

УДК 577.15:612.452.018

БИОХИМИЯ

В. И. КУЛИНСКИЙ, Л. С. КОЛЕСНИЧЕНКО

ОТРИЦАТЕЛЬНАЯ КООПЕРАТИВНОСТЬ В БИОХИМИЧЕСКИХ ЭФФЕКТАХ КАТЕХОЛАМИНОВ И ЦИКЛИЧЕСКОГО 3', 5'-АМФ

(Представлено академиком Е. М. Крепсом 9 II 1976)

В последнее время накапливается все больше данных о том, что рецепторы специализированных веществ-регуляторов обладают аллостерическими свойствами (¹⁻³). Однако кривые доза — эффект для катехоламинов (КА) по-прежнему анализируются на основе гиперболической модели Кларка — Ариенса, идентичной уравнению Михаэлиса — Ментен для неаллостерических ферментов (^{3, 4}). Лишь в немногих работах показано, что взаимодействие КА с рецепторами иногда лучше описывается при подстановке квадрата концентрации (⁴). Фактически это означает переход на типичное для аллостерических белков уравнение Хилла с коэффициентом $n_H=2$ (положительная кооперативность, п.к.). Естественно предположить существование и отрицательной кооперативности (о.к.) ($n_H<1$), однако эта возможность для КА и 3',5'-АМФ не рассматривалась. В настоящей работе методы кинетики аллостерических ферментов применены к анализу стимулирующего эффекта КА и 3',5'-АМФ на дисульфидредуктазную активность (ДСР). Основной результат доложен на конгрессе Федерации европейских биохимических обществ (⁵).

Опыты проведены на 100 мышах линии СВА, самках 2—5 мес. Регуляторы инкубировали с ферментным препаратом (18 000 g — надосадочной фракцией печени) 10 мин. при 30°. ДСР определяли по (⁶). Данные трансформировали по формулам Лайнуивера — Бэрка и Хилла, рассчитывали R_s и n_H (⁷). Для каждой из регрессий при помощи дисперсионного анализа определяли величину и значимость линейного компонента и отклонений от линейности (⁸).

В координатах Лайнуивера данные выражаются линиями с заметной кривизной. В отличие от этого, в координатах Хилла все линии становятся прямыми (рис. 1). Количественно это выражается в росте силы влияния линейного компонента регрессии в 1,7—2,5 раза (до 44—68%) при снижении $R_{\text{лин}}$ в 5—10 раз (для всех прямых $P<0,0005$, только для адреналина $P<0,01$); отклонения от линейности всегда были далеки от значимости ($P>0,1-0,5$). Другим доказательством преимущества уравнения Хилла для описания активации ДСР является более точное соответствие рассчитанных по нему величин $[A]_{0,5}$ значениям, наблюдавшимся экспериментально (табл. 1): среднее расхождение составляло всего 2,20%. Лучшее соответствие данных уравнению Хилла показывает, что регулярные белки в системе ДСР являются олигомерами.

Другой важный момент — это четкое разделение активаторов ДСР на 2 группы (табл. 1). Для первой (3',5'-АМФ и КА) характерны кривые с выпуклостью к оси ординат на графике Лайнуивера, значения R_s в диапазоне 10^2-10^4 и $n_H<1$, все это свидетельствует о гетеротропной о.к. Для 2-й группы (протамин и ЭДТА) обнаружена п.к.: выпуклость кривых в реципроках к оси абсцисс, $R_s=6-8$ и $n_H>1$. Значения $[A]_{0,5}$, рассчитанные по Лайнуиверу, при о.к. обычно занижены (тем больше, чем меньше n_H), при выраженной п.к. — отрицательны.

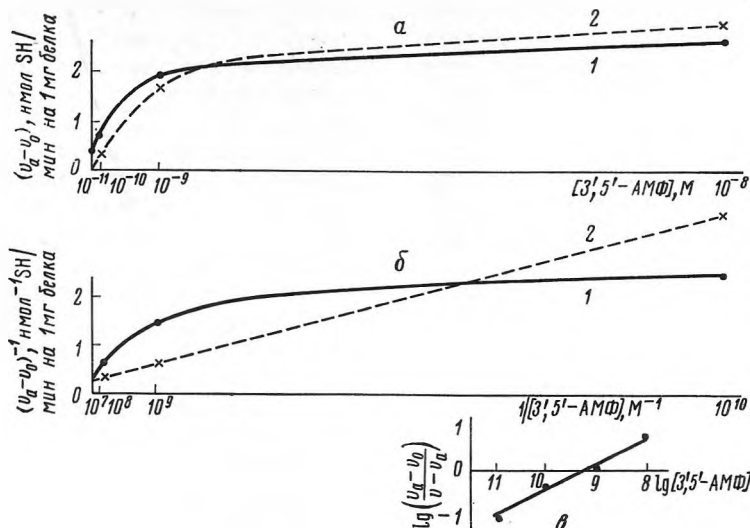


Рис. 1. Зависимость активации дисульфидредуктазной активности от концентрации 3',5'-АМФ. а — в координатах $(v_a - v_0) / (v_a - v_0)_{\max}$; б — в координатах $1/(v_a - v_0) \div +1/[3',5'-\text{АМФ}]$; в — в координатах Хилла $\lg \left(\frac{v_a - v_0}{V - v_0} \right) \div \lg [3',5'-\text{АМФ}]$, V — максимальная скорость (нмол/мин на 1 мг белка), v_0 — скорость реакции без 3',5'-АМФ, v_a — скорость в присутствии 3',5'-АМФ. 1 — экспериментальные данные, 2 — рассчитанные по уравнениям Михаэлиса и Лайнуивера; экспериментальные данные на рис. 1в показаны точками

П.к. хорошо известна. Она обеспечивает крутое нарастание ответа на обычные для внутриклеточных аллостерических эффекторов относительно малые изменения концентраций (⁷). В отличие от этого, концентрация в крови КА (типичных межклеточных регуляторов) может изменяться на 3—4 порядка (⁸). Именно этому идеально соответствует о.к., сущность которой заключается в том, что присоединение первой молекулы вещества

Таблица 1

Характеристика аллостеричности дисульфидредуктазной системы по отношению к регуляторам

Показатель	3',5'-АМФ	Адреналин	Мезатон (фенилэфрин)	Норадреналин	Протамин	ЭДТА
R_s	5000	200	270	130	8,0	6,0
$n_H + S_{\Delta n_H}$	$0,56 \pm 0,026$	$0,80 \pm 0,11$	$0,71 \pm 0,11$	$0,88 \pm 0,04$	$2,33 \pm 0,21$	$2,45 \pm 0,21$
Отличие от $n_H=1$, p	$\ll 0,001$	$< 0,1$	$< 0,05$	$< 0,01$	$\ll 0,001$	$\ll 0,001$
Отличие (%) экспериментальных значений $[A]_{0,5}$ от рассчитанных по уравнениям Лайнуивера	-99,7	-81	-71	+20		
Хилла	+20	-27	-5	-9	+2,1	+5,4

Примечание. Значение $[A]_{0,5}$ определяли: а) экспериментально — по графику $(v_a - v_0) \div [A]$, б) по уравнению Лайнуивера — как b/a , в) по уравнению Хилла — как $\text{anti lg} (-a/b)$, где a и b — коэффициенты соответствующих регрессий.

к белку снижает связывание последующих молекул (⁷). Обычно о.к. интерпретируют только как механизм снижения чувствительности к регуляторам (⁷), не обращая достаточного внимания на то, что в области малых концентраций ($[A] < [A]_{0,5}$) она обеспечивает не меньший, а больший эффект по сравнению с гиперболой Михаэлиса (рис. 1). Мы полагаем, что биологическое значение о.к. для специализированных регуляторов заключается в обеспечении очень широкого диапазона регуляций: высокой чувствительности к самым малым концентрациям и все более пологого, но сохраняющегося прироста эффекта при переходе к очень высоким кон-

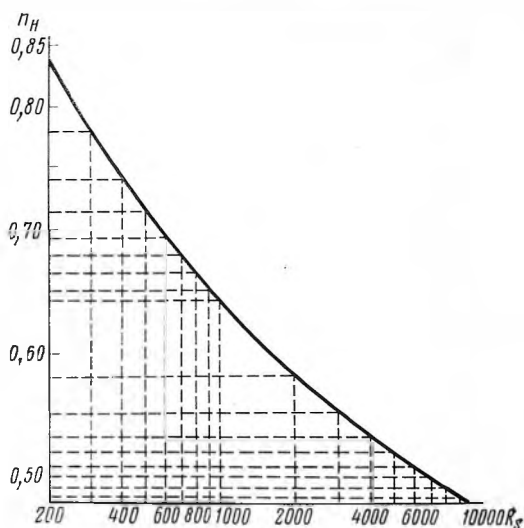


Рис. 2. Номограмма для ориентировочного определения n_H при отрицательной кооперативности. По оси абсцисс $R_s = [S]_{0,9}/[S]_{0,1}$ или $[A]_{0,9}/[A]_{0,1}$, по оси ординат n_H , где $[S]$ — концентрация субстрата, $[A]$ — концентрация активатора

в данных о влиянии КА на липолиз (¹¹) и на активность аденилциклазы в жировой ткани (¹¹), сердце (¹²) и мозге (¹³), а также о влиянии 3',5'-АМФ на протеинкиназу сердца (¹⁴). Вполне вероятно, что и в наших опытах о.к. характерна не для самой ДСР, а для системы ее регуляции.

Простым приемом ориентировочной оценки о.к. является расчет по формуле $n_H = \lg 81 / \lg R_s$ или использование основанной на ней номограммы (рис. 2). При этом R_s можно определить и по графику $v \div \lg [A]$. На нашем материале для 8 активаторов ДСР ориентировочная и точная оценки n_H удовлетворительно совпадали: $\Delta n_H \pm S_{\Delta n_H} = 0,09 \pm 0,04$; $r_s = +0,98$, $P < 0,05$. Для указанных данных литературы (¹¹⁻¹⁴) по нашей номограмме $n_H = 0,45-0,88$.

Правда, для многих физиологических реакций на ацетилхолин (^{1, 2}) и КА (⁴) $n_H \geq 1$. Это может быть связано и с использованием относительно узкого диапазона концентраций (1-2 порядка).

В общем виде показатель степени при концентрации регулятора является переменным. Это убеждает в необходимости анализировать кривые доза — эффект для веществ-регуляторов на основе кинетики аллостерических ферментов.

центрациям (рис. 1). Это приводит к плавной градуальности ответа, столь характерной, например, для симпатико-адреналовой системы.

Необходимо отметить, что традиционное логарифмическое преобразование концентраций регулятора, которое очень удобно на практике (все результаты легко представимы на компактном графике), по сути является произвольным (⁹). Именно это преобразование приводит к появлению кажущейся гиперболичности или даже сигмобразности. В результате появились ошибочные утверждения, что сигмобразная кинетика характерна не только для п.к., но и для о.к. (¹⁰).

Анализ литературного материала показывает, что о.к. достаточно характерна для биохимических эффектов КА и 3',5'-АМФ. Так, она выявлена нами

- ¹ Н. В. Хромов-Борисов, ДАН, т. 177, № 1, 214 (1967). ² Th. R. Podlesky, J. P. Changeux, In: Fundamental Concepts in Drug Receptor Interactions, N. Y., 1970, p. 93.
- ³ И. В. Комиссаров, Элементы теории рецепторов в молекулярной фармакологии, М., 1969.
- ⁴ Б. Н. Манушин, Физиология адренорецепторов, М., 1968.
- ⁵ V. I. Kulinsky, L. S. Kolesnichenko, V. V. Ivanov, X Meeting FEBS, Abstracts, Paris, 1975.
- ⁶ В. И. Кулинский, В. В. Иванов, ДАН, т. 213, № 6, 1439 (1973).
- ⁷ D. E. Koshland, Current Topics in Cell Regulation, v. 1, N. Y., 1969.
- ⁸ В. И. Кулинский, Л. С. Колесниченко, Биохимия, т. 41, № 2, 276 (1976).
- ⁹ В. И. Кулинский, Пробл. эндокринол., т. 14, № 2, 115 (1968).
- ¹⁰ Э. Хофманн, В кн.: Структура и функция активных центров ферментов, М., 1974, стр. 70.
- ¹¹ J. C. Khoo, D. Steinberg et al., J. Biol. Chem., v. 248, 11, 3823 (1973).
- ¹² S. E. Mayer, J. Pharmacol. Exp. Therap., v. 181, 1, 116 (1972).
- ¹³ P. Greengard, J. A. Nathanson, J. V. Kebabian, Frontiers in Catecholamine Research, N. Y., 1973, p. 377.
- ¹⁴ M. A. Brostrom, E. M. Reimann et al., Adv. Enzyme Regulat., v. 8, 191 (1970).