

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ β 1-СУБЪЕДИНИЦ G-БЕЛКОВ С АКТИНОВЫМ ЦИТОСКЕЛЕТОМ.

ГРИШИН А.В., ГЕРАСИМОВСКАЯ Е.В., СТАРИКОВА М.Г., ПАНЧЕНКО М.П.,
НИКАШИН А.В., ТКАЧУК В.А.

Всероссийский кардиологический научно-производственный комплекс МЗ МП РФ

Москва, 3-я Черепковская 15а, 121552 Россия. Факс: (095) 414-67-19

С помощью иммуноблоттинга охарактеризовано распределение β 1- и β 2-субъединиц G-белков в мембранной и цитозольной фракциях легких свиньи. Показано, что β 1-субъединицы присутствуют как в мембранах, так и в цитозоле, тогда как β 2-субъединицы - только в мембране. Активация мембранных G-белков с помощью негидролизуемых аналогов GTP вызывает частичное высвобождение из мембран β 1-, но не β 2-субъединиц. При фракционировании легочной ткани в условиях, препятствующих деполимеризации актиновых филаментов, и β 2-, и β 1-субъединицы G-белков обнаруживаются во фракции, содержащей мембраны и полимеризованный актин. Диализ этой фракции в буфере с низкой ионной силой приводит к деполимеризации актина и переходу части β 1-субъединиц из мембранной фракции в супернатант. На основании полученных данных сделано предположение, что распределение β 1-субъединиц G-белков между мембранной и цитозольной фракциями может зависеть от состояния актинового цитоскелета.

Ключевые слова: G-белки, β -субъединицы, цитоскелет, актин, легкие.

ВВЕДЕНИЕ. GTP-связывающие белки (G-белки), передающие гормональные сигналы от рецепторов плазматической мембраны на внутриклеточные эффекторные системы, представляют собой гетеротримеры, состоящие из α -, β - и γ -субъединиц [1-3]. При активации G-белка гидрофильная α -субъединица диссоциирует от $\beta\gamma$ -комплекса и может переходить из мембраны в цитозоль [4-7]. Мембранное расположение $\beta\gamma$ -комплекса определяется посттрансляционным процессингом γ -субъединицы, включающим присоединение гидрофобного изопреноидного "хвоста" к тиоловой группе остатка Cys в С-концевом участке молекулы, отщепление трех терминальных аминокислот и метилирование освободившейся карбоксильной группы Cys [8-13].

Мембранные субъединицы β 1 с молекулярной массой 36 кДа (β 36-субъединицы) и β 2 с молекулярной массой 35 кДа (β 35-субъединицы) являются продуктами различных генов и, вероятно, выполняют в клетке разные функции [14, 15]. Ранее мы сообщали, что β 1-субъединицы могут быть локализованы не только в мембране, но и в цитозоле [16].

Экспериментальные данные, представленные в настоящей работе, свидетельствуют в пользу того, что распределение β 1-субъединиц между мембранной и цитозольной фракциями может быть связано с состоянием актинового цитоскелета.

МЕТОДИКА. Легкие свиньи, полученные на мясокомбинате спустя 1-2 часа после забоя животных, транспортировали при температуре $+4^{\circ}\text{C}$, затем замораживали в жидком азоте и хранили при температуре -70°C .

Выделение и хранение плазматических мембран и цитозоля из легких свиньи проводили как описано ранее [17]. Цитозоль после выделения дополнительно фильтровали через фильтр "Acrodisc" с диаметром пор 0,2 мкм.

Для проведения иммуноблоттинга содержащиеся в мембранах и цитозоле белки после разделения электрофорезом в ПААГ переносили на нитроцеллюлозу ("Schleicher & Schuell", ФРГ), как описано в [18], при 300 мА в течение 14 часов. Нитроцеллюлозный фильтр с перенесенными белками выдерживали при комнатной температуре в течение 2 часов в растворе, содержащем 50 мМ Трис-НСl, pH 7,5, 150 мМ NaCl, 5% бычий сывороточный альбумин, затем промывали 3 раза по 10 мин в буфере, содержащем 50 мМ Трис-НСl, pH 7,5, 150 мМ NaCl, 0,05% Твин-20. После отмывки полоски нитроцеллюлозы инкубировали в течение 2 часов при комнатной температуре в буфере, содержащем 50 мМ Трис-НСl pH 7,5, 150 мМ NaCl и первые антитела: антисыворотка U-49 (анти- $\beta 1$) (1:1000) или антисыворотка GC-2 (анти- $\beta 2$) (1:200). Полосы антигенов выявляли мечеными (^{125}I) или конъюгированными с пероксидазой анти-IgG кролика с последующей 24-часовой автордиографией или окраской с 4-хлор-1-нафтолом в присутствии перекиси водорода.

Гель-фильтрацию цитозоля из легких свиньи проводили в колонке с Ultrogel AcA-44 (450 мл), уравновешенным буфером, содержащим 20 мМ Трис-НСl (pH 8,0) при 4°C , 100 мМ NaCl, 1 мМ ЭДТА и 2 мМ β -меркаптоэтанол. 10 мл нанесенного цитозоля элюировали при скорости 33 мл/час, объем фракции элюата составлял 11 мл.

Для изучения условий диссоциации субъединиц G-белков из мембран легких свиньи препарат мембран (1 мг/мл белка) инкубировали при 37°C в течение одного часа в среде, содержащей 50 мМ Трис-НСl (pH 8,0), 1 мМ ЭДТА, 20 мМ MgCl_2 , 1 мМ дитиотрейтол, 0,1 мМ $\text{GDP}\beta\text{S}$ или $\text{GTP}\gamma\text{S}$ (конечный объем пробы 400 мкл), а затем центрифугировали при 40000 об/мин в течение одного часа на роторе LP-42 Ti (Beckman). Супернатанты и осадки отбирали и добавляли к ним равные объемы 20% трихлоруксусной кислоты, выдерживали в течение одного часа при 4°C , а затем центрифугировали 15 мин при 10000g. Осадки промывали несколько раз холодным ацетоном и растворяли в 40 мкл буфера, содержащем 20 мМ Трис-НСl (pH 8,0) и 1 мМ ЭДТА. Полученные таким способом пробы анализировали электрофорезом и последующим иммуноблоттингом.

Электрофорез в ПААГ проводили по методу Лэммли [19].

Белок в препаратах определяли методом Петерсона [20], используя в качестве стандарта бычий сывороточный альбумин. Концентрацию альбумина определяли спектрофотометрически по поглощению при 280 нм.

В работе были использованы реактивы: Трис, ЭДТА, β -меркаптоэтанол, дитиотрейтол, бычий сывороточный альбумин, Твин-20 - "Sigma" (США); $\text{GDP}\beta\text{S}$, $\text{GTP}\gamma\text{S}$ - "Boehringer-Mannheim" (ФРГ). Остальные реактивы марки ОСЧ или ЧДА фирмы "Реахим". Все растворы были приготовлены на бидистиллированной воде. Порошок мышечного актина был любезно предоставлен Н.Б. Гусевым (МГУ), антисыворотка U-49 (анти- $\beta 1$) - S.M. Mumby и A.G. Gilman (Department of Pharmacology, Southwestern Graduate School, University of Texas Health Science Center, Dallas, TX), антисыворотка GC-2 (анти- $\beta 2$) - J.D. Robishaw (Weiss Center, Geisinger Clinic, Danville, PA.).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. В легких свиньи методом иммуноблоттинга с использованием специфических антител к $\beta 1$ -субъединице G-белка (U-49) выявляется 36 кДа $\beta 1$ -субъединица, - как в мембранной фракции, так и в цитозоле (рис. 1).

Количественный анализ показал, что около 10% от общего количества этих субъединиц приходится на цитозольную фракцию. В этой фракции, полученной путем осаждения

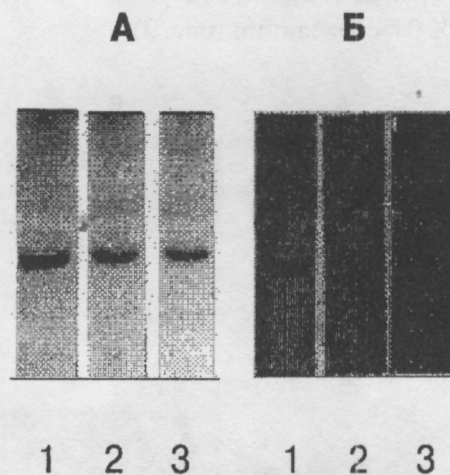


Рисунок 1.

Иммуноблоттинг субклеточных фракций с антителами U-49 (анти-β1) (А) и GC-2 (анти-β2) (Б).

1 - мембраны, 2 - цитозоль, 3 - цитозоль, профильтрованный через фильтр с диаметром пор 0,2 мкм.

мембран методом ультрацентрифугирования при 200000g, мы не обнаружили β-адренорецепторов и аденилатциклазной активности (результаты не приведены), что свидетельствует об отсутствии в анализируемом препарате примесей плазматических мембран. При фильтрации цитозоля через фильтр с диаметром пор 0,2 мкм количество β1-субъединиц в цитозольном препарате не изменялось. В отличие от β1-субъединиц, обнаруживаемых как в мембранах, так и в цитозоле, β2-субъединицы были выявлены только в мембранной фракции. Совокупность всех этих фактов указывает на то, что наличие β1-субъединиц в цитозоле не является результатом присутствия в цитозольной фракции примеси плазматических мембран и свидетельствует о цитоплазматической локализации части β1-субъединиц.

Инкубация мембран с негидролизуемым аналогом GTP - GTPγS, приводящая к необратимой диссоциации гетеротримера G-белка на α-субъединицу и βγ-комплекс, вызывает частичное высвобождение β1-субъединиц из мембран в супернатант. В отсутствие гуанозинтрифосфатов или в присутствии GDPβS, стабилизирующего гетеротример, диссоциации β1-субъединиц из мембран не происходит. Вместе с тем, инкубация этих же мембран с GTPγS или GDPβS не приводила к переходу в супернатант β2-субъединиц (рис.2).

При гель-фильтрации цитозоля легких свиньи β1-субъединицы G-белка обнаруживаются во фракциях, в которых элюируются белки с молекулярной массой около 40 кДа (данные не приведены). Можно предположить, что β1-субъединицы в цитозоле находятся в мономерной форме и не связаны с α-субъединицами G-белков.

В ходе ранее проведенных исследований β1-субъединицы G-белков были обнаружены в цитоскелетной фракции [1, 21]. При гомогенизации ткани легких свиньи в буфере высокой ионной силы (150 mM NaCl), т.е. в условиях, препятствующих деполимеризации актинового цитоскелета, и последующем центрифугировании, мы получили супернатант, который содержал следовые количества β-субъединиц G-белков и актина. Практически все β1-субъединицы и полимеризованный актин обнаруживались в

осадке, содержащем мембраны. Диализ этого осадка в буфере низкой ионной силы и последующее ультрацентрифугирование диализата (200000g, 4°C) приводило к переходу в супернатант 80% актина и около 30% $\beta 1$ -субъединиц. В осадке, содержащем мембраны, оставалось 20% актина и 70% $\beta 1$ -субъединиц (рис. 3).

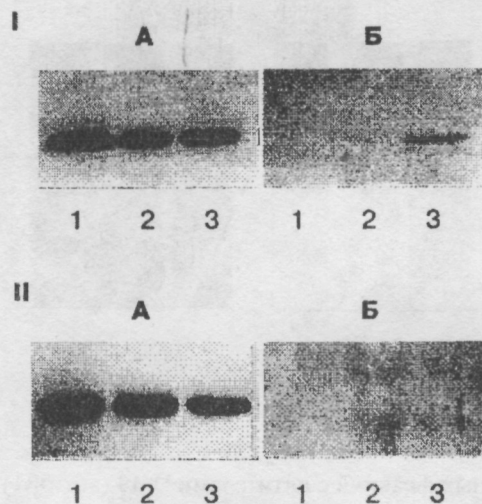


Рисунок 2.

Влияние негидролизуемых аналогов гуаниловых нуклеотидов на высвобождение $\beta 1$ -субъединиц G-белков из мембран (А) в супернатант (Б).

I - иммуноблоттинг с антителами U-49 (анти- $\beta 1$); II - иммуноблоттинг с антителами GC-2 (анти- $\beta 2$)

Мембраны преинкубировали: без добавок (1), в присутствии 0,1 mM GDP β S (2), в присутствии GTP γ S (3).

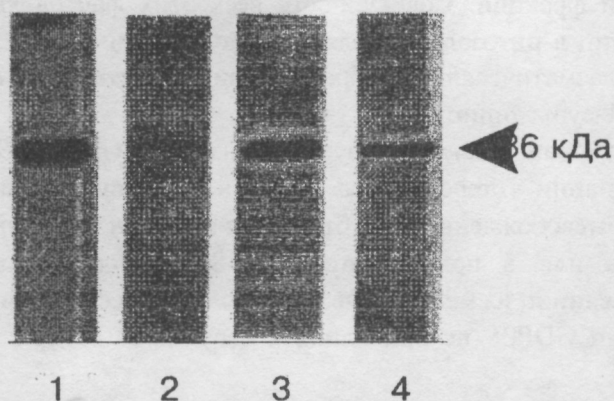


Рисунок 3.

Иммуноблоттинг с антителами U-49 (анти- $\beta 1$) фракций, содержащих мембраны и полимеризованный актин (1), цитозоль без актина (2), осадок мембран после диализа (3) и супернатант после диализа (деполимеризованный актин) (4).

Приведенные данные показывают, что обнаруживаемые вне плазматической мембраны $\beta 1$ -субъединицы (или $\beta\gamma$ -комплексы) не связаны с α -субъединицами и находятся в цитоплазме в свободном (не гетеротримерном) состоянии. Частичная диссоциация $\beta 1$ -субъединиц из мембран в раствор при активации G-белков позволяет предположить, что цитозольная локализация $\beta 1$ -субъединиц может быть результатом

гормональной активации клеток. В то же время, ассоциация $\beta 1$ -субъединиц с препаратом мембран, полученным в условиях, препятствующих деполимеризации актинового цитоскелета (высокая ионная сила), и переход $\beta 1$ -субъединиц в растворимое состояние при деполимеризации актина (рис.3), указывает на возможную роль перестройки цитоскелета в изменении внутриклеточной локализации субъединиц G-белков.

Таким образом, в легочной ткани свиньи $\beta 1$ -субъединицы G-белков присутствуют как в мембранах, так и в цитозоле, а $\beta 2$ -субъединицы - только в мембранах. При этом распределение $\beta 1$ -субъединиц между мембранной и цитозольной фракциями зависит как от степени активации G-белков, так и от состояния актинового цитоскелета.

ЛИТЕРАТУРА.

1. Cilman A.G. (1987) Ann. Rev. Biochem, **56**, 615-649.
2. Birnbaumer L., Abramowitz J., Brown A.M. (1990) Biochim. Biophys. Acta **1031**, 163-224.
3. Freissmuth M., Casey P.J., Gilman A.G. (1989) FASEB J., **3**, 2125-2131.
4. Lynch C.J., Morbach L., Blackmore P.F., Exton J.H. (1986) FEBS Lett. **200**, 333-336.
5. Milligan G., Unson C.G. (1989) Biochem. J. **260**, 837-841.
6. Ransnas L.A., Svoboda P., Jasper J.R., Insel P.A. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **86**, 7900-7903.
7. Rudolph U., Koesling D., Hinsch K.D., Seifert R., Bigalke M., Schultz G., Rosenthal W. (1989) Mol. Cell. Endocrinol. **63**, 143-153.
8. Fung B.K.K., Yamane H.K., Ota I.M., Clars S. (1990) FEBS Lett. **260**, 313-317.
9. Maltese W. A., Robishaw J. D. (1990) J. Biol. Chem. **265**, 18071-18074.
10. Simonds W. F., Butrynsk J. E., Gautam, N., Unson C. G., Spiegel, A. M. (1991) J. Biol. Chem. **266**, 5363-5366.
11. Cox A.D., Der C.J. (1992) Curr. Opin. Cell Biol. **4**, 1008-1016.
12. Mumby S.M., Casey P.J., Gilman A.G., Gutowski S., Sternweis P.C. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA **87**, 5873-5877.
13. Yamane H.K., Farnsworth C.C., Xie H., Howald W., Fung B.K.K., Clarke S., Gelb M.H., Glomset J.A. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA **87**, 5868-5872.
14. Amatruda III T.T., Gautam N., Fong H.K.W., Northup J.K., Simon M.I. (1988) J. Biol. Chem. **263**, 5008-5011.
15. Birnbaumer L. (1992) Cell **71**, 1069-1072.
16. Панченко М.П., Старикова М.Г., Гришин А.В., Нюпенко Е.В., Кабаева Н.В., Романов Ю.А., Антонов А.С., Ткачук В.А. (1993) Биохимия **58**, 438-453.
17. Nupenko E.V., Panchenko M.P., Starikova M.G., Grishin A.V., Tkachuk V.A. (1991) Biochim. Biophys. Acta **1091**, 213-221.
18. Towbin H., Staehelin T., Gordon J. (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. USA **76**, 4350-4353.
19. Laemmli U.K. (1979) Nature (London) **227**, 680-685.
20. Peterson G.L. Anal. Biochem. (1977) **83**, 436-456.

21. Carlson K.E., Woolkalis M.J., Newhouse M.G., Manning D.R. (1986) *Mol. Pharmacol.* **30**, 463-468.

INTERACTION OF $\beta 1$ SUBUNIT OF G PROTEINS WITH ACTIN CYTOSKELETON.

A. V. GRISHIN, E.V. GERASIMOVSKAYA, M.G. STARIKOVA, M. P.PANCHENKO ,
A. V. NICKASHIN, V. A. TKACHUK

Russian Cardiology Research Centre, 3rd Cherepkovskaya str., Moscow, Russia 121552.

Fax: (095) 414-67-19

Using immunoblotting with specific antibodies, we have identified $\beta 1$ - and $\beta 2$ -subunits of G-proteins in membrane and cytosolic fractions of pig lung. It has been shown that $\beta 1$ -subunit is present both in membrane and cytosolic fractions, whereas $\beta 2$ -subunit is associated only with membranes. Activation of membrane-bound G proteins with non-hydrolysable GTP analogues have led to partial release from membrane of $\beta 1$ -, but not $\beta 2$ -subunits. When depolymerisation of F-actin during fractionation was prevented, both $\beta 1$ - and $\beta 2$ -subunits were found in fraction containing total membranes and F-actin. Dialysis of this fraction into low ionic strength buffer caused depolymerization of the bulk of actin and release of about 1/4 of $\beta 1$ -subunits into solution. The data presented here suggest that distribution of $\beta 1$ -subunits between membrane and cytosol could depend on the state of actin cytoskeleton.

Keywords: G-proteins, β -subunits, cytoskeleton, actin, lung