

УДК 577.153

ИЗОФОРМЫ КАТАЛИТИЧЕСКОЙ СУБЪЕДИНИЦЫ Na^+, K^+ -АТРАЗЫ МОЗГА И ИХ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ К УБАИНУ

Капля А.А., Кравцов А.В., Кравцова В.В.,
Горишняк В.П.

Институт биохимии им.А.В.Палладина АН УССР, Киев

По данным электрофореза, в ПААГ в присутствии ДДС-Na препаратов фермента мозга крысы и быка Na^+, K^+ -АТРаза представлена двумя изоформами каталитической субъединицы (α^+ и α). Однако только для фермента мозга крысы кинетика ингибирования активности Na^+, K^+ -АТРаза убаином является двухфазным ($K_{0.5} = 4 \times 10^{-7}$ и 10^{-4} М для первой и второй фаз соответственно). В то же время для фермента мозга быка наблюдается сходство с ферментом почек свиньи в характере ингибирования убаином (кинетика-однофазная, оба одинаково высокочувствительны к убаину, $K_{0.5} = 3 \times 10^{-7}$ М), хотя последний представлен только одной α -изоформой.

Ауторадиографией гелей показано, что в препаратах мозга крыс при концентрации убаина $> 5 \times 10^{-7}$ М наблюдается полное блокирование каталитического фосфорилирования $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ АТР α^+ -субъединицы Na^+, K^+ -АТРаза, в то время как даже при концентрации убаина 10^{-3} М не происходит полного ингибирования α -формы. Вместе с тем, в случае с ферментом мозга быка не выявлено различий в чувствительности к ингибитору обеих изоформ.

Следовательно, гетерогенность сродства изоформ Na^+, K^+ -АТРаза к убаину имеет видовую специфичность. При этом гликозидчувствительная и гликозидустойчивая формы фермента не абсолютно тождественны α^+ - и α -изоформам Na^+, K^+ -АТРаза.

* * *

Na^+, K^+ -АТРаза (АТР: фосфогидролаза, КФ 3.6.1.37) представляяет собой интегральный белок плазматических мембран, осуществляющий активный транспорт Na^+ и K^+ в клетках животных. В мозгу этот фермент присутствует в высокой концентрации, где он участвует в обеспечении процессов возбуждения, поддерживая необходимые трансмембранные ионные градиенты.

Специфическими ингибиторами Na^+, K^+ -АТРаза являются сердечные гликозиды, центры связывания которых локализованы на внеклеточной поверхности α -субъединицы фермента и пространственно обособлены от ее внутриклеточного каталитического участка липидным бислоем [1,2].

Этот факт, наряду с многочисленными экспериментальными данными о существовании в организме животных эндогенных убаиноподобных

веществ-регуляторов активности Na^+, K^+ -АТФазы [3], позволил обосновать особую рецепторную функцию фермента, тесно связанную с его транспортно-гидролитической функцией [4].

Наличие видовых и тканевых различий сродства Na^+, K^+ -АТФазы к убаину свидетельствует о существовании неиндуцируемых лигандами гликозидчувствительной и гликозидустойчивой форм фермента [4—7].

Действительно, в мозгу млекопитающих, скелетных мышцах и жировой ткани крысы, миокарде собаки наряду с обычной молекулярной формой фермента почечного типа (α -форма) обнаружен изофермент с каталитической субъединицей большей величины $\text{M}_r(\alpha^+ \text{-форма})$ [6,8—10]. Чувствительность последнего к убаину в мозгу крыс на два порядка выше, чем α -формы [8,9].

Однако к настоящему времени не получен однозначный ответ на вопрос о том, наблюдается ли абсолютное соответствие убаинчувствительной и убаинустойчивой форм Na^+, K^+ -АТФазы α^+ и α -изоформам фермента [4—10].

Целью настоящей работы явилось сравнительное определение чувствительности к сердечным гликозидам двух изоформ Na^+, K^+ -АТФазы в препаратах фермента из мозга крыс и быка на основании исследования ингибирования убаином Na^+, K^+ -АТФазной активности в гетерогенных по изоферментному составу препаратах фермента мозга и каталитического фосфорилирования $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}] \text{ АТФ}$ индивидуальных изоформ.

Материалы и методы

Частично очищенные мембраносвязанные препараты Na^+, K^+ -АТФазы выделяли из серого вещества головного мозга быка и крыс по методу Sweadner [11] с некоторыми модификациями.

Мозг быка сразу после забоя животных на мясокомбинате на льду доставляли в лабораторию. Мозг белых беспородных разнополых крыс (200—250 г), умерщвленных декапитацией, немедленно охлаждали в среде гомогенизации (320 мМ сахара, 1 мМ трис-ЭДТА, pH 7,2).

Микросомную фракцию, полученную по Sweadner [11], инкубировали 30 мин, 20° в среде: 50 мМ имидазол (pH 7,4), 1 мМ ЭДТА, 3 мМ трис-АТФ, 5 мкг/мл белка микросом, 1,2 мг/мл ДДС-Na. Смесь (5 мл) наслаивали на ступенчатый градиент концентраций сахарозы: 15, 25, 30% (вес/об., по 8 мл) с 5 мМ имидазолом (pH 7,4), 0,1 мМ ЭДТА. Центрифугировали в бакет-роторе 4 ч, 110000 г. Отбирали белковую зону на границе 15—25% сахарозы, разводили 2-кратно 5 мМ имидазолом (pH 7,4), 0,1 мМ ЭДТА и осаждали центрифугированием при 105000 г, 2 ч. Осадки суспендировали в среде: 25 мМ имидазол (pH 7,4), 10%-ная сахароза, 0,1—0,5 мМ ЭДТА и использовали в качестве конечного мембраносвязанного препарата Na^+, K^+ -АТФазы мозга.

Высокоочищенный мембраносвязанный препарат фермента из наружного мозгового слоя почек свиньи получали по методу Jorgensen [12]. Активность препаратов составляла в мозгу быка 2,5—3, крысы—5—6, почках свиньи—18—20 мкмоль P_i /мг белка в мин. Препараты хранили до 2-х месяцев при -20° без потери активности.

Na^+, K^+ -АТФазную активность определяли по ранее описанному методу [13], Mg^{2+} -АТФазную активность—в присутствии $10^{-3}M$ (фермент мозга быка и почек свиньи) и $3 \cdot 10^{-3}M$ (фермент мозга крыс) убаина.

Концентрацию белка [14] подбирали таким образом, чтобы за время инкубации гидролизвалось не более 10% АТФ. АТФР- Na_2 (дважды перекристаллизованная, «Reanal», Венгрия) переводили в трис-форму с помощью смолы Dowex 50w $\times$ 8.

Электрофорез белков проводили по Laemmli [15] в вертикально расположенных пластинках ПААГ (120 $\times$ 120 $\times$ 1 мм) на отечественном приборе для вертикального гель-электрофореза фирмы «Хийу Калур» (ЭССР). Гели обрабатывали по Кондратьеву и соавт. [16].

При изучении ингибирования сердечными гликозидами каталитического фосфорилирования [γ - ^{32}P] АТФ фермента 30—40 мкг белка препаратов Na^+, K^+ -АТФазы инкубировали в объеме 40 мкл 1 ч, 37° в среде: 20 мМ имидазол (рН 7,25), 5 мМ H_3PO_4 (нейтрализована трисом), 5 мМ $MgCl_2$, убаин в диапазоне исследуемых концентраций. Затем пробы охлаждали на льду несколько минут и аликвоты (35 мкл) переносили в пробирки с 5 мкл смеси: 1,04 М NaCl, 4 мМ [γ - ^{32}P] АТФ (20—25 мкКи в пробе). Инкубировали на льду 20 с. Реакцию фосфорилирования останавливали добавлением 13 мкл 4-кратного солибилизирующего буфера: 200 мМ трис-HCl (рН 6,8 при 20°), 8% ДДС-Na, 4% 2-меркаптоэтанол, 8 мМ ЭДТА, 40% глицерин, 0,004% бромфеноловый синий. Образцы выдерживали 20 мин при комнатной температуре и подвергали электрофорезу. Ауторадиографию гелей проводили на рентгеновской пленке РМ-1, экспозиция — 5—10 дней при -20°).

Результаты и обсуждение

Ингибирование Na^+, K^+ -АТФазы убаином изучали в процессе АТФазной реакции, то есть ингибитор в исследуемом диапазоне концентраций (0 — $3 \times 10^{-3} M$) присутствовал в инкубационной среде совместно с Mg^{2+} , АТФ, Na^+ и K^+ . Для достижения стационарного уровня ингибирования АТФазную реакцию проводили в течение 30 мин.

Как видно из рис.1, препараты фермента существенно различаются по характеру ингибирования сердечным гликозидом. Для Na^+, K^+ -АТФазы мозга крыс в отличие от фермента из мозга быка кривая ингибирования

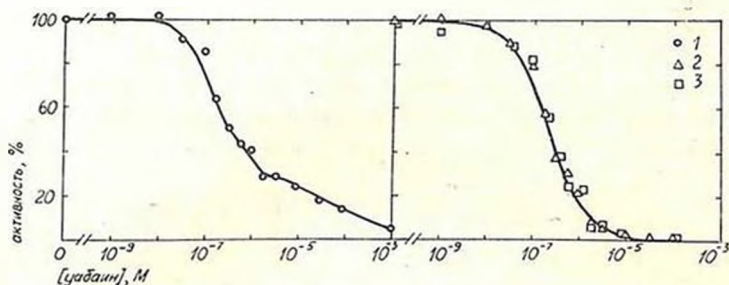


Рис.1. Ингибирование Na^+, K^+ -АТФазы мозга крыс (1), быка (2) и почек свиньи (3) уабаином

имеет более сложную форму, чем в случае подчинения закономерностям классической кинетики связывания ингибитора, и характеризуется наличием двух четко выраженных компонент ингибирования ($K_{0.5}$ ингибирования уабаином составляет 4×10^{-7} и 10^{-4} М).

В то же время наблюдается значительное сходство по характеру зависимости активности Na^+, K^+ -АТФазы от концентрации ингибитора и сродству к гликолизу между ферментами мозга быка и почек свиньи ($K_{0.5}$ ингибирования гликозидом соответствует значению этой константы для высокочувствительной к уабаину компоненты ингибирования фермента мозга крыс: 3×10^{-7} М).

Кроме того, для фермента мозга быка, как и почек свиньи, практически полное ингибирование Na^+, K^+ -АТФазной активности наступает при концентрации уабаина 10^{-4} М, в то время как у Na^+, K^+ -АТФазы мозга крыс некоторая остаточная активность сохраняется даже при высоких концентрациях гликозида (10^{-3} М).

Следовательно, Na^+, K^+ -АТФазы мозга быка и почек свиньи являются собой пример уабаинчувствительной формы фермента, а Na^+, K^+ -АТФазы мозга крысы обладает также свойствами резистентной к гликозиду формы.

Согласно данным литературы [6, 8], двухфазность кривых ингибирования Na^+, K^+ -АТФазы сердечными гликозидами предполагает наличие в мозгу двух популяций фермента с разным сродством к ингибитору.

Действительно, гель-электрофорез препаратов Na^+, K^+ -АТФазы мозга [15], в отличие от почек, выявляет две белковые полосы в области каталитической субъединицы фермента с M_r 90 кД (рис.2, а).

Согласно терминологии Sweadner [8], они обозначены α и α^+ (соответственно для полипептида с меньшей и большей величиной M_r), соответствуют каталитическим субъединицам двух различных молекулярных форм фермента и могут быть идентифицированы по Na^+ -зависимому, K^+ -чувствительному фосфорилированию [γ - ^{32}P]АТР (рис.2, б).

Видовые различия фермента из мозга коровы и крысы заключаются

в относительном содержании и близости миграции при гель-электрофоре α -и α^+ -форм каталитической субъединицы Na^+, K^+ -АТразы.

По данным сканирования окрашенных Кумасси ярко-голубым R-250 гелей, содержание α^+ -формы для препаратов фермента мозга быка и крысы составляет 50—60 и 75—80% соответственно.

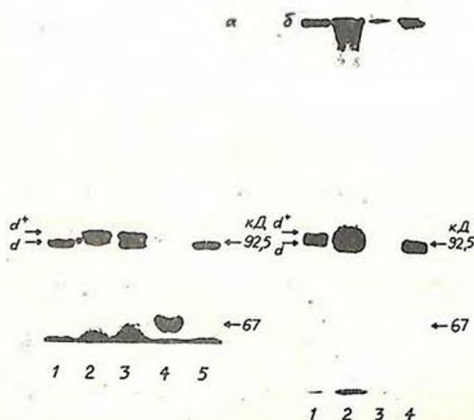


Рис.2.а — электрофореграмма препаратов Na^+, K^+ -АТразы (5,6%-ПААГ): почка свиньи (1,5), мозга крысы (2) и быка (3). Белки-маркеры (4): фосфоорилаза b, 92,5 кД; БСА, 67 кД. Положение белков-маркеров и изоформ каталитической субъединицы Na^+, K^+ -АТразы отмечено стрелками на полях, * — α -форма мозга крысы. б-ауторадиографическая идентификация каталитической субъединицы Na^+, K^+ -АТразы после электрофореза в 6%-ном ПААГ. Препараты фермента мозга быка (1,2) и почка свиньи (3,4) фосфорилировали 20 с на льду в среде: 30 мМ трис-НСI (рН 7,25-4 °), 5 мМ MgCl_2 , 1 мкМ $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}] \text{ АТФ}$ (5 мкКи в пробе), 130 мМ NaCl (2,4) и 20 мМ KCl (1,3).

На электрофореграммах α -изоформа каталитической субъединицы Na^+, K^+ -АТразы мозга крысы при электрофорезе в 5,6%-ном ПААГ занимает промежуточное положение между α^+ -субъединицей препаратов фермента мозга быка и крысы и α -субъединицей мозга быка и почек свиньи (рис.2, а).

Однако, несмотря на то, что оба исследуемых препарата Na^+, K^+ -АТразы мозга содержат две изоформы каталитической субъединицы α^+ и α (рис.2, а), двухфазность ингибирования убаином, как отмечалось выше, выявляется только для фермента мозга крысы, что свидетельствует о наличии двух различающихся по сродству к ингибитору типов центров связывания гликозида.



Рис.3. Каталитическое фосфорилирование Na^+, K^+ -АТФазы мозга крыс (а) и быка (б) $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]^+\text{АТР}$. Ауторадиограмма гелей (приведена область каталитической субъединицы фермента). Концентрация ПААГ при электрофорезе: 5% (а) и 5,6% (б). Препараты преинкубировали (см. «Материалы и методы») в присутствии различных концентраций убаина (в М): 0 (1), 10^{-8} (2), 10^{-7} (3), $2,5 \cdot 10^{-7}$ (4), $5 \cdot 10^{-7}$ (5), 10^{-6} (6), 10^{-5} (7), 10^{-4} (8), 10^{-3} (9).

Таким образом, гетерогенность сродства изоформ Na^+, K^+ -АТФазы к убаину не абсолютна и имеет четкую видовую специфичность.

Для подтверждения этого предположения исследовали ингибирование убаином каталитического фосфорилирования двух изоформ фермента. Полученные результаты свидетельствуют о том, что в случае препаратов Na^+, K^+ -АТФазы мозга крысы α^+ -форма каталитической субъединицы более чувствительна к ингибитору, чем α -форма (рис.3, а).

При концентрациях убаина более $5 \times 10^{-7} \text{ М}$ наблюдается полное блокирование внутримолекулярного фосфорилирования α^+ -формы, в то время как даже при концентрации гликозида равной 10^{-3} М не наступает полного ингибирования для α -формы.

Следовательно, двухфазность кривой ингибирования Na^+, K^+ -АТФазы мозга крыс убаином (рис.1) объясняется разной чувствительностью к нему двух изоформ фермента, а кинетические параметры кривой ингибирования характеризуют сродство к ингибитору α^+ и α -форм каталитической субъединицы Na^+, K^+ -АТФазы мозга крыс (различия составляют более чем два порядка).

Относительное содержание двух изоформ фермента можно рассчитать на основании данных рис.1. Так, содержание малочувствительной к убаину α -формы Na^+, K^+ -АТФазы, ответственной за компоненту низкого сродства к ингибитору на кривой ингибирования при концентрациях убаина $> 5 \cdot 10^{-6} \text{ М}$, составляет около 30%, что хорошо согласуется с данными сканирования гелей.

В то же время, в случае с ферментом мозга быка не выявлено различий в чувствительности к ингибитору обеих изоформ Na^+, K^+ -АТФазы

(рис.3, б): при концентрации уабаина $>10^{-7}$ М наблюдается параллельное ингибирование включения ^{32}P как в α^+ -, так и α -форму каталитической субъединицы фермента, что полностью соответствует характеру зависимости Na^+, K^+ -АТРазной активности от концентрации ингибитора (рис.1).

Следовательно, обе формы каталитической субъединицы Na^+, K^+ -АТРазы мозга быка имеют сходное сродство к ингибитору.

Различия в чувствительности к кардиоактивным стероидам, выявленные для изоформ Na^+, K^+ -АТРазы мозга, адипоцитов и скелетных мышц крысы [8—10], были признаны универсальным свойством, характеризующим α^+ - и α -формы фермента. Действительно, последние имеют четкие структурно-функциональные различия: α^+ -форма каталитической субъединицы имеет добавочный 2 кД компонент, большее число реакционноспособных и функционально активных сульфгидрильных групп и более резистентна к трипсинолизу [6, 8], обладает большей чувствительностью к ингибитору пиритиамину [6], а в адипоцитах и скелетных мышцах специфически активируется инсулином [10]; обе формы, наконец, характеризуются различными антигенными детерминантами [17] и имеют отличия в N-концевой аминокислотной последовательности [18].

Поскольку изоформы Na^+, K^+ -АТРазы имеют различную тканевую локализацию (в случае с ферментом из мозга α^+ специфичны для аксолеммы, а α —для глиальных клеток, астроцитов [8,9]), то различная их чувствительность к сердечным гликозидам и, следовательно, к потенциальным эндогенным уабаинподобным веществам, по-видимому, свидетельствует в пользу гипотезы о различной функциональной роли этих изоформ.

Однако наши результаты и данные литературы [4,6,7] показывают, что было бы упрощением отождествлять α^+ - и α -изоформы с уабаинчувствительной и уабаинустойчивой формами фермента. Такое соотношение чувствительности к гликозиду изоформ Na^+, K^+ -АТРазы реализуется по крайней мере в тканях крыс и других грызунов (наши и литературные данные [6, 8—10]), для α -изоформ Na^+, K^+ -АТРазы которых установлены специфические особенности белковой структуры по сравнению с другими млекопитающими [17,19], обуславливающие, очевидно, и специфику ее функциональных свойств—резистентность к уабаину.

Следовательно, представление о молекулярных формах фермента недостаточно для полного объяснения видовых различий в чувствительности к уабаину Na^+, K^+ -АТРазы.

В наших исследованиях α^+ -форма мозга крысы и быка, как α -форма мозга быка и почек свиньи, характеризовались одинаково высоким сродством к ингибитору в сравнении с резистентной к гликозид α -формой мозга крысы.

Можно предположить, что специфичность к ингибитору реализуется на уровне уабаинсвязывающих участков каталитической субъединицы фермента.

ISOFORMS OF THE CATALYTIC SUBUNIT OF BRAIN Na^+, K^+ -ATPase AND THEIR OUABAIN SENSITIVITIES

Kaplya A.A., Kravtsov A.V., Kravtsova V.V., Gorishnyak V.P.

*Palladin Institute of Biochemistry, Ukrainian SSR Academy of
Sciences, Kiev*

Two forms of Na^+, K^+ -ATPase catalytic subunit in enzyme preparations from the rat and bovine brain were detected by SDS-PAGE electrophoresis. However, only the rat brain enzyme has biphasic curve of ouabain inhibition with $K_{0.5} = 4 \cdot 10^{-7}$ and 10^{-4} respectively. Bovine brain enzyme resembles ATPase from pig renal medulla in ouabain inhibition pattern as they both have similar sensitivity to ouabain with $K_{0.5}$ of inhibition equal to $3 \cdot 10^{-7}$, although the pig renal ATPase has only the α -type of catalytic subunits. Autoradiography of the gels showed that catalytic phosphorylation of the α^+ -subunit by $[\gamma\text{--}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ was blocked in the rat brain preparations by $5 \cdot 10^{-7}\text{M}$ ouabain, but even 10^{-3} ouabain did not completely inhibit phosphorylation of the α -form. Contrary to rat brain enzyme, bovine brain Na^+, K^+ -ATPase isozymes show no differences in their sensitivities to the inhibitor. Hence, the affinity of the Na^+, K^+ -ATPase isozymes to ouabain is species-specific; the glycoside-sensitive and glycoside-insensitive forms are not fully identical to α^+ - and α -subunit forms of Na^+, K^+ -ATPase.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Cantleu L.C.-In: Current topics in bioenergetics (ed. D.R.Sanadi), v.11, p.201—237, New York, Acad. Press, 1981.
2. Болдырев А.А., Мельгунов В.И. Транспортные АТФазы. Итоги науки и техники, сер. Биофизика, т.17, М., ВИНТИ, 1985.
3. Лопина О.Д., Таласова С.Ю., Стецюк Н.У., Коглобай А.А., Болдырев А.А. Укр. биохим. журн., т.58, №6, с.74—84, 1986.
4. Anner B.M. Biochem. J., v.227, №1, p.1—11, 1985.
5. Urayama O., Nakao M. J. Biochem., v.86, №5, p.1371—1381, 1979.
6. Matsuda T., Iwata T., Cooper J.R. J. Biol. Chem., v.259, №6, p.3858—3863, 1984.
7. Feige G., Leutert Th., De Pover A.-In: 5-th Int. Conf. Na,K-ATPase, Aarhus, 14—19 June, 1987, Abstr. and Progr., p.103, Aarhus, 1987.
8. Sweadner K.J. J. Biol. Chem., v.254, №13, p.6060—6067, 1979.
9. Sweadner K.J. J. Biol. Chem., v.260, №21, p.11508—11513, 1985.
10. Lutton J., Lin J.C., Guidotti G. J. Biol. Chem., v.260, №2, p. 1177—1184, 1985.
11. Sweadner K.J., Biochim. et biophys. acta, v.508, №3, p.486—499, 1978.
12. Jorgensen P.L. Biochim. et biophys. acta, v.356, №1, p.36—52, 1974.
13. Капля А.А., Крацов А.Б., Крацова В.В., Слуцкая Н.П., Гориняк В.П. Укр. биохим. журн., т.60, №2, с.40—47, 1988.
14. Cadman E., Bostwick J.R., Eichberg J. Anal. Biochem., v.96, №1, p.21—23, 1979.
15. Laemmli U.K. Nature, v.227, №5259, p.680—685, 1970.
16. Кондратьев В.Е., Щупакина Т.Г., Лазарев А.В., Буданцев А.Ю. Укр. биохим. журн., т.56, №5, с.483—487, 1984.
17. Sweadner K.J., Gilkenson R.C. J. Biol. Chem., v.260, №15, p.9016—9022, 1985.
18. Lytton J. Biochem. Biophys. Res. Commun., v.132, №2, p.764—769, 1985.
19. Nara Y., Urayama O., Kawakami K., Nojima H., Nagamune N., Kojima T., Ohta T., Nagano K., Nakao M. J. Biochem., v.102, №1, p.43—58, 1987.

Поступила 5.12.1988