_2$  и 100 мМ КСl (12 и 13), 0,5 мМ АТФ и 100 мМ КСl (14 и 15), 5 мМ  $MgCl_2$ , 0,5 мМ АТФ и 100 мМ КСl (16 и 17). Для КТ- и  $BC_3$ -зависимого [ $^{32}P$ ]ADP-рибозилирования, иммуно- и [ $\alpha$ - $^{32}P$ ]GTP-блоттинга использовали соответственно 15, 100 и 25 мкл полученных фракций. А — Окрасивание содержащихся во фракциях 1-17 белков кумасси G-250; Б — КТ- и  $BC_3$  [ $^{32}P$ ]ADP-рибозилирование фракций 1-17; В — [ $\alpha$ - $^{32}P$ ]GTP-блоттинг; Г — иммуноблоттинг с анти- $G\beta_{common}$  антисывороткой (MS-1)

AcA-44 в присутствии индуктора полимеризации G-актина — 100 мМ NaCl, приводила к совместной элюции этих белков с актиновыми филаментами, тогда как цитозольные ARF и субстраты  $BC_3$  элюировались независимо от F-актина (данные не приведены). Диализ осадка F-актина против раствора низкой ионной силы в присутствии ЭДТА приводил к переходу F-актина в растворимый G-актин. При этом сосажденные с F-актином КТ-чувствительные  $\alpha$ -субъединицы  $G_i$ -белков также становились растворимыми. Повторный  $MgCl_2$ +KCl-зависимый переход G-актина в F-актин сопровождался выявлением в осадке F-актина КТ-чувствительных  $\alpha$ -субъединиц  $G_i$ -белков

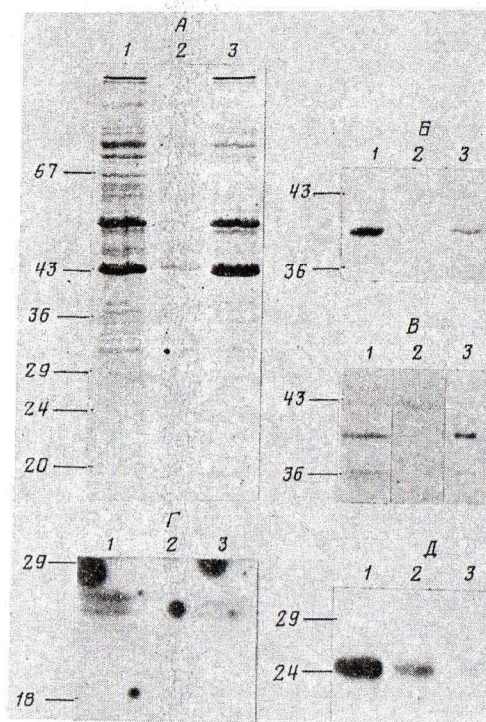


Рис. 8. Соосаждение с F-актином содержащихся в цитозоле эндотелия аорты человека  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединиц  $G_i$ -белков и SMG-белков, связывающих GTP на нитроцеллюлозе. Цитозоль эндотелиальных клеток (1), супернатант (2) и осадок (3) F-актина, полученные после полимеризации F-актина в присутствии 5 мМ  $MgCl_2$  и 100 мМ  $KCl$  и последующем ультрацентрифугировании: А — окрашивание содержащихся в фракциях белков кумасси G-250; Б —  $[^{32}P]$ ADP-рибозилирование КТ; В — иммуноблоттинг с анти- $G\alpha_{common}$  (AS-7) и анти- $G\beta_{common}$  (MS-1) антителами; Г —  $[\alpha\text{-}^{32}P]$ GTP-блоттинг; Д —  $[^{32}P]$ ADP-рибозилирование. Для А, Б, Д; В и Г использовали соответственно 20; 200 и 100 мкл фракций 1—3

(данные не приведены).

Экстракция эндотелиальных клеток 0,2%-ным раствором тритона X-100 позволяет селективно солиubilизировать содержимое клетки, оставляя нерастворимым ее цитоскелет. В тритон X-100-нерастворимой части клетки выявляются мажорные цитоскелетные белки: 43 кДа актин, 55 кДа виментин, > 200 кДа миозин (рис. 9, А). Около 20% содержащихся в эндотелии ~40 кДа субъединиц  $G_i$ -белков и 36 кДа  $\beta_1$ -субъединицы выявляются в тритон X-100-нерастворимой фракции (рис. 9, Б, В). Подобное распределение характерно и для SMG-белков, связывающих  $[\alpha\text{-}^{32}P]$ GTP на нитроцеллюлозе (рис. 9, Г). В свою очередь 24—26 кДа  $BC_3$ -чувствительные белки не выявляются в тритон X-100-нерастворимой (цитоскелетной) фракции (рис. 9, Д).

#### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Используя различные методы идентификации G- и SMG-белков (ADP-рибозилирование бактериальными ADP-рибозилтрансферазами, иммуноблот-

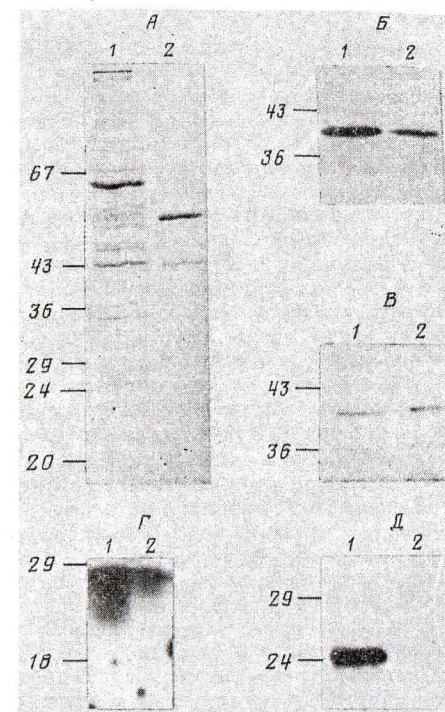


Рис. 9. Идентификация  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединиц  $G_i$ -белков, SMG-белков, связывающих GTP на нитроцеллюлозе, и  $BC_3$ -чувствительных белков в тритон X-100-растворимой и нерастворимой фракциях эндотелиальных клеток аорты человека. Конфлюэнтный монослой эндотелия (чашка Петри диаметром 10 см, ~ 7 млн. клеток) промывали 5 мл среды 199 и заливали 2 мл холодной среды экстракции, содержащей 50 мМ HEPES-Na, pH 7,0, 50 мМ  $KCl$ , 5 мМ  $MgCl_2$ , 1 мМ ЭДТА, 100 мкМ ФМСФ, 5 мкг/мл лейпептина и 0,2%-ный тритон X-100. Лизис клеток отслеживали визуально под микроскопом. Через 2 мин солиubilизировавшуюся клеточную фракцию (фракция 1) отбирали, а чашку Петри быстро промывали 5 мл холодной среды 199. Несольubilизировавшуюся цитоскелетную фракцию собирали и суспендировали в 2 мл холодного буфера, содержащего 5 мМ трис-HCl, pH 8,0, 1 мМ ЭДТА (фракция 2). А — Окрашивание белков, содержащихся во фракциях 1 и 2, кумасси G-250; Б —  $[^{32}P]$ ADP-рибозилирование КТ; В — иммуноблоттинг с анти- $G\alpha_{common}$  (AS-7)- и анти- $G\beta_{common}$  (MS-1)-антителами; Г —  $[\alpha\text{-}^{32}P]$ GTP-блоттинг; Д —  $[^{32}P]$ ADP-рибозилирование  $BC_3$ . Для А, Б, Д; В и Г использовали соответственно 20; 200 и 100 мкл фракций 1 и 2

тинг со специфическими антителами, полученными на пептидные фрагменты различных G- и SMG-белков, и  $[\alpha\text{-}^{32}P]$ GTP-блоттинг), нам удалось выявить следующие  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединицы G-белков и SMG-белки. В легких 42 кДа (мажорную) и 45 кДа (минорную) формы  $\alpha$ -субъединицы  $G_s$ -белка; 41 кДа (минорные) субъединицы  $G_{i1}$ - и  $G_{i3}$ -белков, 40 кДа (мажорную)  $\alpha$ -субъединицу  $G_{i2}$ -белка; 36 кДа (мажорную)  $\beta_1$ - и 35 кДа (минорную)  $\beta_2$ -субъединицы G-белков; 21 кДа gas- и gas-белки; 25 кДа  $G_{25K}$  ( $G_p$ )-белок; 19 кДа ARF-белок; 24 кДа (мажорные) и 26 кДа (минорные)  $BC_3$ -чувствительные rho/gas-белки; 19—26 кДа SMG-белки, выявляемые  $[\alpha\text{-}^{32}P]$ GTP-блоттингом (рис. 1, 2). В клетках эндотелия 42 и 45 кДа-формы  $\alpha$ -субъединицы  $G_s$ -белка; 41 кДа (минорную) и 40 кДа (мажорную) КТ-чувствительные  $\alpha$ -субъединицы соответственно  $G_{i3}$ - и  $G_{i2}$ -белков; 36 кДа (мажорную) и 35 кДа (минорную) соответственно  $\beta_1$ - и  $\beta_2$ -субъединицы G-белков; 24—25 кДа  $G_{25K}$ - ( $G_p$ ) белки; 21 кДа gas-белки;

24—26 кДа BC<sub>3</sub>-чувствительные rho/гас-белки; 23—26 кДа SMG-белки, связывающие [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]GTP на нитроцеллюлозе (рис. 3).

Обе формы  $\alpha$ -субъединиц G<sub>s</sub>-белка,  $\alpha$ -субъединицы G<sub>i1</sub>-, G<sub>i2</sub>-, G<sub>i3</sub>-белков,  $\beta_1$ -субъединица G-белков, SMG-белки, обладающие GTP-связывающей активностью на нитроцеллюлозе, G<sub>25</sub>K-(G<sub>p</sub>), gas-, гас- и ARF-белки идентифицировались как в мембранах, так и в цитозоле (рис. 1—3). Полученный цитозоль не содержал мембран как по методу выделения (ультрацентрифугирование при 200 000 g), так и по данным определения активности маркерных белков плазматической мембраны: аденилатциклазы, Na/K-АТФазы,  $\beta$ -адренорецепторов и т.д. (неопубликованные данные). Можно полагать, что присутствие G- и SMG-белков в цитозоле не является артефактом процедуры выделения, а в той или иной мере отражает внутриклеточное распределение этих белков.

Как уже отмечалось, локализация в мембранах G- и SMG-белков может определяться прохождением данными белками в клетке посттрансляционного процессинга по N- и C-концам молекулы, а также может быть связана с фосфорилированием-дефосфорилированием данных белков. Высвобождение  $\alpha$ -субъединиц G<sub>s/i</sub>-белков в цитозоль может осуществляться и вследствие их диссоциации от мембраносвязанного  $\beta/\gamma$ -комплекса, происходящей в ответ на активацию мембранного G-белка гормон-рецепторным комплексом в присутствии GTP. Такой механизм, приводящий к появлению растворимых  $\alpha$ -субъединиц G-белков, был изначально предложен Родбеллом [17] и в дальнейшем подтвержден рядом исследователей [11—16], но далеко не всеми [1, 67, 68]. В многочисленных экспериментах, проведенных на культивируемых эндотелиальных клетках из сосудов человека (аорты, легочной артерии или пупочной вены), нам не удалось выявить достоверного высвобождения в цитозоль мембраносвязанных G- и SMG-белков в ответ на стимуляцию этих клеток разными биологически активными веществами: катехоламинами (в отсутствие и в присутствии адренергических антагонистов), гистамином, натрийуретическим пептидом предсердий, брадикинином, простагландином E<sub>1</sub>, карбамилхолином, соматостатином, субстанцией P, форболовым эфиром и форсколином (рис. 4 и неопубликованные данные). Незначительное высвобождение (~1%) в раствор содержащихся в мембранах легких мажорных 40 кДа G<sub>i2</sub>- и 42 кДа G<sub>s</sub>-субъединиц (но не 36 кДа  $\beta_1$ -субъединицы или SMG-белков) происходило лишь в присутствии Mg<sup>2+</sup> и аналогов GTP: Gpp(NH)p или GTP $\gamma$ S (рис. 5 и неопубликованные данные).

В то же время в цитозоле содержатся как G<sub>s</sub>/G<sub>i</sub>-субъединицы, так и SMG-белки и по меньшей мере  $\beta_1$ -субъединица (рис. 1—3). Установлено, что именно  $\beta/\gamma$ -комплекс придает способность G<sub>i</sub> $\alpha$ -субъединицам подвергаться КТ-зависимому ADP-рибозилированию [1, 3]. Молекулярная масса цитозольного КТ-чувствительного G<sub>i</sub>-белка легких в неактивированной GTP $\gamma$ S-форме составляет 75—80 кДа [21]. Поскольку содержащиеся в цитозоле ~40 кДа G<sub>i</sub> $\alpha$ -субъединицы обладают способностью ADP-рибозилироваться КТ, можно полагать, что эти белки функционально сопряжены с цитозольной 36 кДа  $\beta_1$ -субъединицей. В пользу этого свидетельствуют также следующие экспериментальные данные: 1) GTP $\gamma$ S, вызывающий диссоциацию гетеротримера G-белка в растворе, снижает, а GDP $\beta$ S, стабилизирующий гетеротример G-белка в растворе [1, 3], усиливает КТ-зависимое ADP-рибозилирование цитозольного G<sub>i</sub>-белка (белков) (рис. 1); 2) добавление к цитозолю препарата  $\beta/\gamma$ -субъединиц, выделенного из мембран головного мозга быка, не усиливает КТ-зависимое ADP-рибозилирование цитозольного G<sub>i</sub>-белка (неопубликованные данные); 3) потенцирование ADP-рибозилирования цитозольных G<sub>s</sub> $\alpha$ -субъединиц холерным токсином в присутствии GTP, Gpp(NH)p или GTP $\gamma$ S объясняется наличием в цитозоле легких ARF — SMG-белка, усиливающего ADP-рибозилирование в присутствии GTP [69, 70] (рис. 1, 2).

В конце 70-х годов Родбелл высказал предположение, что в отсутствие внешнего гормонального сигнала мембранные G-белки в клетке представле-

ны олигомерными «полидисперсными» комплексами с молекулярной массой более 10<sup>6</sup> Да. При активации G-белка гормоном в присутствии GTP или негидролизуемого аналога GTP данные комплексы распадаются на низкомолекулярные компоненты с молекулярной массой 250—350 кДа [71, 72]. Было показано, что использование «мягкого» детергента октил- $\beta$ -глюкозида приводит к солиubilизации олигомерных комплексов G-белков из мембран [73]. После такой солиubilизации GTP $\gamma$ S вызывал переход «полидисперсных» G-белков в низкомолекулярные формы, по седиментационным характеристикам близкие гетеротримерным G-белкам. По-видимому,  $\alpha\beta\gamma$ -гетеротримерная организация G-белка является лишь одним из возможных, но далеко не единственным структурным состоянием G-белков. Предполагается, что  $\alpha$ -субъединицы могут образовывать между собой разные по размеру олигомеры за счет межмолекулярных дисульфидных мостиков [74, 75]. Однако окончательно структурная организация «полидисперсных» форм G-белков не выяснена. Способность образовывать гомо-олигомерные структуры была показана и для SMG-белков [76].

Можно полагать, что одной из причин «полидисперсной» организации G- и SMG-белков в клетке является их взаимодействие с клеточными полимерными структурами — активными микрофиламентами и тубулиновыми микротрубочками. В работе [49] было показано, что основным белком суммарной фракции цитозольных белков головного мозга, связывающимся с мозговым G<sub>i</sub>-белком (белками), иммобилизованным на сефарозе в Gpp(NH)p-связанной форме, является 54 кДа тубулин. Интересно отметить, что данное взаимодействие подавлялось анти-тубулиновым агентом — колхицином. Из работ, проведенных в лаборатории М. Расеника, следует, что именно  $\alpha\beta$ -димер тубулина, а не микротрубочка может непосредственно взаимодействовать с G<sub>i</sub>- (преимущественно с G<sub>i1</sub>) и G<sub>s</sub>-белками в синаптосомальной мембране. При этом GTP, находящийся в обмениваемом нуклеотидсвязывающем центре  $\alpha\beta$ -димера тубулина, может последовательно переноситься в нуклеотидсвязывающие центры G<sub>i</sub>- и G<sub>s</sub>-белков, вовлеченных в регуляцию активности аденилатциклазы головного мозга [45, 50, 51, 77].

Около 30% содержащихся в тенях эритроцитов 45 кДа ХТ-чувствительной  $\alpha$ -субъединицы G<sub>s</sub>-белка и аденилатциклазной активности приходится на тритон X-100 — нерастворимую цитоскелетную фракцию [78]. Способность G<sub>s</sub>-белка частично экстрагироваться из плазмалеммы раствором низкой ионной силы в присутствии ЭДТА [78, 79] и, напротив, оставаться в мембране при экстракции плазмалеммы буферным раствором, содержащим 1 M KCl [67], может также свидетельствовать в пользу взаимодействия G<sub>s</sub>-белка с активным цитоскелетом.

В предварительных экспериментах, связанных с получением цитозоля из гомогената легочной ткани в разных условиях, нами было отмечено, что содержание  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединиц в цитозоле возрастает при снижении ионной силы буфера гомогенизации (неопубликованные данные). Представленные в настоящей работе экспериментальные данные свидетельствуют в пользу того, что по меньшей мере 10—20% содержащегося в легочной ткани и эндотелии млекопитающих G<sub>i</sub>-белка (преимущественно G<sub>i2</sub>-белка) и SMG-белков, выявляемых [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]GTP-блоттингом, взаимодействуют с F-актином. В пользу этого предположения свидетельствуют следующие экспериментальные наблюдения: 1) содержащиеся в цитозоле легких и эндотелия ~40 кДа КТ-чувствительные G<sub>i</sub> $\alpha$ -субъединицы (в основном  $\alpha$ -субъединица мажорного G<sub>i2</sub>-белка), 36 кДа  $\beta_1$ -субъединица и 23—26 кДа SMG-белки, идентифицируемые [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]GTP-блоттингом, количественно соосажаются с F-актином при ультрацентрифугировании (рис. 7, 8) или же элюируются совместно с высокомолекулярными формами актина при гель-фильтрации (неопубликованные данные); 2) 20% этих белков выявляются в тритон X-100-нерастворимой цитоскелетной фракции эндотелиальных клеток, содержащей преимущественно активные филаменты (рис. 9); 3) экстракция плазматических мембран легких раствором низкой ион-

ной силы в присутствии ЭДТА приводит к частичному высвобождению из них G-актина и  $\alpha\beta$ -субъединиц G<sub>i</sub>-белка (рис. 5). Участие микротрубочек тубулина в формировании «полидисперсных» структур G<sub>i</sub>- и SMG-белков, выявляемых [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]GTP-блоттингом, кажется маловероятным. Следует отметить, что взаимодействие с F-актином характерно далеко не для всех SMG-белков легких и эндотелия. Так, например, цитозольные 24—26 кДа BC<sub>3</sub>-чувствительные SMG-белки (представители rho- и gas-подсемейств SMG-белков), а также ARF практически не связаны с F-актином (рис. 7—9).

Стабильные аналоги GTP, GTP $\gamma$ S, Gpp(NH)p, вызывающие в растворе диссоциацию гетеротримера на GTP-форму  $\alpha$ -субъединицы и  $\beta/\gamma$ -комплекс [1, 3], не изменяли способности данных G-белков взаимодействовать с F-актином. Отсутствие влияния стабильных аналогов GDP и GTP (GDP $\beta$ S, GTP $\gamma$ S и Gpp(NH)p) на ассоциацию G<sub>i</sub>-субъединиц и SMG-белков, связывающих [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]GTP на нитроцеллюлозе с F-актином, позволяет предположить, что взаимодействовать с активными филаментами могут как GTP-, так и GDP-формы этих белков. Можно думать, что способность цитозольных G<sub>i</sub>-субъединиц и  $\beta$ 1-субъединицы связываться с полимеризованным актином определяется наличием у каждой из них (а не только у гетеротримера G<sub>i</sub>-белка) индивидуальных F-актинсвязывающих участков.

На данный момент остаются неясными функции G- и SMG-белков, ассоциированных с активными филаментами. Можно предположить, что локализация данных белков на F-актине обеспечивает их сопряжение с цитозольными эффекторами, например с фосфолипазами C и A<sub>2</sub>. Эти белки также могут принимать участие в процессах везикулярного транспорта или секреции. С другой стороны, перестройка актинового цитоскелета в клетке может изменять состояние «растворимых» и связанных с F-актином G- и SMG-белков и соответственно могут изменяться функции этих белков. Остается неясным, в каких формах G-белки взаимодействуют с F-актином — в виде свободных субъединиц, гетеротримеров или в виде высокомолекулярных «полидисперсных» комплексов. Ответы на эти вопросы могут дать дальнейшие исследования, связанные с реконструкцией очищенных G- и SMG-белков с немышечной и мышечной формами G/F-актина, а также проведение детальной иммуногистохимии.

Авторы статьи выражают глубокую благодарность научному сотруднику лаборатории молекулярной эндокринологии ИЭК КНЦ РАМН А. В. Никашину за оказанную помощь в подготовке статьи.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Gilman A.G. //Ann. Rev. Biochem. 1987. V. 56. P. 615-649.
- Freissmuth M., Casey P.J., Gilman A.G. //FESEB J. 1989. V. 3. P. 2125-2131.
- Birnbaumer L., Abramowitz J., Brow A.M. //Biochim. et biophys. acta. 1990. V. 1031. P. 163-224.
- Sternweis P.C. //J. Biol. Chem. 1986. V. 261. P. 631-637.
- Schultz A.M., Tsai S.C., Kung H.F., Oroszlan S., Moss J., Vaughan M. //Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1987. V. 146. P. 1234-1239.
- Buss J.E., Mumby S.E., Casey P.J., Gilman A.G., Sefton B.M. //Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1987. V. 84. P. 7493-7497.
- Linder M.E., Pang I.-H., Duronio R.J., Gordon J.I., Sternweis P.C., Gilman A.G. //J. Biol. Chem. 1991. V. 266. P. 4654-4659.
- Fung B.K.K., Yamane H.K., Ota I.M., Clars S. //FEBS Letters. 1990. V. 260. P. 313-317.
- Yamane H.K., Farnsworth C.C., Xie H., Howald W., Fung B.K.K., Clarke S., Gelb M.H., Glomset J.A. //Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1990. V. 87. P. 5868-5872.
- Mumby S.M., Casey P.J., Gilman A.G., Gutowski S., Sternweis P.C. //Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1990. V. 87. P. 5873-5877.
- Ransnas L.A., Svoboda P., Jasper J.R., Insel P.A. //Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1989. V. 86. P. 7900-7903.
- Milligan G., Unson C.G. //Biochem. J. 1989. V. 260. P. 837-841.

- Rudolph U., Koelsing D., Hinsch K.D., Seifert R., Bigalke M., Schultz G., Rosenthal W. //Mol. Cell. Endocrinol. 1989. V. 63. P. 143-153.
- Milligan G., Mullaney I., Unson C.G., Marshall L., Spiegel A.M., McArdle H. //Biochem. J. 1988. V. 254. P. 391-396.
- Lynch C.J., Morbach L., Blackmore P.F., Exton J.H. //FEBS Letters. 1986. V. 200. P. 333-336.
- Eide B., Gierschik P., Milligan G., Mullaney I., Unson C., Goldsmith P., Spiegel A. //Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1987. V. 148. P. 1398-1405.
- Rodbell M. //Trends Biochem. Sci. 1985. V. 10. P. 461-464.
- Scherer N.M., Toro M.J., Entman M.L., Birnbaumer L. //Arch. Biochem. and Biophys. 1987. V. 259. P. 431-440.
- Volpp B.D., Nauseef W.M., Clars R.A. //J. Immunol. 1989. V. 142. P. 206-212.
- Molina Y., Vedia L.M., Reep B.R., Lapetina E.G. //Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1988. V. 85. P. 5899-5902.
- Tkachuk V.A., Hoffenberg S.I., Starikova M.G., Panchenko M.P. //J. Mol. Cell. Card. 1989. V. 21 (Suppl. 1). P. 91-95.
- Spicher K., Hinsch K.D., Gausepohl H., Frank R., Rosenthal W., Schultz G. //Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1988. V. 157. P. 885-890.
- Takahashi S., Hashida K., Yatsunami K., Fukui T., Negishi M., Katada T., Ui M., Kanaho Y., Asano T., Ichikawa A. //Biochim. et biophys. acta. 1991. V. 1093. P. 207-215.
- Barbacid M. //Ann. Rev. Biochem. 1987. V. 56. P. 779-827.
- Segev N., Mulholland J., Botstein D. //Cell. 1988. V. 52. P. 915-924.
- McGrath J.P., Capon D.J., Goeddel D.V., Levinson A.D. //Nature. 1984. V. 310. P. 644-649.
- Hall A. //Science. 1990. V. 249. P. 635-640.
- Winegar D.A., Molina-Vedia L., Lapetina E.G. //J. Biol. Chem. 1991. V. 266. P. 4381-4386.
- Maltese W.A., Sheridian K.M. //J. Biol. Chem. 1990. V. 265. P. 17883-17890.
- Maltese W.A., Sheridian K.M., Repko E.M., Erdman R.A. //J. Biol. Chem. 1990. V. 265. P. 2148-2155.
- Katayama M., Kawata M., Yoshida Y., Horiuchi H., Yamamoto T., Matsuura Y., Takai Y. //J. Biol. Chem. 1991. V. 266. P. 12639-12645.
- Yamane H.K., Fung B.K.K. //J. Biol. Chem. 1989. V. 264. P. 20100-20105.
- Huzoor-Akbar, Winegar D.A., Lapetina E.G. //J. Biol. Chem. 1991. V. 266. P. 4387-4391.
- Fujiyama A., Tamanoi F. //Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1986. V. 83. P. 1266-1270.
- Kawata M., Kikuchi A., Hoshijima M., Yamamoto K., Hashimoto E., Yamamura H., Takai Y. //J. Biol. Chem. 1989. V. 264. P. 15688-15695.
- Lapetina E.G., Lacial J.C., Reep B.R., Vedia L.M. //Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1989. V. 86. P. 3131-3134.
- McAtee P., Dawson G. //J. Biol. Chem. 1990. V. 265. P. 6788-6793.
- Hart M.J., Polakis P.G., Evans T., Cerione R.A. //J. Biol. Chem. 1990. V. 265. P. 5990-6001.
- Ballester R., Furth M.E., Rosen O.M. //J. Biol. Chem. 1987. V. 262. P. 2688-2695.
- Molina Y., Vedia L., Lapetina E.G. //Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1989. V. 86. P. 868-870.
- Bengtsson T., Sarndahl E., Stendahl O., Andersson T. //Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1990. V. 87. P. 2921-2925.
- Rao K.M.K., Betschar J.M., Virji M.A. //Biochem. J. 1985. V. 230. P. 709-714.
- Sarndahl E., Lindroth M., Bengtsson T., Fallman M., Gustavsson J., Stendahl O., Andersson T. //J. Cell. Biol. 1989. V. 109. P. 2791-2799.
- Chardin P., Boquet P., Madaule P., Popoff M.R., Rubin E.J., Gill D.M. //EMBO J. 1989. V. 8. P. 1087-1092.
- Wang N., Rasenick M.M. //Biochemistry. 1991. V. 30. P. 10957-10965.
- Downey G.P., Chan C.K., Grinstein S. //Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1989. V. 164. P. 700-705.
- Edelstein N.G., Catterall W.A., Moon R.T. //Biochemistry. 1988. V. 27. P. 1818-1822.
- Watson P.A. //J. Biol. Chem. 1990. V. 265. P. 6569-6575.
- Higashi K., Ishibashi S. //Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1985. V. 132. P. 193-197.
- Rasenick M.M., Wang N. //J. Neurochem. 1988. V. 51. P. 300-311.