

Н. Г. ГИММЕЛЬРЕЙХ

**О ВЗАИМОДЕЙСТВИИ Ca^{2+} -АТФазы САРКОЛЕММЫ
СКЕЛЕТНЫХ МЫШЦ С БЛОКАТОРАМИ КАЛЬЦИЕВЫХ ТОКОВ
ВОЗБУДИМЫХ МЕМБРАН**

(Представлено академиком П. Г. Костюком 3 III 1976)

Ранее установлено, что реакция гидролиза АТФ, осуществляемая Ca^{2+} -АТФазой сарколеммы скелетных мышц, может быть заторможена ионами марганца или кобальта и что в основе ингибиторного эффекта этих металлов лежит способность конкурентно угнетать взаимодействие фермента с субстратом (¹). Эти результаты, наряду с многочисленными литературными данными (²⁻⁴) об аналогичном влиянии ионов этих металлов на входящие кальциевые токи возбудимых мембран, послужили основанием для предположения, что Ca^{2+} -АТФаза чувствительна к тем же реагентам, что и кальциевые каналы, и, следовательно, между этими структурами существует определенное сходство.

Чтобы проверить выдвинутое предположение, нами проведены дальнейшие исследования характера взаимодействия Ca^{2+} -АТФазы с блокаторами кальциевых токов — марганцем, кобальтом и органическим соединением верапамилом. Была также исследована возможность функционирования фермента при замене в среде кальция стронцием и взаимодействие фермента с местными анестетиками. Дополнительные исследования по изучению влияния металлов-ингибиторов имели целью установить возможность взаимодействия этих агентов с активаторным центром фермента, центром связывания свободного кальция, наличие которого в ферменте установлено проведенными ранее исследованиями (⁵).

В экспериментах использовали препараты Ca^{2+} -АТФазы, полученные при фракционировании солевого экстракта сарколеммы сульфатом аммония (⁵). Скорость АТФазной реакции определяли как описано (⁵). Концентрацию свободного кальция рассчитывали, используя величину константы связывания АТФ и кальция 32 000 M^{-1} (⁶). В качестве источника верапамила использовали югославский препарат «Изоптин» (ЛЕК, Ljubljana). Все используемые металлы были в виде хлоридов.

Выделяемые нами ферментные препараты в присутствии кальция обладали АТФазной активностью, равной 100–150 мкмол. Р_n за час на 1 мг белка. Замена кальция эквимоллярными концентрациями марганца, кобальта или стронция приводила к снижению скорости гидролиза АТФ более чем на 90%. Изучение характера взаимодействия вышеперечисленных металлов с активаторным центром фермента проведено в условиях, когда начальная скорость ферментативной реакции зависела лишь от концентрации свободного кальция в среде. Установлено, что внесение марганца или кобальта в среду инкубации, содержащую кальций, приводит к однотипным изменениям в характере зависимости. На рис. 1 представлена зависимость скорости гидролиза АТФ от концентрации свободного кальция при насыщающем уровне Са-АТФ и изменение характера этой зависимости при внесении кобальта. Как видно, с повышением концентрации кобальта в среде скорость АТФазной реакции снижается; чем выше концентрация свободного кальция в среде, тем значительнее степень угнетения фермента при каждой исследуемой концентрации ингибитора. Надо пола-

гать, что снижение скорости реакции является следствием как конкурентного ингибирования кобальтом (или марганцем) взаимодействия субстратного центра фермента с Са-АТФ⁽¹⁾, так и истощения субстрата в связи с образованием комплекса Со-АТФ (или Мп-АТФ). Неодинаковый уровень скорости реакции при одной и той же концентрации ингибитора, по-видимому, обусловлен тем, что снижающийся уровень субстрата становится ненасыщающим при переходе фермента во все более активное состояние. Остался, однако, неясным вопрос о природе ингибитора, т. е. о том, является ли ингибитором ион металла или его комплекс с АТФ.

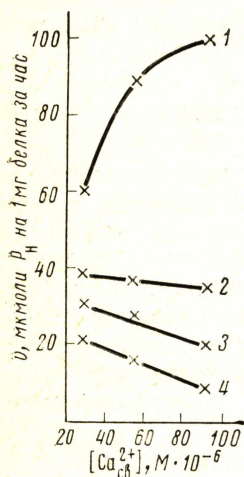


Рис. 1

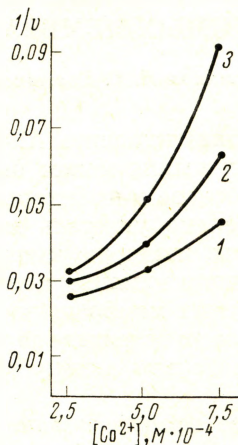


Рис. 2

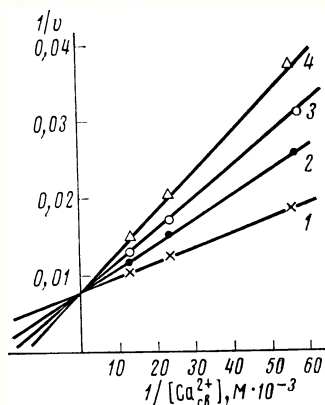


Рис. 3

Рис. 1. Влияние кобальта на скорость (v) АТФазной реакции. 1 — в среде без CoCl_2 , 2 — $2,5 \cdot 10^{-4}$ М CoCl_2 , 3 — $5,0 \cdot 10^{-4}$ М CoCl_2 , 4 — $7,5 \cdot 10^{-4}$ М CoCl_2

Рис. 2. Зависимость скорости АТФазной реакции от концентрации кобальта в координатах Диксона. 1, 2 и 3 соответствует концентрациям свободного кальция 28 мкМ, 54 и 92 мкМ

Рис. 3. Зависимость скорости АТФазной реакции от концентрации верапамила в графике Лайнуивера — Берка. 1 — в среде без верапамила, 2 — $1,25 \cdot 10^{-4}$ М верапамил, 3 — $2,5 \cdot 10^{-4}$ М верапамил, 4 — $5,0 \cdot 10^{-4}$ М верапамил

С целью его выяснения зависимость скорости реакции от концентрации ингибитора при указанных выше условиях описана в координатах Диксона. Как видно из рис. 2, исследуемая зависимость в координатах Диксона носит нелинейный характер, который является типичным именно для случаев, когда речь идет об ингибиторе, не реагирующем непосредственно с ферментом, но образующем комплекс с субстратом, обладающий способностью тормозить ферментативную реакцию⁽⁷⁾.

Таким образом, на основании приведенных данных можно считать, что ингибирование Ca^{2+} -АТФазы ионами марганца и кобальта обусловлено конкурентными взаимоотношениями между субстратом фермента и комплексами этих металлов с АТФ, а не свободными ионами металлов. Непосредственного взаимодействия ионов этих металлов с молекулой фермента, в частности с активаторным центром фермента, не происходит.

Совершенно отличный эффект оказывает стронций. Хотя активирующее влияние стронция в отсутствие кальция в среде так же слабо выражено, как и марганца и кобальта, в присутствии кальция стронций не изменяет скорости гидролиза АТФ. Эти результаты дают основание полагать, что фермент может подвергаться гидролизу не только комплекс кальция с АТФ, но и комплекс стронция с АТФ; отсутствие же активирующего влияния одного стронция свидетельствует о неспособности этого металла взаимодействовать с активаторным центром фермента. По-види-

мому, кальций является единственным катионом, способным обеспечивать переход фермента в активную конформацию.

Как указывалось ранее, в роли блокаторов кальциевых токов выступают не только ионы металлов, но и органическое соединение верапамила⁽⁸⁾. Нами исследован характер взаимодействия этого вещества с субстратным и активаторным центрами Ca^{2+} -АТФазы. В результате проведенных экспериментов установлено, что верапамил не оказывает влияния на зависимость скорости реакции от концентрации субстрата, но является эффективным ингибитором взаимодействия фермента со свободным кальцием. Был проведен кинетический анализ ингибитора действия верапамила в графике Лайнуивера — Берка. Как видно из рис. 3, верапамил конкурентно угнетает взаимодействие Ca^{2+} -АТФазы с металлом-активатором. Приведенные результаты свидетельствуют о том, что верапамил, в отличие от ионов металлов, взаимодействует непосредственно с молекулой фермента, препятствуя образованию активного комплекса кальций — фермент, и, следовательно, действие верапамила на АТФазу сарколеммы можно рассматривать как более специфичное, чем действие металлов-ингибиторов.

Исследование взаимодействия Ca^{2+} -АТФазы сарколеммы с местными анестетиками предпринято нами в связи с имеющимися в литературе данными о способности местных анестетиков конкурентно замещать кальций, связанный с сарколеммой⁽⁹⁾, и о способности АТФ в присутствии кальция предотвращать ингибирующее влияние прокаина на натриевую проводимость⁽¹⁰⁾, что также давало основание предполагать конкуренцию между Са-АТФ и местными анестетиками. Исследования влияния на Ca^{2+} -АТФазу новокаина, дикаина и совкаина в концентрациях 10^{-4} – 10^{-3} М показали, что добавление местных анестетиков непосредственно в среду инкубации, так же как и преинкубация фермента с этими агентами в течение различного времени, не приводят к изменению зависимости скорости реакции от концентрации субстрата и активатора. Вероятно, кальций, вытесняемый из сарколеммы анестетиками, менее специфично связан с мембраной, чем кальций в активаторном центре Ca^{2+} -АТФазы. Эти результаты также позволяют провести аналогию между Ca^{2+} -АТФазой и кальциевыми каналами. Последние, по данным Хагивары и Накаджимы⁽¹¹⁾, не реагируют, как и Ca^{2+} -АТФаза сарколеммы, на присутствие местных анестетиков.

Совокупность изложенных данных свидетельствует о том, что Ca^{2+} -АТФаза сарколеммы скелетных мышц действительно обладает той же чувствительностью к ряду агентов, что и кальциевые каналы возбудимых мембран. Можно думать, что в структуре кальциевых каналов и в молекуле Ca^{2+} -АТФазы рецепторные группы, ответственные за взаимодействие с ионами кальция, обладают сходной химической структурой.

Институт биохимии им. А. В. Палладина
Академии наук УССР
Киев

Поступило
24 II 1976

ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Н. Г. Гиммельрейх, Биохимия, т. 40, 1047 (1975). ² P. F. Baker, H. Meves, E. B. Ridgway, J. Physiol., v. 231, 511 (1973). ³ D. J. Chiarandini, E. Stefani, J. Physiol., v. 232, 129 (1973). ⁴ M. Kolhardt, B. Bauer et al., Pflügers Arch., v. 338, 115 (1973). ⁵ Н. Г. Гиммельрейх, Л. Г. Кравец, Биохимия, т. 41, 661 (1976). ⁶ W. J. O'Sullivan, D. D. Perrin, Biochemistry, v. 3, 18 (1964). ⁷ Л. Уэбб, Ингибиторы ферментов и метаболизма, М., «Мир», 1966. ⁸ M. Kolhardt, A. Herdey, M. Kübler, Pflügers Arch., v. 344, 149 (1973). ⁹ V. M. C. Madeira, A. P. Carvalho, Biochim. et biophys. acta, v. 266, 670 (1972). ¹⁰ A. S. Kuperman, M. Okamoto et al., Science, v. 144, 1222 (1964). ¹¹ S. Hagiwara, Sh. Nakajima, J. Gen. Physiol., v. 49, 793 (1966).