

Е. Г. СКВОРЦЕВИЧ, Н. С. ПАНТЕЛЕЕВА, Л. Н. ПИСАРЕВА

РЕАКЦИИ ИЗОТОПНОГО ОБМЕНА КИСЛОРОДА В СИСТЕМЕ
 $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -ЗАВИСИМОЙ АТФАЗЫ

(Представлено академиком С. Е. Севериным 5 VII 1971)

Существенным элементом механизма ферментативного действия $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -зависимой АТФазы является образование фосфорилированного посредника (¹, ²).

Большие успехи в познании промежуточных этапов гидролиза АТФ были достигнуты с помощью изотопов C^{14} и P^{32} . Однако единого мнения относительно структуры и роли посредника в транспорте ионов через мембраны пока нет.

В данной работе изучали некоторые стороны механизма действия транспортной АТФазы с применением тяжелого изотопа кислорода O^{18} .

По аналогии с O^{18} -обменными реакциями, обнаруженными в ходе гидролиза АТФ миофибриллярными белками (³, ⁴), в системе $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -зависимой АТФазы можно ожидать наличие O^{18} -обмена на стадии фосфорилированного интермедиата («интермедиарный обмен») и O^{18} -обмена «со средой» («прямой обмен» с кислородом P_n , добавленного в среду в отсутствие АТФ). Первой попыткой обнаружения O^{18} -обмена в системе АТФазы из мембран эритроцитов является работа (⁵).

Исследования настоящей работы ограничены изучением прямого O^{18} -обмена и установлением взаимосвязи между $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -зависимой АТФазой и O^{18} -обменом.

Препараты мембран из коры почек морской свинки, обладающие $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -зависимой АТФазной активностью, получали по методу Поста (⁶), в модификации Писаревой (⁷). Они содержали 70–90% АТФазной активности, подавляемой оуабаином, их удельная активность варьировала в пределах 40–180 $\mu\text{моль P}_n$ на 1 мг белка в 1 час. В препаратах не было обнаружено активности пирогосфатазы, 5'-нуклеотидазы и неспецифических фосфатаз.

Гидролиз АТФ проводили в среде, содержащей 10 ммол. АТФ, 10 ммол. MgCl_2 , 150 ммол. трис- HCl , pH 7,75 ммол. NaCl , 15 ммол. KCl , H_2O^{18} (1,2 ат. % избытка O^{18}). Объем проб составлял 6 и 12 мл. Реакцию начинали с добавления фермента (0,07–0,4 мг белка на 1 мл пробы). Пробы инкубировали при температуре 25–44°, в течение времени, необходимого для 100% гидролиза АТФ (2–6 час.). Реакцию останавливали добавлением 50% ТХУ до концентрации 5% при 0°. P_n для анализа на O^{18} выделяли в виде бариевой соли (⁸). Подготовку образцов среды и фосфата бария для масс-спектрометрического анализа на содержание O^{18} проводили гуанидингидрохлоридным методом (⁹). Анализ изотопного состава кислорода осуществляли на масс-спектрометре МИ 1305. Величину обмена кислорода выражали числом атомов O^{18} , обменявшихся на O^{16} в молекуле P_n . Расчеты проводили по формулам, приведенным в (¹⁰). Расхождения между параллельными пробами не превышали 5%. В таблицах приведены типичные опыты.

В энзиматической системе гидролиза АТФ, содержащей H_2O^{18} , наблюдали включение O^{18} в отщепляющийся фосфат в количестве более одного атома на молекулу P_n (табл. 1). Величины, характеризующие O^{18} -обмен-

ную реакцию между отщепляющимся P_n и H_2O^{18} , получали путем вычитания одного атома O^{18} , включающегося в процессе гидролиза за счет разрыва фосфоангидридной связи (¹), из суммарной величины O^{18} -обмена. Наблюдаемый в этом случае O^{18} -обмен не превышал 0.5 атома O^{18} на 1 молекулу P_n .

При замене в среде АТФ на P_n (10 ммол.) наблюдали значительно более интенсивный O^{18} -обмен. В зависимости от условий он составлял 2—3 атома O^{18} на 1 молекулу P_n (табл. 1 и 2).

Т а б л и ц а 1

O^{18} -обмен, катализируемый препаратами $Na^+ - K^+$ -зависимой АТФазы из коры почек морской свинки

Субстраты реакции	Концентрация белка, мг/мл	АТФазная активность, μ мол. P_n на 1 мг белка в час	Время инкубации, час	Температура, °C	Число атомов O^{18} на 1 молекулу P_n	
					Суммарное	за счет O^{18} -обмена
АТФ	0,4	41	1,5	44	1,56	0,56
АТФ	0,2	42	6,0	25	1,13	0,13
P_n	0,2	42	6,0	25	1,68	1,68

Наиболее важным показателем отношения O^{18} -обменной реакции к $Na^+ - K^+$ -зависимой АТФазе может служить чувствительность этой реакции к ионам Mg , Na , K , оуабаину и нуклеотидам (табл. 2).

Т а б л и ц а 2

Влияние условий среды на O^{18} -обмен, катализируемый $Na^+ - K^+$ -активируемой АТФазой из коры почек морской свинки

№ опыта	№ проб	Изменяемые компоненты среды	Источник метки	Концентрация белка, мг/мл	Время инкубации, час.	Число атомов O^{18} на 1 молекулу P_n
1	1	Mg^{2+} , K^+ , Na^+	}	0,21	3	2,83
	2	Mg^{2+} , K^+		0,21	3	3,49
	3	Mg^{2+} , Na^+		0,21	3	0,04
	4	K^+ , Na^+		0,21	3	0,03
2	1	Mg^{2+} , K^+ , Na^+	}	0,17	3	1,78
	2	Mg^{2+} , K^+ , Na^+ , АТФ		0,17	3	1,39
	3	Mg^{2+} , K^+ , Na^+ , АДФ		0,17	3	1,14
	4	Mg^{2+} , K^+ , Na^+ , АМФ		0,17	3	1,74
3	1	Mg^{2+} , K^+	}	0,07	2	2,14
	2	Mg^{2+} , K^+ , оуабаин		0,07	2	0,14
	3	Mg^{2+} , K^+ , Na^+		0,07	2	1,88
	4	Mg^{2+} , K^+ , Na^+ , оуабаин		0,07	2	0,10

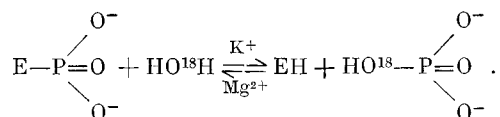
П р и м е ч а н и я. 1. Состав среды. Опыт 1: 10 мм KH_2PO_4 ; 40 мм $MgCl_2$; 75 мм $NaCl$; 15 мм KCl ; 150 мм трис- HCl , pH 7; H_2O^{18} (1,2 ат. % избытка O^{18}). АТФазная активность фермента 87 μ мол. P_n на 1 мг белка в час. Опыт 2: 10 мм $KH_2PO_4^{18}$ (1 ат. % избытка O^{18}); 5 мм нуклеотиды; остальное то же, что и в опыте 1. Опыт 3: 5 мм $H_3PO_4^{18}$ (0,99 ат. % избытка O^{18}); 5 мм $MgCl_2$; 13 мм $NaCl$; 1,6 мм KCl ; 75 мм трис- HCl , pH 7, 0,1 мм оуабаин; АТФазная активность фермента 198 μ мол. P_n на 1 мг белка в час. 2. Опыты проводили при температуре 37°.

В среде, содержащей все три иона (Mg^{2+} , Na^+ , K^+), необходимые для проявления АТФазной активности, наблюдали высокий O^{18} -обмен — около трех атомов на молекулу P_n . Удаление Mg^{2+} или K^+ приводило к почти полному торможению O^{18} -обмена (на 99%), тогда как удаление Na^+ несколько стимулировало обмен (на 19%). Оуабаин в концентрации 0,1 ммол/л, полностью подавляющей $Na^+ - K^+$ -зависимую АТФазную активность (⁷), значительно снижает (на 95%) величину O^{18} -обмена. АТФ и АДФ в концентрации 5 ммол/л подавляют O^{18} -обмен на 22%

и 37% соответственно. АМФ не оказывает влияние на O^{18} -обменную реакцию.

Следовательно, для протекания O^{18} -обменной реакции необходимы ионы Mg^{2+} и K^+ , она почти полностью тормозится оуабаином, в меньшей степени АТФ, АДФ и ионами Na^+ .

Полученные данные позволяют предположить, что прямой O^{18} -обмен в системе $Na^+ - K^+$ -активируемой АТФазы имеет непосредственную связь с K^+ -зависимой ацетил-фосфатазной активностью этой системы (¹¹). Есть все основания считать, что O^{18} -обменная реакция протекает на уровне фосфорилированного энзима (¹²), тем более, что в качестве фосфорилирующих агентов, наряду с АТФ, могут служить АДФ, ацетилфосфат и P_n (¹³). Механизм обмена можно представить следующим образом:



Данный механизм предполагает обратимость стадии гидролиза АТФ, связанной с распадом фосфорилированного интермедиата. Mg^{2+} стимулирует обмен, способствуя образованию интермедиата, K^+ — способствуя его распаду. Оуабаин подавляет O^{18} -обмен, связывая фосфорилированную форму энзима и стабилизируя посредник. Торможение O^{18} -обмена в присутствии АТФ и АДФ может быть следствием сдвига реакции вправо, поскольку фосфорилирование энзима за счет АТФ и АДФ выражено в большей степени, чем за счет P_n (¹⁴).

В пользу представленного механизма O^{18} -обмена свидетельствуют и ранние данные Бептли (¹⁵) о разрыве связи $O - P$ при гидролизе ацетилфосфата ацетилфосфатазой, полученные при помощи O^{18} .

Результаты исследования O^{18} -обмена в системе $Na^+ - K^+$ -зависимой АТФазы подтверждают образование фосфорилированного посредника, постулируют обратимость фосфатазной части реакции и показывают, что в случае фосфорилирования фермента при помощи P_n роль ионов K^+ сводится к стимуляции распада интермедиата.

Ленинградский государственный университет
им. А. А. Жданова

Поступило
5 VII 1971

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ R. L. Post, A. K. Sen, A. S. Rosenthal, J. Biol. Chem., **240**, 3, 1437 (1965).
- ² R. W. Albers, Ann. Rev. Biochem., **36**, 2, 657 (1967). ³ D. E. Koshland, H. M. Levy, Biochemistry of Muscle Contraction, **2**, Boston, 1964. ⁴ Н. С. Пантелеева, Изв. АН СССР, сер. биол., № 4, 565 (1968). ⁵ B. L. Jones, Diss. Abstr., B, **28**, 3194 (1967). ⁶ R. L. Post, Methods in Enzymol., **10**, 762 (1967). ⁷ Л. Н. Писарева, Цитология, **10**, 8, 988 (1968). ⁸ Л. А. Ильин, Н. С. Пантелеева, Цитология, **9**, 5, 553 (1967). ⁹ Л. А. Ильин, Вестн. Ленингр. ун-в., сер. биол., № 3, 85 (1966).
- ¹⁰ H. M. Levy, E. M. Ryan et al., J. Biol. Chem., **237**, 5, PC 1730 (1962). ¹¹ H. Bader, A. K. Sen, Biochim. et biophys. acta, **118**, 1, 116 (1966). ¹² D. E. Koshland, Disc. Farad. Soc., № 20, 142 (1955). ¹³ В. К. Лишко, ДАН, **184**, № 6, 1441 (1969).
- ¹⁴ М. К. Малышева, В. К. Лишко, Н. М. Полякова, Биохимия, **35**, 4, 717 (1970). ¹⁵ R. Bently, J. Am. Chem. Soc., **71**, 1, 265 (1949).