

И. Д. ВОЛОТОВСКИЙ, Г. ВОЛЬФ, К. ДОЗЕ

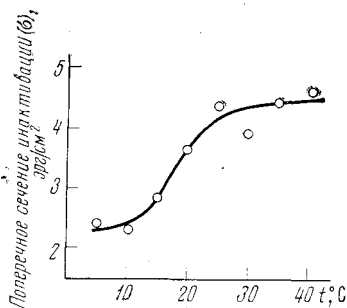
**ВЛИЯНИЕ УЛЬТРАФИОЛЕТОВОГО СВЕТА
НА КАТАЛИТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА МЕМБРАННОЙ
Ca²⁺-АТФазы ИЗ ЭРИТРОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА**

(Представлено академиком А. И. Опариным 30 VIII 1974)

Известно, что у.-ф. свет оказывает сильное ингибирующее действие на белки. Формально белковая фотоинаktivация представляет собой «одноударный», одноквантовый процесс (1, 2) и обусловлена разрушением в глобуле триптофановых и цитиновых остатков (2-4). Характерно также, что у.-ф. чувствительность белков контролируется их исходной конформацией (5). Вполне очевидно, что у.-ф. чувствительность белка может измениться после его ассоциации с биологической мембраной. С одной стороны, белки обладают иной конформацией в мембран-связанном состоянии, и с другой — мембранные белки, как правило, плотно связаны с липидной компонентой, способной к фотохимическим превращениям. Кроме того, эритроцитарные мембраны могут существовать в различных конформационных состояниях с обратимыми переходами между ними (6-8), в ходе которых изменяется конформация мембранных белков. В свою очередь, фотохимические события в окружении активных молекул фермента в мембране — также конформационно-активны и могут оказывать влияние на каталитические свойства мембранных ферментов.

В настоящей работе изучалось влияние у.-ф. света на каталитические свойства Ca²⁺-АТФазы — фермента, прочно ассоциированного с эритроцитарной мембраной (9). Эритроцитарные тени получали по методу Вольфа

Рис. 1. Зависимость поперечного сечения инаktivации (σ) мембранной Ca²⁺-АТФазы от температуры. Облучение светом 282 нм в кювете толщиной 0,5 см. Концентрация белка в образцах 0,02 мг/мл. Состав среды: 20 мМ трис-НСI буфер, рН 7,1; 60 мМ Na⁺, 2 мМ Mg²⁺, 43 мкМ Ca²⁺



(9). Активность Ca²⁺-АТФазы определяли с помощью специальной фотометрической системы, состоящей из перистальтического насоса, фотометра и самописца, позволяющей регистрировать изменение концентрации неорганического фосфора в системе. Ферментативная активность оценивалась по скорости образования pH в ходе гидролиза АТФ. Для поддержания постоянного уровня свободного Ca²⁺ использовалась буферная система, содержащая 0,4 мМ ЭДТА — Mg²⁺ и 0,4 мМ ЭДТА — Ca²⁺ (10).

У.-ф. облучение теней проводилось ксеноновой лампой ХВО-250 с ин-

Влияние температуры, ионного состава и pH среды на фоточувствительность мембранной Ca^{2+} -АТФазы

Ионный состав и pH среды	Поперечное сечение инаktivации, $\sigma \cdot 10^7 \text{ эрг}^{-1} \cdot \text{см}^2$		
	-10°	-20°	-35°
I. 60 мМ Na^+ ; 2 мМ Mg^{2+} ; 43 мкМ Ca^{2+} ; 20 мМ трис-НСI буфер, pH 7,1	2,3	3,4	4,4 0,52
II. 60 мМ Na^+ ; 2 мМ Mg^{2+} ; 43 мкМ Ca^{2+} ; 20 мМ трис-НСI буфер, pH 8,1	2,8	3,7	4,9 0,57
III. 60 мМ Na^+ ; 2 мМ Mg^{2+} ; 20 мМ трис-НСI буфер pH 8,1	3,7	3,1	3,2 1,1
IV. 2 мМ Mg^{2+} ; 43 мкМ Ca^{2+} ; 20 мМ трис-НСI буфер pH 8,1	3,9	3,7	4,0 0,97
V. 60 мМ Na^+ ; 43 мкМ Ca^{2+} ; 20 мМ трис-НСI буфер pH 8,1	1,7	3,3	3,9 0,43

Примечание. Эритроцитарные мембраны (концентрация по белку 0,02 мг/мл) суспендировались в указанных средах и облучались у.-ф. светом ($\lambda=282 \text{ нм}$) в кювете с толщиной 0,5 см. Для определения активности тени переводились в среду, содержащую 20 мМ трис-НСI, pH 7,1; 100 мМ Na^+ , 72,5 мкМ Ca^{2+} , 2 мМ Mg^{2+} .

терференционными светофильтрами ($\lambda_{\text{макс}}=282 \text{ нм}$, $T=5,5\%$; $\Delta\lambda_{0,5}=10 \text{ нм}$; $\lambda_{\text{минс}}=253 \text{ нм}$, $T=13\%$; $\Delta\lambda=9 \text{ нм}$) в термостатируемой кварцевой кювете с постоянным перемешиванием. Интенсивность облучения измерялась радиометром YS 1-65, расчет интенсивности падающего света проводился по Моревитцу (¹¹). В качестве показателя фоточувствительности Ca^{2+} -АТФазы использовалось поперечное сечение инаktivации (σ), определяемое согласно Сетлоу и Дойл (¹²). У.-ф. облучение эритроцитарных теней сопровождается инаktivацией мембранной Ca^{2+} -АТФазы. Как и для изолированных ферментов, процесс инаktivации подчиняется кинетике реакции первого порядка и его скорость не зависит от интенсивности света облучения. Это означает, что и в составе мембраны ферменты также инаktivуются по одноквантовому, одноударному механизму. В то же время фоточувствительность Ca^{2+} -АТФазы, по всей видимости, зависит от липидного окружения. После эвакуации из среды растворенного кислорода скорость инаktivации уменьшается и это особенно заметно при облучении светом с длиной волны 254 нм, где липиды уже сами начинают поглощать свет. Известно, что при у.-ф. облучении эритроцитарных мембран ее липиды окисляются и образующиеся продукты могут инаktivировать находящиеся в комплексе с ними ферменты (¹²), в том числе и Ca^{2+} -АТФазу. Уже этот факт позволяет предполагать зависимость фоточувствительности этого фермента от структурного состояния всей мембраны, поскольку эффективность фотоокисления липидной фазы может контролироваться неспецифическими мембранотропными воздействиями, температурой (¹²).

На рис. 1 изображена зависимость фоточувствительности Ca^{2+} -АТФазы от температуры. Полученная кривая имеет S-образную форму с точкой полуперехода около 18° . В общих чертах она коррелирует с другими данными (⁶⁻⁸), указывающими на то, что в области $15-25^\circ$ в эритроцитарной мембране происходит структурный переход. Ранее было показано, что конформация мембранных белков (данные кругового дихроизма) и кинетическое поведение Ca^{2+} -АТФазы сильно зависят от pH и ионного состава среды (¹³). Оказалось, что эти факторы влияют как на уровень фоточувствительности Ca^{2+} -АТФазы, так и на ее температурную зависимость

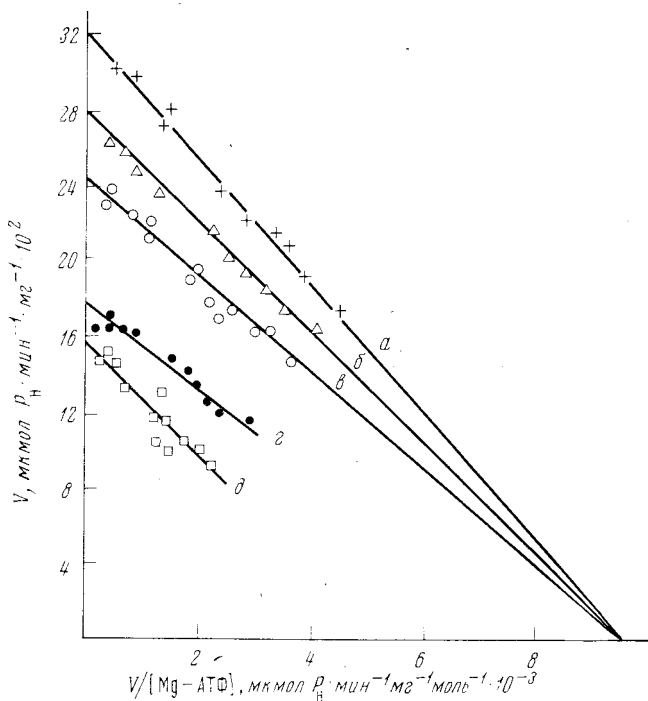


Рис. 2. Зависимости Эди — Хофсти для мембранной Ca^{2+} -АТФазы в интактных (а) и у.ф. облученных (б — д) эритроцитарных тканях. Облучение светом 282 нм, концентрация белка в образцах 0,07 мг/мл. Кривые соответствуют следующим дозам у.ф. облучения: б — $4,8 \cdot 10^5$; в — $9 \cdot 10^5$; г — $1,9 \cdot 10^6$; д — $2,28 \cdot 10^6$ эрг/см²

(табл. 1). Из табл. 1 видно, что σ немного выше при рН 8,1 чем 7,1 (в пределах оптимума активности). Однако величина σ_{10}/σ_{35} остается неизменной. Удаление какого-либо существенного для активности иона (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+) сопровождается изменением температурной зависимости. В отсутствие Na^+ σ_{10}/σ_{35} почти равно 1, а удаление Ca^{2+} приводит к обратному эффекту — σ_{10}/σ_{35} становится большим 1.

Итак, приведенные данные подтверждают предположение, что структурное состояние эритроцитарной мембраны оказывает влияние на конформацию и фоточувствительность связанной с ней Ca^{2+} -АТФазы. Более прямой аргумент для такого вывода получен из кинетических измерений Ca^{2+} -АТФазы после у.ф. облучения эритроцитарных тений. Вследствие однокваптового необратимого характера фотоинактивации, после облучения белковых молекул в растворе можно наблюдать только уменьшение скорости ферментативной реакции, по ее K_M , как это имеет место в случае некооперативного ингибирования. Однако ассоциированная с мембраной Ca^{2+} -АТФаза обнаруживает более сложное поведение. На рис. 2 изображены зависимости Эди-Хофсти для Ca^{2+} -АТФазы после облучения эритроцитарных тений различными дозами ультрафиолетового света. Для доз $4,8 \cdot 10^5$ и $9 \cdot 10^5$ эрг/см² сохраняется линейная зависимость с одной и той же точкой пересечения для облучения и контрольных образцов. K_M при этом постепенно уменьшается от 33 до 25 мкМ. При более высоких дозах линейность, однако, нарушается. В противоположность этому, для зависимости V от $V/[\text{Ca}^{2+}]$ линейность сохраняется для всех исследованных доз у.ф. света. Полученные прямые параллельны и дают величину константы диссоциации Ca^{2+} — $3,0 \cdot 10^6$ М (рис. 3).

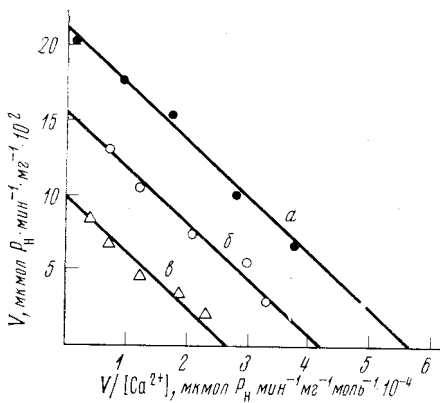


Рис. 3. Зависимость $V=f(V/[Ca^{2+}])$ для мембранной Ca^{2+} -АТФазы в intactных (а) и у.ф. облученных (б, в) эритроцитарных телях. Условия облучения и концентрация белка те же, что в рис. 2. Прямые соответствуют следующим дозам: б — $9 \cdot 10^5$; в — $2,28 \cdot 10^6$ эрг/см²

пением k_1 или увеличением k_{-1} . Наиболее вероятно, что после у.ф. облучения изменяется k_1 — константа скорости образования фермент — субстратного комплекса.

С другой стороны, взаимодействие фермента с Ca^{2+} , существенным для расщепления фермент — субстратного комплекса⁽⁸⁾, протекает после облучения с прежней эффективностью, что объясняется его значительно меньшими размерами по сравнению с АТФ и, следовательно, отсутствием жестких стерических требований.

Итак, полученные данные указывают на тесную зависимость структурных, биохимических и каталитических свойств Ca^{2+} -АТФазы от структурного состояния эритроцитарной мембраны.

Институт фотобиологии
Академии наук БССР
Минск

Институт биохимии
Майнского университета,
ФРГ

Поступило
7 VIII 1974

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ A. D. McLaren, A. Doering, G. Phillips, Biochim. et biophys. acta, v. 9, 597 (1952).
² R. B. Setlow, B. Doyle, ibid. v. 24, 27 (1957). ³ Ju. A. Vladimirov, D. I. Roshupkin, E. E. Fesenko, Photochem. Photobiol., v. 11, 227 (1970). ⁴ S. Risi, K. Dose et al., Photo-biol., v. 6, 423 (1967). ⁵ И. Д. Вологовский, Л. Г. Воскресенская, С. В. Конев, Молекулярная биология, т. 4, 395 (1970). ⁶ Е. А. Черницкий, С. В. Конев и др., ДАН, т. 207, № 4, 214 (1972). ⁷ С. В. Конев, И. М. Окунь и др., ДАН, т. 205, № 4, 979 (1972).
⁸ G. Zimmer, H. Schirmer, Biochim. et biophys. acta, v. 345, 314 (1974). ⁹ H. U. Wolf, ibid., v. 219, 521 (1970). ¹⁰ H. U. Wolf, Experientia, v. 29, 241 (1973). ¹¹ H. J. Morowitz, Science, v. 11, 229 (1950). ¹² А. Б. Пеленицын, Д. И. Роцункин, Ю. А. Владимиров, В сб.: Структурная лабильность мембран, Минск, 1974. ¹³ A. Arhold, H. U. Wolf, In: XI Biochemica Conferencia Iatinica, Salamanca, 1973. ¹⁴ H. U. Wolf, Biochim. et biophys. acta, v. 266, 361 (1972). ¹⁵ C. Frieden, J. Biol. Chem., v. 239, 3522 (1964).