

Л. М. РАЙХМАН, Э. П. БУЖИНСКИЙ, Ю. Ш. МОШКОВСКИЙ

ПРИМЕНЕНИЕ ПАРАМАГНИТНЫХ ЗОНДОВ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ
КОНФОРМАЦИОННЫХ ИЗМЕНЕНИЙ В Na^+ , K^+ -ЗАВИСИМОЙ
АТФазе

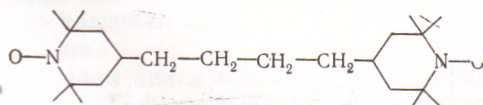
(Представлено академиком Н. М. Эмануэлем 14 V 1973)

В настоящее время считается установленным, что реакция гидролиза АТФ мембранной АТФазой, активируемой ионами Na^+ и K^+ (Na^+ , K^+ -АТФаза), включает две основных стадии: образование фосфорилированной формы фермента при участии ионов Na^+ и ее последующее дефосфорилирование, катализируемое ионами K^+ (^{1, 2}). Предполагается, что Na^+ -зависимое фосфорилирование и K^+ -зависимое дефосфорилирование сопровождается изменением конформации мембранных структур, содержащих фермент, которое и лежит в основе активного перемещения ионов через мембрану (^{3, 4}).

В последние годы появились сообщения о возможности наблюдения конформационных изменений в препаратах Na^+ , K^+ -АТФазы с помощью кругового дихроизма и люминесцентных меток (⁵⁻⁷). Однако результаты, полученные этими методами, были недостаточно четкими и в ряде случаев оспаривались другими авторами (⁸). В данной работе для выявления конформационных переходов в препаратах Na^+ , K^+ -АТФазы мы применили метод гидрофобных парамагнитных (спиновых) зондов, связывающихся с неполярными участками мембран, преимущественно с их фосфолипидными компонентами (^{9, 10}). Спектры электронного парамагнитного резонанса (э.п.р.), содержащиеся в зонде иминоксильных групп, зависят от характера их молекулярного окружения, что позволяет обнаружить структурные изменения матрицы, с которой связан зонд.

Выделение препарата Na^+ , K^+ -АТФазы (из почек морской свинки) и определение его активности проводили по методу Поста (¹¹). Na^+ , K^+ -АТФазная активность составляла 60–65 ед. (1 ед. = 1 ммол/мг·час) при специфичности (отношение Na^+ , K^+ -АТФазной к общей АТФазной активности) 80–85 %. Парамагнитные зонды (п.з.) вводили в среду, содержащую препарат Na^+ , K^+ -АТФазы, в виде малых количеств этанольного раствора с таким расчетом, чтобы конечная концентрация п.з. в среде составляла 10^{-4} M при содержании белка 10 мг/мл. После нескольких минут инкубации препарата Na^+ , K^+ -АТФазы с п.з. записывали спектры э.п.р. в «исходном состоянии» (т. е. в отсутствие АТФ и ионов Na^+ и K^+) и затем при последовательном добавлении АТФ + NaCl, т. е. в условиях образования фосфорилированного интермедиата, и KCl, катализирующего его дефосфорилирование. П.з. в концентрации 10^{-4} M не влияли на Na^+ , K^+ -АТФазную активность.

Из нескольких испытанных зондов, содержащих одну (монорадикал) или две (бирадикал) иминоксильных группы, наибольшие изменения спектров э.п.р. под влиянием АТФ и ионов Na^+ и K^+ наблюдались в случае применения бирадикального парамагнитного зонда:



обозначаемого в дальнейшем как БПЗ-1. Параметром, характеризующим микровязкость среды, в которой находится бирадикал, является так называемая частота обмена ν , определяемая из соотношения интенсивностей основных и промежуточных линий спектра (рис. 1), возникающих в результате электронного обмена между двумя иминоксильными группами

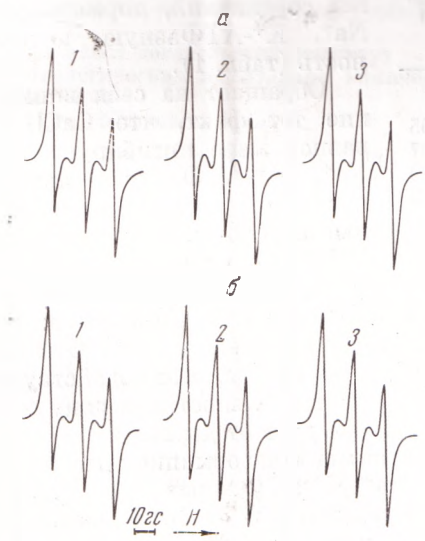


Рис. 1

Рис. 1. Спектры э.п.р. БПЗ-1 в препарате Na^+ , K^+ -АТФазы. а — интактный препарат; б — препарат, обработанный оуабаином 10^{-4} М. 1 — исходное состояние, 2 — после добавления 2 мМ АТФ и 150 мМ NaCl, 3 — после добавления 20 мМ KCl. Спектры сняты при температуре 22°

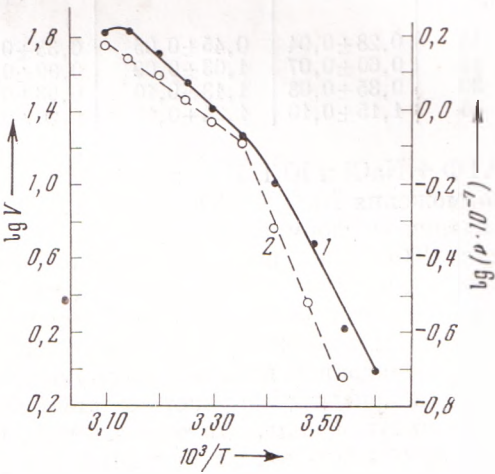


Рис. 2

Рис. 2. Зависимость Na^+ , K^+ -АТФазной активности (V) и частоты обмена БПЗ-1 (ν) в препарате Na^+ , K^+ -АТФазы от температуры в координатах Аррениуса. 1 — Na^+ , K^+ -АТФазная активность, 2 — частота обмена БПЗ-1

(¹²). Чем выше интенсивность промежуточных линий относительно основных, тем больше частота обмена ν и тем меньше микровязкость среды, в которой содержится бирадикал.

При добавлении АТФ и NaCl, т. е. в условиях образования фосфорилированного интермедата Na^+ , K^+ -АТФазы, наблюдается явно выраженное возрастание интенсивности промежуточных линий относительно основных (рис. 1а), соответствующее увеличению параметра ν на 70%. Последующее добавление KCl частично обращает эти изменения.

Отсюда следует, что образование фосфорилированного интермедата Na^+ , K^+ -АТФазы сопровождается определенными конформационными перестройками неполярных участков мембран, содержащих БПЗ-1, при которых их микровязкость уменьшается. Эти конформационные изменения специфичны для Na^+ , K^+ -АТФазной активности, так как оуабайн, специфический ингибитор Na^+ , K^+ -АТФазы, блокирует влияние АТФ и ионов Na^+ и K^+

Таблица 1
Влияние CaCl_2 , параклормеркурибензоата (ПХМБ) и олигомицина на Na^+ , K^+ -АТФазную активность и величину индуцируемого АТФ + NaCl и KCl изменения параметра ν БПЗ-1

Реагент	Ингибирование, %		
	Na^+ , K^+ -АТФазная активность	увеличение ν , индуцированное АТФ (2мМ) и NaCl (150 мМ)	уменьшение ν , индуцированное KCl (20 мМ)
CaCl_2 , 1 мМ	68	71	73
ПХМБ, $5 \cdot 10^{-4}$ М	97	79	98
Олигомицин, 20 $\mu\text{г}$ на 1 мг белка	36	7	32

Таблица 2

Влияние АТФ + NaCl и KCl на частоту обмена ν БПЗ-1 в препаратах Na^+ , K^+ -АТФазы при разных температурах ($\nu \cdot 10^7 \text{ сек}^{-1}$)

Температура, °C	Исходное состояние	После добавления АТФ 2 мМ и NaCl 150 мМ	После добавления KCl 20 мМ
15	$0,28 \pm 0,04$	$0,45 \pm 0,05$	$0,33 \pm 0,05$
22	$0,60 \pm 0,07$	$1,03 \pm 0,09$	$0,80 \pm 0,07$
30	$0,85 \pm 0,08$	$1,13 \pm 0,10$	$0,93 \pm 0,09$
38	$1,15 \pm 0,10$	$1,24 \pm 0,12$	$1,20 \pm 0,12$

на частоту обмена БПЗ-1 (рис. 16). Конформационные переходы, индуцируемые АТФ и ионами Na^+ и K^+ , ингибируются также рядом других соединений, тормозящих Na^+ , K^+ -АТФазную активность (табл. 1).

Обращает на себя внимание тот факт, что CaCl_2 в равной мере ингибирует как Na^+ , K^+ -АТФазную активность, так и конформационные переходы, индуцируемые

АТФ + NaCl и KCl. В то же время в случае ПХМБ и олигомицина степень торможения Na^+ , K^+ -АТФазной активности соответствует степени ингибирования конформационных изменений, индуцируемых KCl, тогда как влияние АТФ + NaCl на конформацию ингибируется в меньшей мере. Отсюда следует, что участки активного центра Na^+ , K^+ -АТФазы, взаимодействующие с ионами Na^+ и K^+ , отличаются разной чувствительностью к ряду соединений и, возможно, пространственно отделены друг от друга.

Рассматривая влияние различных агентов на конформационные переходы в неполярных участках мембран Na^+ , K^+ -АТФазных препаратов, надо иметь в виду, что оказываемый ими эффект может быть связан не только с действием на активный центр фермента, но и с непосредственным влиянием на структурные компоненты мембран. Например, в основе ингибирующего действия CaCl_2 может лежать его способность эффективно связываться с мембранными фосфолипидами, уменьшая при этом их конформационную подвижность. Данный вопрос требует дальнейших исследований.

На рис. 2 представлена температурная зависимость Na^+ , K^+ -АТФазной активности и величины ν БПЗ-1 в координатах Аррениуса. При 25° наблюдается хорошо выраженный излом аррениусовской зависимости параметра ν . Такой эффект может быть обусловлен фазовым переходом в неполярных областях мембран типа «плавления» их жидко-кристаллических структур (¹³, ¹⁴). Примерно в этом же температурном интервале наблюдается изгиб аррениусовской зависимости для Na^+ , K^+ -АТФазной активности.

Представляет интерес также и тот факт, что относительные изменения параметра ν под влиянием АТФ + NaCl и KCl существенно зависят от температуры (табл. 2). Наиболее резкий эффект наблюдается при 20—22°. При 30° влияние АТФ и ионов Na^+ и K^+ уже проявляется слабее, а при 38° — статистически недостоверно. При 15° изменения ν также менее выражены, чем при 22°. Обсуждая эти данные, нужно учитывать, что количество молекул зонда, статистически распределенных в неполярных участках Na^+ , K^+ -АТФазного препарата, значительно превышает количество содержащихся в этом препарате активных центров Na^+ , K^+ -АТФазы. Тот факт, что при изменении состояния последних (фосфорилирование или дефосфорилирование) удается все же наблюдать изменение спектров э.п.р. зондов, связан, по-видимому, с кооперативными свойствами мембран (¹³, ¹⁴), в силу которых изменение конформации небольших участков мембраны (в области активного центра Na^+ , K^+ -АТФазы) может индуцировать структурные перестройки в относительно больших участках («доменах»), прилегающих к активному центру. Величина такого домена, чувствительного к перестройкам в активном центре, должна уменьшаться с увеличением температуры, особенно резко снижаясь при переходе через точку, соответствующую «плавлению» жидко-кристаллической структуры мембранных фосфолипидов. При низкой температуре

(15°) ответ зонда на конформационные перестройки в активном центре может быть уменьшен в результате частичного «замораживания» жидкокристаллической структуры.

Авторы благодарят А. А. Льва за интерес к теме данного исследования, полезные советы и критические замечания и Л. А. Пирюзина за постоянное внимание к работе и обсуждение результатов.

Научно-исследовательский институт
по биологическим испытаниям химических
соединений

Купавна, Московская обл.

Институт цитологии Академии наук СССР
Ленинград

Поступило
10 V 1973

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ R. W. Albers, *Ann. Rev. Biochem.*, **36**, 2, 727 (1967). ² A. A. Lev, L. N. Pisareva, *J. Membrane Biol.*, **2**, 2, 108 (1970). ³ A. K. Sen, T. Tobin, R. L. Post, *J. Biol. Chem.*, **224**, 24, 6596 (1969). ⁴ В. К. Лешко, М. К. Малышева, Н. М. Полякова, *Биохимия*, **35**, 3, 510 (1970). ⁵ G. E. Lindenmayer, A. Schwartz, *Arch. Biochem. and Biophys.*, **140**, 2, 371 (1970). ⁶ K. Nagai, G. E. Lindenmayer, A. Schwartz, *ibid.*, **139**, 252 (1970). ⁷ A. Yoda, *Federat. Proc.*, **30**, 3, 1169 (1971). ⁸ M. Mayer, Y. Avi-Dor, *Isr. J. Med. Sci.*, **6**, 6, 726 (1970). ⁹ H. M. McConnell, B. C. McFarland, *Quart. Rev. Biophys.*, **3**, 1, 91 (1970). ¹⁰ В. К. Кольтовер, Л. М. Райхмани др., *ДАН*, **197**, № 1, 219 (1971). ¹¹ R. L. Post, A. K. Sen, *Methods in Enzymol.*, **10**, 762 (1967). ¹² M. Goldfield, Y. Hendel et al., *Stud. Biophys.*, **20**, 3, 161 (1970). ¹³ J. P. Changeau, J. Thiery et al., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **57**, 2, 335 (1965). ¹⁴ А. Аннаев, В. К. Кольтовер и др., *Биофизика*, **17**, 2, 267 (1972).