

Na⁺, K⁺-АТРаза КАК КООПЕРАТИВНАЯ СИСТЕМА

ЩЕГЛОВА М. В., САЗОНТОВА Т. Г., БОЛДЫРЕВ А. А.

НИИ по биологическим испытаниям химических соединений, Кулава;
МГУ им. М. В. Ломоносова, Москва

Проанализирована кинетическая кооперативность, проявляемая Na⁺, K⁺-АТРазой из мембранных препаратов мозга быка и сердца собаки. Гидролиз АТР и СТР обоими препаратами протекает кооперативно. Можно предположить, что минимальное число взаимодействующих между собою гидролитических центров равно 4 (мозг быка) или 2 (сердце собаки). АТР и СТР обеспечивают дополнительную активацию в области концентраций субстрата выше 100 мкМ, выявляя вторую K_m. Другие субстраты гидролизуются ферментом некооперативно в соответствии с кинетикой Михаэлиса-Ментен.

При ингибировании убитым фермента из сердца выявляются взаимодействия, по крайней мере, двух центров связывания лиганда. Другие ингибиторы Na⁺, K⁺-АТРазы—Zn²⁺ и Ca²⁺—взаимодействуют с ферментом некооперативно. Сделан вывод, что проявляемая ферментом кооперативность по ряду эффикторов свидетельствует о взаимодействии протомеров в олигомерном комплексе Na⁺, K⁺-АТРазы.

Na⁺, K⁺-АТРаза (КФ 3.6.1.3)—интегральный белок плазматических мембран, функционирование которого обеспечивает создание и поддержание электрохимического градиента Na⁺ (направленного внутрь клетки) и K⁺ (направленного во внешнюю среду). Вследствие важности ма (в частности, таких его проявлений, как возбудимость, легкость межклеточных взаимодействий, водно-солевой обмен) свойства Na⁺, K⁺-АТРазы активно исследуются [1]. При этом кинетическому изучению подвергаются препараты фермента из почек, электрического ор-содержание Na⁺, K⁺-АТРазы, позволяющее очистить ее до гомогенно-нарушение нативных взаимодействий в белково-липидном комплексе фермента, происходящее при его очистке и реконструкции. Оно может являться причиной разных недоразумений. Так, например, хотя в натив-ных мембранах Na⁺, K⁺-АТРаза представляет собой олигомерный ком-плекс из 2 или 4 протомеров [3], ее кинетический анализ из многих объектов не обнаруживает взаимодействия этих протомеров в процес-се функционирования [4—6]. В работе были исследованы свойства мембранных препаратов Na⁺, K⁺-АТРазы из мозга быка и сердца со-

баки и обнаружена кинетическая кооперативность по АТР, СТР и уа-
банну. Тот факт, что кооперативность по АТР устраняется дигитони-
ном, позволяет предположить, что в ее основе лежат взаимодействия
протомеров в олигомерном комплексе Na^+, K^+ -АТРазы, нарушение ко-
торых (например, при обработке детергентом в процессе выделения
и очистки фермента) может служить причиной отсутствия кооператив-
ности по субстрату.

Материалы и методы

Na^+, K^+ -АТРаза из мозга быка обладала активностью 2—2,5 ед. [7]
при гидролизе АТР в стандартных условиях (13) мМ NaCl, 20 мМ
KCl, 3 мМ Mg^{2+} -АТР, 30 мМ имидазола при pH 7,4 и 37°). Na^+, K^+ -
АТРаза сердца собаки, выделяемая из правого желудочка по методу
Besch и соавт. [8], обладала активностью 0,5—1,0 ед. в тех же усло-
виях. Оба препарата практически не содержали Mg^{2+} -АТРазы и были
способны гидролизовать другие субстраты, хотя и с меньшей скоростью
(СТР—20—35%, ГТР—9—12%, УТР—4—5% от скорости гидролиза
АТР). Кинетический анализ проводили, определяя скорость гидроли-
за нуклеозидтрифосфатов методом Rathbun, Betlach [9], модифициро-
ванным методом Fiske, Subbarow [10] или в процессе pH-метрической
регистрации [11]. Гидролиз п-нитрофенилфосфата (пНФФ) измеряли
спектрофотометрически [7]. Белок определяли по методу Lowry, до-
бавляя в пробы с мембранными препаратами 1%-ный дезоксихолат
(ДОХ) [10]. Расчеты кинетических параметров осуществляли обще-
принятым способом [12].

Основные реактивы, использованные в работе: нуклеозидтрифос-
фаты («Reanal» и «Serva»), уабани («Koch Light»), ацетилфосфат и
пНФФ («Fluka»), остальные реактивы марки х. ч. и ос. ч. («Союзхим-
реактив»).

Результаты и обсуждение

*Кинетика гидролиза разных субстратов Na^+, K^+ -АТРазой моз-
га и сердца.* Оба препарата фермента гидролизovali АТР по не-Миха-
элисовской кинетике, при которой наблюдалась добавочная активация
гидролиза при повышении концентрации субстрата и выявлялось вто-
рое значение K_m . Этот факт широко известен в литературе [1, 3, 13],
однако используемые нами мембранные препараты характеризовались
и кооперативностью по субстрату, выявляемой кинетически (рис. 1),
она присуща и гидролизу СТР, в то время как другие субстраты не
проявляли ни кинетической кооперативности, ни отклонений в кине-
тике Михаэлиса в процессе гидролиза (табл. 1).

Повышение концентрации аллостерического субстрата переводило
отрицательную кооперативность ($n_H < 1$) в положительную ($n_H > 1$) (рис. 1).
В условиях, когда взаимодействие протомеров было нарушено из-
менением температуры или дигитонином [11, 14], положительная коо-

Кинетические параметры гидролиза разных субстратов
 Na^+ , K^+ -АТРазой (результаты типичного эксперимента)

Источник фермента	Субстрат	Km, V, ηп (результаты типичного эксперимента)			
		Km1	Km2	V, ед. акт.	ηп по суб- страту
		мкМ			
Мозг быка	АТР	8.5	175 2900	2.0	3.4
	СТР	не рассчит.		0.7	3.6
	УТР	530		0.03	1.0
	GTP	1300		0.15	1.1
Сердце собаки	пНФФ	2700	220	0.18	1.0
	АТР	28		0.32	2.0

Примечание. В случае АТР и СТР представлены значения n , рассчитанные в области K_m .

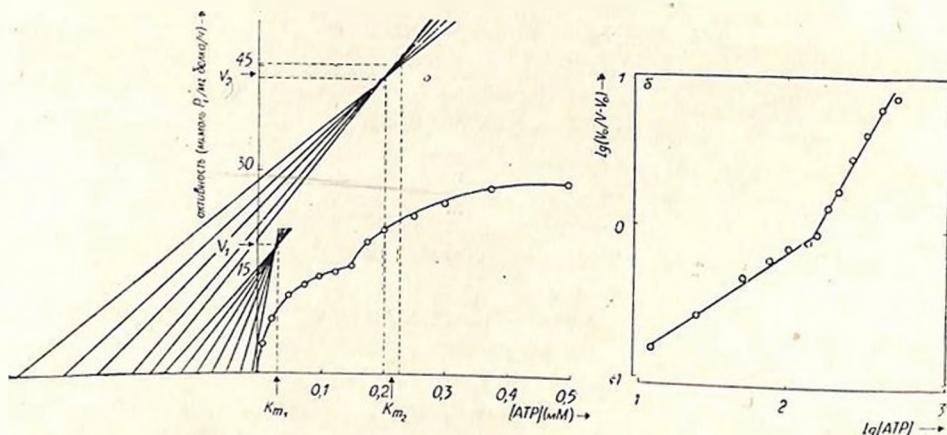


Рис. 1. Зависимость активности Na^+ , K^+ -АТРазы сарколеммы сердца собаки от концентрации АТР в прямых координатах (а) и координатах Хилла (б).
 Определение K_m и V методом Корнш-Боуден и Эйзенштала

перативность устранялась, но величины n в области низких концентраций субстрата оставались меньше единицы. Было обнаружено, что на фоне дигитонина кинетика гидролиза АТР оставалась сложной и 2 значения K_m сохранялись [15]. С помощью сшивающих белки агентов действие дигитонина нарушает межбелковые взаимодействия в олигомерном комплексе Na^+ , K^+ -АТРазы [3,16]. То обстоятельство, что на его фоне в наших опытах положительная кооперативность по АТР устранялась, но отрицательная кооперативность в области K_{m1} и немихаэлисовская кинетика оставались, позволяет приписать первое свойство взаимодействию протомеров, а второе — внутренним качествам каждого протомера. Другие субстраты гидролизировались Na^+ , K^+ -АТРазой по простой классической кинетике и не выявляли кооперативности, что связано с появлением двух K_m при гидролизе АТР и СТР. Зависит ли это от наличия специального аллостерического центра, способного взаимодействовать лишь с АТР или СТР, или от способности

этих субстратов индуцировать релаксационную кинетику [12, 17], в настоящее время сказать пока трудно.

Ингибирование Na^+ , K^+ -АТФазы Ca^{2+} , Zn^{2+} и убаином. Исследуемые лиганды часто используются для оценки чувствительности Na^+ , K^+ -АТФазы к ионам повышенной биологической активности, а также к кардиотоническим средствам. Чаще всего исследуемым параметром является величина $K_{0,5}$ (концентрация, создающая полумаксимальное ингибирование, рис. 2), которая действительно характеризует данный процесс только при наличии собственного центра связывания лиганда. При этом нет конкуренции между связывающимся лигандом и субстратом или активаторами реакции, как в случае с убаином, где $K_{0,5}$ остается постоянным параметром независимо от концентрации АТФ. Центр присоединения кальция (возможно, в комплексе с АТФ) совпадает с гидролитическим, что обуславливает конкуренцию либо между Ca^{2+} и Mg^{2+} , либо между комплексами Ca^{2+} -АТФ и Mg^{2+} -АТФ, так как $K_{0,5}$ для кальция зависит от концентрации АТФ (рис. 2).

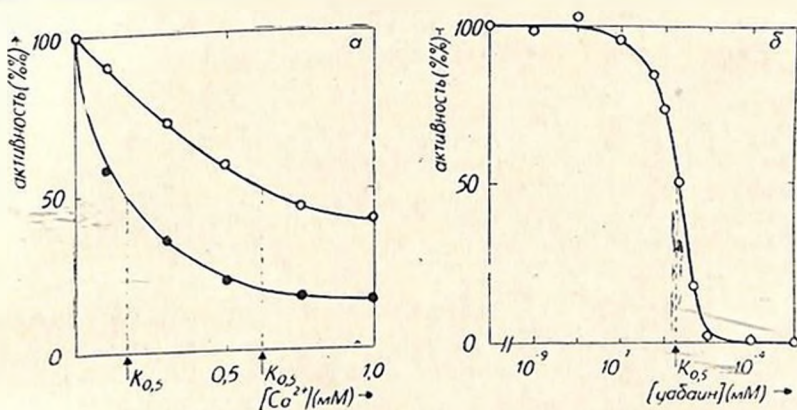


Рис. 2. Ингибирование Na^+ , K^+ -АТФазы из сердца собаки Ca^{2+} (а) и убаином (б) в присутствии 3 мМ (○) и 0,15 мМ (●) АТФ

Поэтому, кроме величин полумаксимального ингибирования фермента, были рассчитаны также значения n_H по ингибиторам. Ингибирование Na^+ , K^+ -АТФазы цинком и кальцием осуществляется некооперативно; при взаимодействии убаина с ферментом из сердца выявляются кооперативные взаимодействия, по крайней мере, двух протомеров, что ранее в литературе не отмечалось (табл.2). Возможно, способность кооперативно взаимодействовать с убаином—специфическое отличие Na^+ , K^+ -АТФазы из сарколеммы сердца, позволяющее при малых изменениях концентрации гликозида значительно изменять активность фермента. Не исключено, что способность к взаимодействию убаинсвязывающих центров потенциально существует у фермента и из других тканей. Показано, например [19], что после 20 мин преникубации Na^+ , K^+ -АТФазы из почек с убаином ингибирование им из некооперативного ($n_H=0,75$) изменяется таким образом, что можно говорить о взаимодействии, по крайней мере, двух центров связывания

ингибитора ($n_H=2$). Na^+ , K^+ -АТРаза из сердца ингибировалась убаином кооперативно при всех условиях, независимо от преникубации, из чего можно сделать вывод, что в нативном состоянии способность к взаимодействию убаина с связывающих центров проявляется только у Na^+ , K^+ -АТРаза сердца, хотя в определенных условиях *in vitro* эта способность может выявляться и у фермента из других тканей.

Таблица 2

Характеристика ингибирования Na^+ , K^+ -АТРаза убаином, Zn^{2+} и Ca^{2+}

Источник фермента	Zn^{2+}		Ca^{2+}		Убаин	
	$K_{0,5}$ (М)	n_H	$K_{0,5}$ (М)*	n_H	$K_{0,5}$ (М)	n_H
Мозг быка	$2,5 \cdot 10^{-5}$	1,0	не определяли		$1,5 \cdot 10^{-6}$	1,0
Сердце собаки	не определяли		а. $0,80 \cdot 10^{-3}$ б. $0,50 \cdot 10^{-3}$ в. $0,11 \cdot 10^{-3}$	1,0	а. $3,2 \cdot 10^{-6}$ б. $3,0 \cdot 10^{-6}$ в. $3,1 \cdot 10^{-6}$	2,1
Скелетные мышцы кролика**	не определяли		$0,4 \cdot 10^{-3}$	1,0	$1,0 \cdot 10^{-4}$	1,0

* $K_{0,5}$ Na^+ , K^+ -АТРаза из сердца собаки убаином и Ca^{2+} измеряли при 3 (а), 1,2 (б) и 0,1 (в) мМ АТР; во всех остальных случаях при определении $K_{0,5}$ использовали 3 мМ АТР.

** данные по влиянию убаина на Na^+ , K^+ -АТразу из скелетных мышц взяты из ранее опубликованной части работы [18]

Na^+ , K^+ -АТРаза как кооперативная система. Кинетическая кооперативность, проявляемая Na^+ , K^+ -АТразой при гидролизе АТР и СТР, показывает, что наименьшее число взаимодействующих гидролитических центров равно 2 (сердце собаки) или 4 (мозг быка). Эти результаты хорошо согласуются с данными литературы [3, 16, 20, 21]. Ранее было показано, что n_H по Na^+ (2,3) и K^+ (1,5) соответствуют взаимодействию 3 Na^+ и 2 K^+ в процессе гидролитического цикла, что отвечает стехиометрии активного транспорта. При этом величины n_H по ионам не зависят от присутствия дигитонина или изменения температуры, следовательно, эти ионные центры локализованы на одном протомере [14].

Удивительным было обнаружение кооперативности по убаину. Ранние исследования связывания АТР и убаина, позволявшие в числе прочих результатов постулировать применимость „полуреактивной модели“ для Na^+ , K^+ -АТРаза [22], в свете новых данных, по-видимому, являются недостаточно однозначными [23, 24]. Однако взаимодействие убаина с ориентированной во внеклеточную среду частью Na^+ , K^+ -АТРаза в ряде случаев (почки, сердце) также выявляет кооперативные связи между протомерами. Остается неясным до сих пор, используются ли (и каким образом) эти взаимодействия в процессе осуществления основной функции Na^+ , K^+ -АТРаза — активного транспорта ионов.

Na⁺, K⁺-ATPase AS A COOPERATIVE SYSTEM

SCHEGLOVA M. V., SAZONTOVA T. G., BOLDYREV A. A.

Research Institute of Biological Tests of Chemicals, Kupavna, M. V. Lomonosov State University, Moscow

The kinetic cooperativity of the membrane preparations of brain and heart Na⁺, K⁺-ATPase has been analyzed. The hydrolysis of ATP and CTP by both enzyme preparations was carried out cooperatively indicating that the minimal number of hydrolytic sites in brain enzyme is 4 and in heart enzyme—2. In the case of ATP and CTP the second Michaelis constant is detected at substrate concentrations higher than 100 mM. The degradation of other nucleotides was performed in accordance with the Michaelis-Menten kinetics.

During inhibition of heart Na⁺, K⁺-ATPase by ouabain the interaction of at least two ligand-binding sites is detected. Zn²⁺ and Ca²⁺, which also inhibit the ATP hydrolysis act noncooperatively.

Thus, the kinetic cooperativity of Na⁺, K⁺-ATPase in relation to several ligands reflects the interaction of protomers in the oligomeric complex of this enzyme.

ЛИТЕРАТУРА

1. Schuurmans Stekhoven F., Bonting S. L. *Physiol. Rev.*, 61, 2—76, 1981.
2. Skou J. C., Esmann M. *Biochim. Biophys. Acta*, 567, 435—444, 1979.
3. Болдырев А. А. Итоги науки и техники, сер. Биол. химия, 17, с. 75—146, 1982.
4. Gache C., Rossi B., Lazdunski M. *Eur. J. Biochem.*, 65, 293—306, 1976.
5. Тарас В. С. Na⁺, K⁺-АТФаза мозга: общая характеристика, аллостерическая регуляция и влияние психотропных средств. Докт. дис., Тарту, 1975.
6. De Pover A., Godfraind T. *Biochem. Pharmacol.*, 23, 3051—3056, 1974.
7. Klodos I., Ottolenghi P., Boldyrev A. *Analyt. Biochem.*, 67, 397—403, 1975.
8. Jones P. J., Phan S. N., Besch R. Jr. *Biochim. Biophys. Acta*, 514, 294—309, 1978.
9. Rathbun W. B., Bettlach M. V. *Analyt. Biochem.*, 28, 436—446, 1969.
10. Практикум по биохимии. (Под общ. ред. Мешковой Н. П. и Северина С. Е.). Изд-во МГУ, с. 65—69, 91—92, 1979.
11. Щеглова М. В., Райхман Л. М., Лопина О. Д., Болдырев А. А. *Биохимия*, 46, 1, 62—69, 1981.
12. Корнши-Бойден Э. Основы ферментативной кинетики. М., Мир, 1979.
13. Robinson J. D., Flashner M. S.—In: Na, K-ATPase. Structure and kinetics. Eds. Skou J. C., Norby J. C. London e. a., p. 275—285, 1979.
14. Boldyrev A. A., Ruuge E. K., Scheglova M. V. *Biochem. International*, 2, 137—144, 1981.
15. Щеглова М. В. Исследование кооперативных свойств Na⁺, K⁺-АТФазы, канд. дис., М., 1981.
16. Liang S. M., Winter C. G. *J. Biol. Chem.*, 252, 8278—8284, 1977.
17. Ainslie G. R. Jr., Shill J. P., Neet K. E. *J. Biol. Chem.*, 247, 7088—7096, 1972.
18. Болдырев А. А., Ткачук В. А.—В сб.: Молекулярная биология, Киев, Наукова Думка, т. 13, с. 15—32, 1976.
19. Rodriguez H. J., Hogan W. C., Sinha S. K., Jacobson M. P., Klahr S. *Biochim. Biophys. Acta*, 641, 36—54, 1981.

20. Huang W. H., Askary A. *Biochim. Biophys. Acta*, 578, 547—552, 1979.
21. Hansen O., Jensen J., Norby J. G., Ottolenghi P. *Nature*, 280, 410—412, 1979.
22. Repke K. R. H., Dittrich F.—In: Na, K-ATPase. Structure and kinetics. Eds. Skou J. C., Norby J. C. London e. a., 487—500, 1979.
23. Peters W. H. M., Swartz H. G. P., de Pont J., Schuurmans Stekhoven F., Bonting S. L. *Nature*, 290, 338—339, 1981.
24. Kyte J. *Nature*, 292, 201—204, 1981.

Поступила 15. I 1983