

УДК 577.175.522.882

СВОЙСТВА ЭНДОГЕННОГО ФАКТОРА,
РЕГУЛИРУЮЩЕГО АКТИВНОСТЬ Na^+ , K^+ -АТФазы

ЕРОХОВ П. А.

Институт биологии развития им. Н. К. Кольцова АН РА

Хроматографией на фенол-сефарозе проведена частичная очистка регуляторного фактора, выделяемого в инкубационную среду, семьявносящими протоками крысы. При дальнейшей очистке изофокусировкой в диапазоне ИЭТ 4—7 обнаружены две активные фракции (5,1 и 5,9), незначительно влияющие на активность Na^+ , K^+ -АТФазы, но их смесь активирует ее также, как исходная инкубационная среда. При действии смесей этих фракций в разных соотношениях на Na^+ , K^+ -АТФазу обнаружен максимум активации при определенном соотношении фракций. Полученные результаты позволяют предположить, что регуляторный фактор состоит из двух белков.

Ранее было установлено, что активация или торможение постсинаптических адренорецепторов вызывает выделение из эффекторной клетки веществ (регуляторный фактор), которые тормозят или активируют скорость накопления норадреналина в адренергическом нейроне, изменяя скорость его синтеза или нейронального захвата [1]. Эти данные показывают возможность локальной обратной трансинаптической регуляции активности адренергического нейрона в соответствии с функциональным состоянием эффекторной клетки. Ранее было показано, что эти вещества имеют белковую природу и регулируют процесс захвата норадреналина через изменение активности Na^+ , K^+ -АТФазы [2]. Целью настоящей работы является дальнейшее изучение химической природы этих регуляторов и механизма их взаимодействия с Na^+ , K^+ -АТФазой.

Материалы и методы

Работа выполнена на взрослых крысах линии *Wistar* массой 180—250 г.

Раствор А содержал (в мМ): NaCl —150, KCl —50, MgCl —2 и трис- HCl —50, pH 7,68; раствор В— KCl —200 и трис- HCl —50 («Uitrol», «Calbiochem», США), соли для спектрального анализа—отечественного производства квалификации ос.ч.

Для получения фактора фармакологическим воздействием в течение 1 ч проводили инкубацию изолированных органов (семьявно-

сящие протоки или матки) в растворе А с добавлением 5 мкМ фен-толамина или пропранолола.

Для ультрафильтрации белковых растворов использовали ячейку ФМ-001 и фильтры фирмы «Millipore» (США) с M_r исключения 10 кД. Ультрафильтрацию проводили при температуре 4° под давлением азота 4 кгс/см.

Препарат Na^+ , K^+ -АТФазы получали экстракцией 6 М NaCl из синапсом мозга крыс [2].

Активность Na^+ , K^+ -АТФазы измеряли по образованию неорганического фосфата по методу Lowry, Lopes [3].

Для определения величины M_r белков использовали электрофорез в ПААГ, содержащем ДДС-Na—ДДС [4].

Аналитическую фокусировку проводили в ПААГ, содержащем (в %): акриламид—4, метилен-бисакриламид—0,0012, манит—10, амфолины—2. Толщина геля составляла 0,5 мм. В качестве электродных растворов использовали 0,05 NH_3PO_4 и 0,05 N КОН. Для ИЭФ в широком диапазоне рН использовали 2% амфолинов, рН 3,5—10, в диапазоне рН 4—7 смесь амфолинов следующего состава: 1 часть рН 3,5—10, 4 части рН 4—6, 4 части рН 5—7.

Для ИЭФ белков в микропрепаративных количествах использовали гранулированный гель сефадекс G-50 («Pharmacia Fine Chemicals», Швеция). ИЭФ проводили при 4° в режиме стабилизации мощностью 6 Вт на пластинку 9×12 см (напряжение в начале 250 В в конце 1200 В). Состав амфолинов был тот же, что и в случае аналитической фокусировки. После окончания фокусирования гель собирали шпателем полосками по 5 мм в пробирки и элюировали белки 2 мл 50 мМ трис-HCl буфера, рН 7,6.

Результаты исследования

Инкубационную среду центрифугировали для отделения от клеток и наносили на колонку с фенил-сефарозой CL-6B объемом 15 мл. Колонку промывали раствором В до снижения оптической плотности E^{280} до исходного уровня. Белки элюировали понижающимся линейным градиентом ионной силы. Для построения градиента применяли «Ultragrad» (LKB, Швеция), раствор высокой ионной силы (раствор В), раствор низкой ионной силы (дистиллированная вода). Профиль элюции белков с колонки с фенил-сефарозой CL 6B показан на рис. 1. В дальнейшем проводили выделение фракции, содержащей регуляторный фактор, на фенил-сефарозе CL 6B, используя ступенчатый градиент ионной силы, что позволило сократить время хроматографии и получить более концентрированные фракции. Отмывали колонку от несвязавшихся белков раствором В и элюировали активную фракцию, используя раствор В/вода (1:9).

Для оценки эффективности очистки фактора на фенил-сефарозе CL 6B отдельные фракции, элюируемые с колонки, были сконцент-

рированы ультрафильтрацией. В них в исходной инкубационной среде и в среде, прошедшей через фенил-сефарозу, измеряли белок по Lowry [3] (табл. 1).

Таблица 1

Распределение белка и активности регуляторного фактора по фракциях, полученных при хроматографии инкубационной среды на фенил-сефарозе CL-6B

Элюент	Количество белка (мМ)	Активность Na^+ , K^+ -АТФазы в процентах к контролю
Несорбированный белок	4205 ± 673	98
250 мМ КСl	2060 ± 215	100
30 мМ КСl	1.6 ± 1.2	154
Дистиллированная вода	564 ± 93	96
1 %-ный раствор тритон X-100	1272 ± 230	78

Примечание. В таблице приведена реальная ионная сила, определенная во фракциях кондуктометрическим методом.

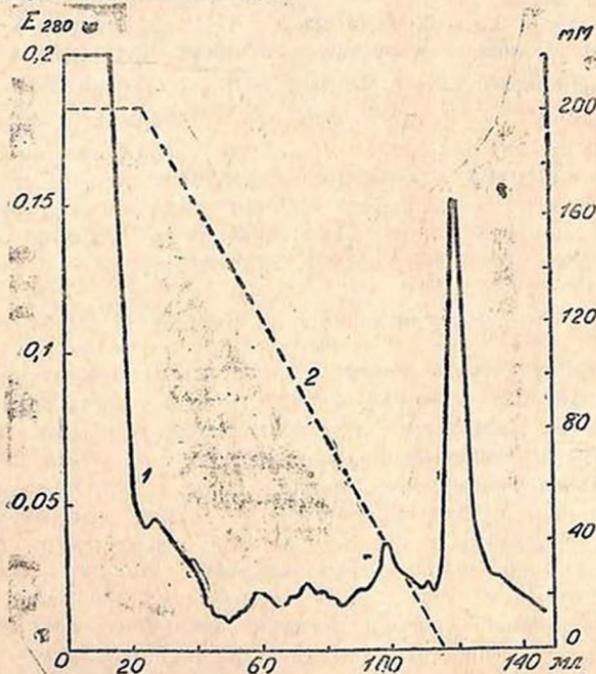


Рис. 1. Элюция белков инкубационной среды с фенил-сефарозы линейным градиентом ионной силы от 200 мМ КСl до 0. 1—поглощение при 280 нМ, 2—ионная сила

Фракция, содержащая регуляторный фактор, составляет 1/2000 от общего белка, выделившегося в инкубационную среду, и коли-

чество белка в ней является наименее стабильным по отношению к другим пикам, элюируемым с фенол-сефарозы CL 6B.

Для проведения ИЭФ (диапазон ИЭТ 3,5—10) среду, содержащую фактор, концентрировали ультрафильтрацией. Исходный объем был доведен до 0,5 мл, и 50 мкл были нанесены на ПААГ-пластинку толщиной 1 мм, содержащую амфолины. После окончания фокусирования дорожку с образцом 50 мкл вырезали, разрезали на

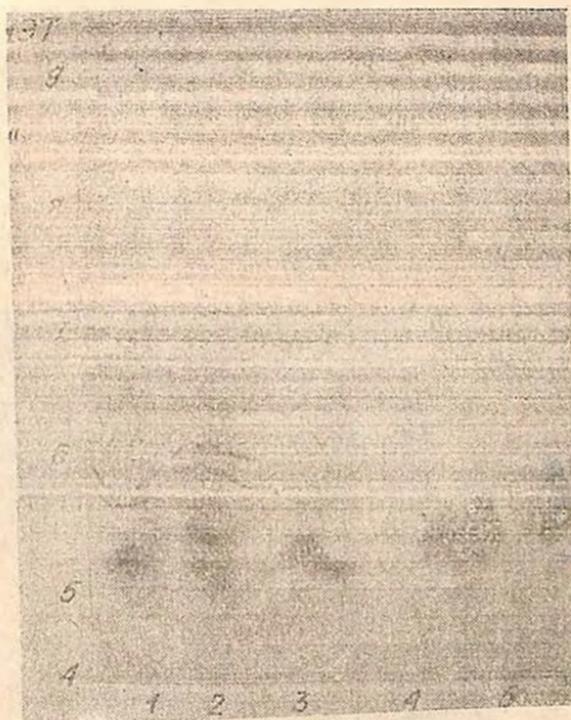


Рис. 2. ИЭФ фракций белков инкубационной среды, содержащей регуляторный фактор, полученных на фенол-сефарозе: 1—исходная среда; 2—белки, не связавшиеся с фенол-сефарозой; 3—фракция, элюируемая при 20 мМ КСl, 4—фракция, элюируемая водой, 5—фракция, элюируемая 1 %-ным раствором тритона X-100

кусочки по 5 мм вдоль градиента рН и элюировали 1 мл трис-НСl буфера, рН 7,2, 50 мМ, при 4°. Параллельно так же обрабатывали пустую дорожку, но элюцию проводили дистиллированной водой для определения рН. Остальной гель окрашивали Кумасси R-250 (рис. 2). Элюаты тестировали по способности изменять активность Na^+ , K^+ -АТРазы. Для этого их разводили раствором А в 10 раз и дальше работали так же, как с инкубационной средой.

Как видно из табл. 2, вся активность заключена в интервале рН 5—6, там же сосредоточена основная масса белка.—

Исходно была проведена аналитическая фокусировка в интервале рН 4—7, причем параллельно были нанесены белки и других фракций, получаемых при хроматографии белков инкубационной

Таблица 2

Тестирование фракций ИЭФ (диапазон ИЭТ 4—9)
по активности Na^+ , K^+ -АТФазы в U 10-3

рН	4,0	5,0	6,0	6,5	7,0	7,5	8,0	8,5	9,0	Контроль
Активность	2,0	1,8	3,3	2,0	1,8	1,5	1,5	1,5	2,0	2,0

среды на фенил-сефарозе CL 6B (рис. 3, а). Активная фракция, получаемая с фенил-сефарозы, содержит большое количество бендов, перекрывающих весь интересующий диапазон рН. Однако ДДС-форез этих образцов демонстрирует относительно небольшое коли-

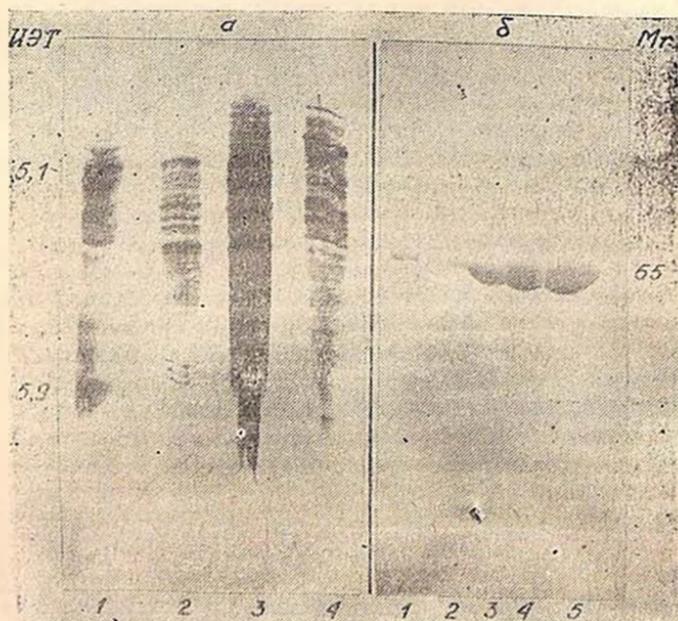


Рис. 3. ИЭФ (а) и ДДС-форез (б) фракций белков инкубационной среды, содержащей регуляторный фактор, полученных на фенил-сефарозе: 1 а и 3 б—фракция, элюируемая при 20 мМ КСl; 2а, 4 б—фракция, элюируемая водой; 3 а и 5 б—фракция, элюируемая 1%-ным раствором тритона X-100; 4 а и 2 б—белки, не связавшиеся с фенил-сефарозой; 1 б—исходная среда

чество белков, причем один мажор в области 65 кД (рис. 3, б). Этот мажорный белок присутствует практически во всех фракциях, получаемых с фенил-сефарозы CL 6B, и по M_r соответствует сыво-

Таблица 3

Действие фракций фактора, регулирующего активность Na^+ , K^+ -АТФазы, полученных ИЭФ, на активность Na^+ , K^+ -АТФазы

pH фракции	5,9	5,1	5,9:5,1 1:1
Активность Na^+ , K^+ -АТФазы по отношению к контролю	$1,12 \pm 0,18$	$0,83 \pm 0,36$	$1,63 \pm 0,07$

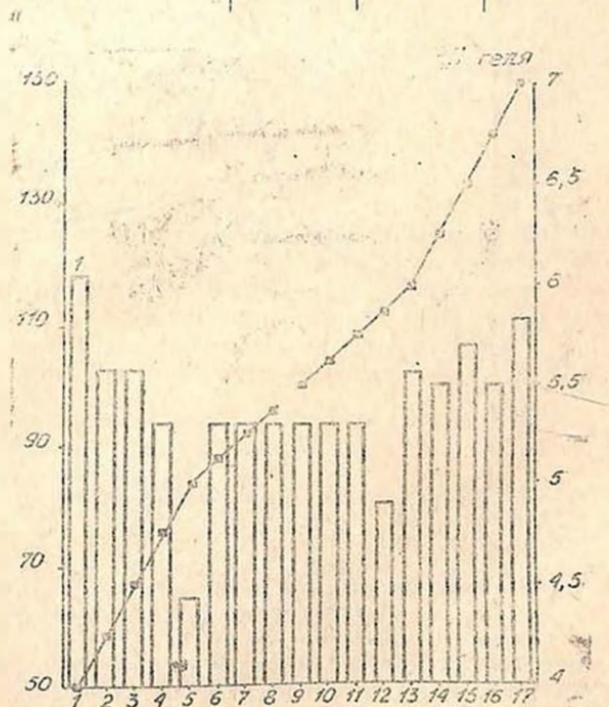


Рис. 4. Распределение активности регуляторного фактора при ИЭФ в диапазоне pH 4—7. По оси абсцисс—номера фракций. Здесь и на рис. 5 по оси ординат—относительная активность Na^+ , K^+ -АТФазы в % к контролю

роточному альбумину крысы. Препаративное разделение фракции, содержащей регуляторный фактор, полученной на фенил-сефарозе CL 6B, осуществляли в гранулированном геле, сефадексе G-50. После окончания ИЭФ гель разделяли на фракции вдоль градиента pH с

интервалом 5 мм, из которых элюировали белок раствором А и проверяли их действие на Na^+ , K^+ -АТФазу. Градиент рН был построен так, что в интервале от 5 до 6 на 5 мм геля приходилась 0,1 единица рН. Результаты тестирования представлены на рис. 4. Фракции с ИЭТ 5,1 и 5,9 не вызывают статистически достоверного изменения активности Na^+ , K^+ -АТФазы, но приводят к значительному разбросу активности фермента в параллельных пробах. Однако при смешивании их друг с другом (в соотношении 1:1 по объему) происходит активирование Na^+ , K^+ -АТФазы (табл. 3). Соседние фракции таким свойством не обладали. Фракции с ИЭТ 5,1 и 5,9 были смешаны в различных соотношениях таким образом, что концентрация одной фракции линейно нарастала, а другой—

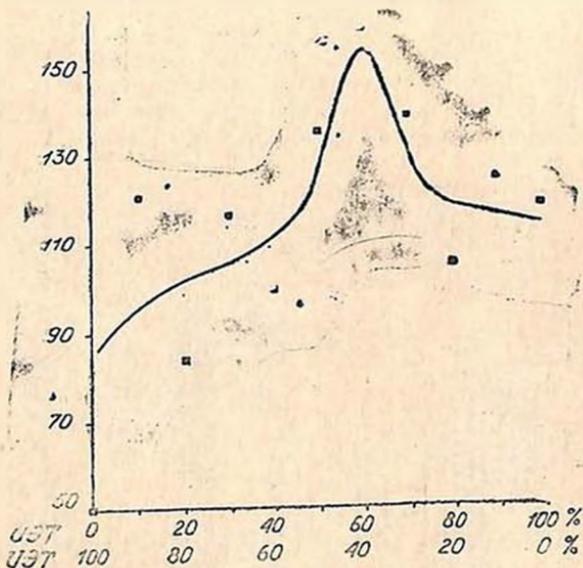


Рис. 5. Зависимость активности Na^+ , K^+ -АТФазы от соотношения компонентов фактора

уменьшалась от пробы к пробе. Полученными смесями действовали на Na^+ , K^+ -АТФазу. Результаты представлены на рис. 5, откуда хорошо видно, что активация Na^+ , K^+ -АТФазы происходит в весьма узком интервале соотношений компонентов фактора, причем имеется ярко выраженный максимум.

Результаты и обсуждение

Регуляторный фактор обеспечивает определенный уровень поступления катехоламинов к клетке за счет отрицательной обратной связи: при действии адrenoблокаторов активирует нейрональный захват катехоламинов и тирозина, при действии адrenomиметиков—ингиби-

руст. Очевидно, что физиологическим является только один из наклонных участков этой кривой (рис. 5), однако сейчас невозможно сказать, который из них является физиологическим.

Высокая молекулярная масса между 25 и 100 кД [5] и ИЭТ двух фракций регуляторного фактора указывают на его белковую природу. Можно предположить, что регуляторный фактор является системой из двух ферментов, регулирующих активность Na^+ , K^+ -АТРазы, и через это уровень нейронального захвата норадреналина и тирозина [6]. Судя по характеру зависимости активности Na^+ , K^+ -АТРазы от соотношения фракций фактора наиболее вероятным механизмом действия регуляторного фактора является изменение вязкости мембраны.

PROPERTIES OF ENDOGENIC FACTOR REGULATING THE ACTIVITY OF Na^+ , K^+ -ATPase

EROCHOV P. A.

N. K. Koltzov Institute of Developmental Biology, Moscow

Partial purification of regulatory factor from incubation media was done by phenyl-sepharose chromatography. At further purification of the active fraction by IEF in the range pH 4—7 there were demonstrated two fractions with pI 5.1 and 5.9. These two fractions change of Na^+ , K^+ -ATPase activity on ratio of fractions activity in mixtures was studied. The results obtained suggest that the regulation factor consists at least of two proteins.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Манухин Б. Н., Волина Е. В. Физиол. журн. СССР, т. 64, № 10, с. 1406—1413, 1978.
2. Nakao T., Nakao M., Nagai F., Fujihira Y., Hara Y., Fujita M. J. Biochem. Biophys. Res. Commun., v. 19, p. 755, 1965.
3. Lowry O. H., Lopez J. J. Biol. Chem., v. 162, p. 421, 1941.
4. Laemmli U. K. Nature, v. 227, p. 680—685, 1970.
5. Ерохов П. А. Тезисы докл. Всесоюзной конференции «Механизмы действия медиаторов и гормонов на эффекторные клетки», Суздаль, 1989.
6. Ерохов П. А., Волина Е. В. Физиол. журн. СССР, т. 74, № 4, с. 586—588, 1988.

Поступила 18. XII. 1991