

В. И. ШВЕЦ, Р. Н. ГЛЕБОВ, Г. В. ТОЛСТИКОВА

## СПОСОБНОСТЬ ЛИПИДОВ РЕАКТИВИРОВАТЬ Na, K-АТФазу МОЗГА КРЫС

(Представлено академиком С. Е. Севериным 22 IV 1974)

Na, K-активируемая, Mg-зависимая АТФаза (КФЭ.6.1.3), локализованная в клеточных мембранах, ответственна за активный транспорт  $\text{Na}^+$  и  $\text{K}^+$  через мембраны. В возбудимых мембранах функционирование транспортной АТФазы сопряжено с механизмами возбуждения. Na, K-АТФаза представляет собой липопротеидный комплекс, «жестко» связанный с мембранами. Активность ферментной системы при обработке детергентами, органическими растворителями или фосфолипазами, резко снижается и может реактивироваться некоторыми фосфолипидами (<sup>1-5</sup>) и холестерином (<sup>6</sup>). Реактивация трактуется как полная или частичная реконструкция липопротеидного комплекса, при этом липидам отводится не только структурная, но и функциональная роль. Целью данной работы является изучение оптимальных условий реактивации солюбилизированной Na, K-АТФазы синаптического происхождения очищенными липидами.

В качестве нативного мембранного препарата I Na, K-АТФазы использовали фракцию грубых митохондрий коры головного мозга крыс после экстракции 0,6 M KCl при pH 8,2 (<sup>7</sup>). Препарат I обрабатывали 0,1% тритоном X-100 (20 мин., 20°, 3 мг белка на 1 мл). Солюбилизованную Na, K-АТФазу (препарат II) получали при 12 000 g (40 мин., 0-4°), при этом выход по белку составляет 41%. Детергент удаляли диализом против воды (препарат III) или против смеси 120 mM NaCl и 20 mM KCl (препарат IV) в течение 10 час. при 0-4°. Препараты хранили при -10° в течение 3-5 дней. Активность АТФаз определяли по степени накопления в ходе реакции (20 мин., 37°) неорганического фосфора. Состав инкубационной среды (1 мл) в ммольях: АТФ-Na<sub>2</sub> 3, MgCl<sub>2</sub> 5, NaCl 100, KCl 20, трис-HCl 50 (pH 7,4), оубаин 0,1, белок 300 мкг. Активность Na, K-АТФазы в мкмольях P<sub>i</sub> на 1 мг белка в час рассчитывали по разнице в отсутствие и присутствии оубаина. После 5 мин. (37°) преинкубации с тонкой эмульсией липидов (хранение при -10°) реакцию начинали добавлением АТФ, неорганический фосфор определяли колориметрически (<sup>8</sup>). Данные получали из 6-8 опытов.

Из мозга быка выделяли фракцию суммарных липидов (СЛ) (<sup>9</sup>), фосфатидилсерин (ФС) (<sup>10</sup>), сфингомиелин (СФ) и цереброзиды (ЦР) (<sup>11</sup>); из яичных желтков — фосфатидилхолин (ФХ) (<sup>12</sup>). Идентификацию липидов проводили тонкослойной хроматографией, и.к. спектрами и дисперсией оптического вращения при сравнении с образцами синтетических липидов.

Активность Na, K- и Mg-АТФазы соответственно для препарата I  $5,8 \pm 0,6$  и  $10,2 \pm 1,1$ ; препарата II  $1,2 \pm 0,2$  и  $3,8 \pm 0,5$ ; препарата III  $4,5$  и  $3,9$ ; препарата IV  $11,0 \pm 1,5$  и  $6,9 \pm 0,2$  единиц. Увеличение активности растворимой Na, K-АТФазы в ходе диализа против воды можно объяснить частичной реконструкцией ферментной системы, а при диализе против солей — стабилизацией активных центров. Нами показано, что ФХ, начиная с 5 мкг/мл (~0,1 mM), тормозит АТФазы препарата I, при этом 500 мкг ФХ вызывает 90% торможения Na, K-АТФазы и 49% Mg-АТФазы. ФС в

концентрации 1—500 мкг слабо тормозит Na, К-АТФазу (10%) (13) и при 500 мкг на 42% тормозит Mg-АТФазу. Таким образом, ни ФС, ни ФХ не реактивируют нативную Na, К-АТФазу мозга.

Учитывая, что реактивацию СЛ и ФС не удалось обнаружить для Na, К-АТФазы препаратов II и IV, все последующие опыты проводили на препарате III. Из рис. 1 следует, что максимум реактивации Na,

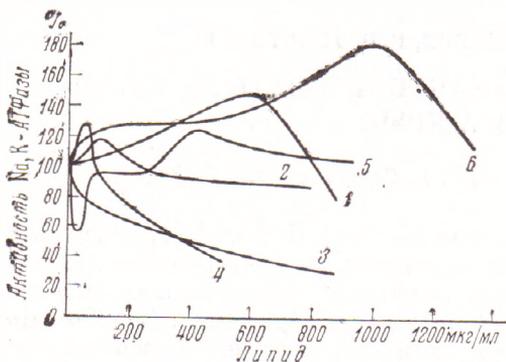
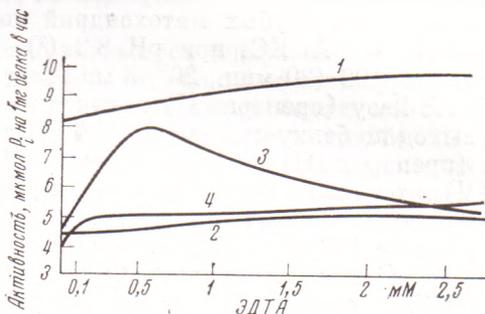


Рис. 1. Реактивация Na, К-АТФазы препарата III. За 100% принята активность Na, К-АТФазы в отсутствие липидов. 1 — ФС, 2 — ЦР, 3 — ФХ, 4 — СФ, 5 — холестерин, 6 — СЛ. Здесь, как и на рис. 2, приведены средние данные из 5—6 опытов

К-АТФазы СЛ наблюдается при концентрации 1 мг (80%), ФС при 0,6 мг (49%), ЦР при 0,1 мг (17%), СФ при 0,05 мг (27%), холестерина при 0,4 мг (24%). ФХ (лецитин), в отличие от других липидов, в концентрации 0,05—0,8 мг значительно тормозит Na, К-АТФазу препарата III, как и в случае препарата I; это может быть объяснено наличием холиповой группировки, как и для ацетилхолина (АХ), являющегося ингибитором Na, К-АТФазы (7). В литературе отмечается, что реактива-

Рис. 2. Влияние ЭДТА-Na<sub>2</sub> на реактивацию Na, К-АТФазы препарата III фракцией суммарных липидов. 1 — Na, К-АТФаза+СЛ+ЭДТА, 2 — Mg-АТФаза+СЛ+ЭДТА, 3 — Na, К-АТФаза+ЭДТА, 4 — Mg-АТФаза+ЭДТА



ция Na, К-АТФазы ФХ может происходить за счет примесей (3), очищенный же ФХ не реактивирует Na, К-АТФазу дезоксихолатного экстракта мозга и почек (5). Отметим, что данные по реактивации СФ и ЦР транспортной АТФазы в литературе отсутствуют. Реактивирующее действие липидов, по-видимому, зависит от их химической структуры, и наиболее эффективным действием обладает ФС.

Из рис. 1 также видно двухфазное действие липидов (кроме ФХ): нарастание эффекта реактивации до максимума и последующее снятие эффекта вплоть до торможения Na, К-АТФазы. Mg-АТФаза в наших экспериментах не реактивируется липидами. В случае действия ФС и СЛ активность Mg-АТФазы не изменяется, в остальных случаях наблюдается торможение на 20—40%, зависящее от концентрации внесенного липида. Искусственная смесь липидов в оптимальных и полуоптимальных количествах оказалась в наших опытах неэффективной, присутствие ФХ в смеси приводило к снятию реактивации. Из рис. 2 следует, что реактивация СЛ Na, К-АТФазы наблюдается также и на фоне ЭДТА, что отмечается и в литературе (14). Интересно, что ЭДТА способна «реактивировать» Na, К-АТФазу в концентрации 0,5 мм, однако двухфазный характер кривой

(рис. 2) позволяет предполагать более значительное влияние ЭДТА на связывание белка с липидами, чем на возможное связывание примесных двухвалентных ионов — ингибиторов Na, К-АТФазы (15).

Согласно нашим данным, оптимумы концентрации АТФ и  $K_m$  (метод Лайнуивера и Бэрка) для Na, К-АТФазы препарата I, III и III+1 мг СЛ оказались сходными и равными 3 мМ и 1,3 мМ соответственно. Субстратное торможение для реактивированной Na, К-АТФазы в этом случае проявлялось при концентрации АТФ > 3 мМ, для препарата I > 5 мМ, для III > 4 мМ. Нами также показано (табл. 1), что  $Ca^{2+}$  (0,6–2,5 мМ) и АХ (0,25–1,0 мМ) тормозят активность «растворимой» Na, К-АТФазы

Таблица 1  
Влияние ионов  $Ca^{2+}$  и ацетилхолина на активность «растворимой» Na, К-АТФазы в присутствии 0,6 мг/мл фосфатдилсерина

Ингибиторы	Концентрация, мМ	Активность АТФаз, мкмол. Рi на 1 мг белка в час			
		Na, К-АТФаза	Na, К-АТФаза + ФС	Mg-АТФаза	Mg-АТФаза + ФС
—	—	4,5±0,4	6,7±0,5 *	3,9±0,3	3,9±0,3
$Ca^{2+}$	5,0	0,06±0,04	1,2±0,5	1,3±0,4	1,3±0,4
	2,5	1,0±0,5	1,5±0,4	1,3±0,4	1,3±0,3
	0,6	1,2±0,6	1,4±0,5	1,3±0,3	1,3±0,4
АХ	1,0	1,8±0,3	5,2±0,4 *	2,0±0,4	2,5±0,6
	0,25	1,7±0,5	3,1±0,5 *	2,4±0,4	3,1±0,5

Примечание. Приведены средние данные из 4–6 опытов. Звездочкой указаны значения  $P < 0,05$  (по сравнению с АТФазой в отсутствие ФС).

препарата III и реактивированного ФС (0,6 мг/мл). Однако, если  $Ca^{2+}$  в используемых концентрациях практически снимает реактивирующий эффект ФС, то АХ частично его сохраняет. Можно предположить, что точка приложения АХ на липопротеидный комплекс не находится в области белок-липидного взаимодействия, в то время как точка приложения другого ингибитора —  $Ca^{2+}$  находится в этой области. Если в состоянии покоя возбудимые мембраны могут иметь «жесткое» белок-липидное взаимодействие, то в состоянии возбуждения — лабильное; в этом случае возбуждение сопровождается снижением активности Na, К-АТФазы (16). Активный транспорт  $Ca^{2+}$  из синаптоплазмы в среду и гидролиз АХ после прекращения возбуждения могут инициировать «реконструкцию» Na, К-АТФазы синаптических мембран *in vivo*.

Таким образом, представленные данные указывают на структурно-функциональную роль липидов в функционировании Na, К-АТФазы возбудимых мембран.

Институт нормальной и патологической физиологии Академии медицинских наук СССР

Поступило 19 III 1974

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> О. В. Курсенко, Г. Л. Вавилова, Укр. биохим. журн., т. 43, 25 (1971). <sup>2</sup> R. Tanaka, J. neurochem, v. 16, 1301 (1969). <sup>3</sup> L. J. Fenster, J. H. Copenhagen, Biochim. et biophys. acta, v. 137, 406 (1967). <sup>4</sup> K. P. Wheeler, R. Whittam, J. Physiol. (London), v. 207, 353 (1972). <sup>5</sup> H. K. Kimelberg, D. Papahadiopordos, Biochim. et biophys. acta, v. 282, 277 (1972). <sup>6</sup> T. Noguchi, S. Freed, Nature, v. 230, 148 (1971). <sup>7</sup> Р. Н. Глебов, Н. М. Дмиргиева, Биохимия, т. 39, № 4 (1974). <sup>8</sup> O. H. Lowry, J. A. Lopez, J. Biol. Chem., v. 162, 421 (1946). <sup>9</sup> J. Folch, M. Less, J. Biol. Chem., v. 226, 497 (1957). <sup>10</sup> H. S. Sander, Biochim. et biophys. acta, v. 144, 485 (1967). <sup>11</sup> T. Iatokawa, J. Biochem., v. 54, 444 (1963). <sup>12</sup> Ю. М. Кауров, И. И. Иванов, В. И. Куликов, В. И. Швец, В сборн. Биофизика мембран, Паланга, 1973, стр. 310. <sup>13</sup> J. Phillippi, Bull. Soc. chim. biol., v. 50, 1481 (1968). <sup>14</sup> A. R. Chipperfield, R. Whittam, J. Physiol., v. 230, 467 (1973). <sup>15</sup> S. C. Specht, J. D. Robinson, Arch. Biochem. and Biophys., v. 154, 314 (1973). <sup>16</sup> Р. Н. Глебов, Н. М. Дмиргиева и др., ДАН, т. 215, № 5 (1974).