

УДК 577. 15:612.82:612.014.1

СВОЙСТВА МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ КРЕАТИНКИНАЗЫ МОЗГА ПРИ ИЗМЕНЕНИИ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ С МИТОХОНДРИАЛЬНЫМИ МЕМБРАНАМИ

Хватова Е. М., Семенова Т. С., Якобсон Л. И.

Горьковский медицинский институт им. С. М. Кирова

Креатинфосфокиназа в митохондриях мозга находится в растворимом и мембраносвязанном состоянии. Активность ее распределена поровну между мембранами и межмембранным пространством. Под действием электролитов (NaCl, фосфатного буфера, ADP) с ионной силой от 0,1 до 1,75 теряет связь с мембраной 45% адсорбированного на ней фермента. Эффективность солюбилизации мембранной креатинкиназы зависит не только от ионной силы электролита, но и его природы. Стабильная активность креатинкиназы на мембранах достигается повторной обработкой электролитами.

Солюбилизованная креатинкиназа не утрачивает способности вновь восстанавливать связь с мембраной.

Взаимодействие фермента с мембранами митохондрий изменяет его кинетические свойства, снижая максимальную скорость образования креатина АТР, что может указывать на возможность регуляции фермента в естественных условиях за счет изменения связи с мембранами.

* * *

Согласно современным представлениям, центральная роль в регуляции окислительного фосфорилирования и передаче энергии от митохондрий к местам ее потребления принадлежит креатинкиназе [1—3].

Представляется важным изучение свойств митохондриальной креатинкиназы мозга. Для мозговой ткани характерна высокая скорость окислительных процессов и полная зависимость функции нервных клеток от синтеза и доставки АТР. Анализ данных, накопленных к настоящему времени, свидетельствует о том, что свойства митохондриальной креатинкиназы мозга изучены недостаточно. До сих пор среди исследователей нет единого мнения по вопросу о сходстве и различии свойств митохондриального изофермента в мозгу и сердечной мышце [4, 5].

Если для сердечной мышцы природа электростатического взаимодействия креатинкиназы с митохондриальными мембранами считается выясненной [6], то для мозга сведения о характере взаимодействия фермента со структурами митохондрий весьма отрывочны [1, 7, 8].

В проблеме митохондриальной креатинкиназы интерес представляет изучение влияния митохондриальных мембран на кинетические свойства фермента. В исследованиях Липской и соавт. [6] показано, что взаимодействие митохондриальной креатинкиназы сердца с мембранами митохондрий изменяет сродство фермента к субстрату и максимальную скорость реакции. Для митохондриальной креатинкиназы нервной ткани подобные сведения отсутствуют.

Целью настоящей работы было изучение условий солюбилизации и обратной адсорбции митохондриальной креатинкиназы мозга, оценка кинетических свойств ферментов в зависимости от взаимодействия с мембранами митохондрий.

Материалы и методы

Митохондрии мозга беспородных крыс-самцов выделяли методом дифференциального центрифугирования [9]. Митохондриальную фракцию трижды промывали, чтобы удалить цитоплазматические примеси и суспендировали в среде выделения. Наружную мембрану митохондрий мозга нарушали гипотонической обработкой [6] с последующим осаждением мембран центрифугированием (10000 g в течение 15 мин).

Экстракцию креатинкиназы из митохондрий, лишенных наружной мембраны (митопластов), проводили растворами NaCl, K^+ , Na^+ — фосфатным буфером, ADP с различной ионной силой в пределах 0,1—1,75.

После 20-минутной инкубации митопластов с электролитом, центрифугированием (100000 g, 15 мин) разделяли растворимую (солюбилизат) и мембранную (осадок) фракции креатинкиназы. Способность креатинкиназы к солюбилизации под действием электролитов оценивали по распределению активности фермента в осадке и супернатанте. Солюбилизацию митохондриальной креатинкиназы электролитом повторяли до постоянной активности фермента в осадке.

Для оценки способности креатинкиназы к повторной адсорбции на мембранах митохондрий, последние обрабатывали 0,2 M раствором NaCl до постоянной креатинкиназной активности. Митохондриальный солюбилизат, содержащий креатинкиназу, диализировали против раствора 0,25 M сахарозы, содержащей 0,1 M дитиотрейтола. Мембраны суспендировали в солюбилизате, поддерживая соотношение белка солюбилизат : мембраны, равное 10:1 и после 20-минутной инкубации центрифугировали при 100000 g, 15 мин. По разности креатинкиназной активности в мембранной фракции до и после ее инкубации с митохондриальным экстрактом, судили о способности фермента повторно ассоциировать с мембранами.

Определение креатинкиназной активности проводили по скорости образования креатина модифицированным [11] методом Еппог [12]. Начальные скорости обратной креатинкиназной реакции исследовали в условиях стационарной кинетики. Концентрация Mg-ADP была насыщающей (2,0 mM) и постоянной. Активность фермента выражали в мкмоль креатина на мг белка в мин.

Результаты и обсуждение

Гипотоническая обработка, вызывая нарушение целостности наружной мембраны митохондрий, сама по себе не экстрагирует креатинкиназу [8]. Инкубация митохондрий мозга в воде и последующее центрифугирование показали, что в осадке митохондриальных мембран активность креатинкиназы равна $2,89 \pm 0,31$ мкМ/мг белка в мин, что составляет 46% от остальной креатинкиназной активности митохондрий (6,24 мкмоль/мг

белка в мин). Остальные 54% активности связаны с растворимой фракцией фермента. Практически равное распределение активности фермента между мембранной и жидкой фракциями митохондрий позволяет предположить, что в физиологических условиях только часть креатинкиназы мозга связана с мембранами митохондрий, а другая — находится в свободном состоянии в межмембранном пространстве.

Под влиянием однократного действия фосфатного буфера с ионной силой 0,1 дополнительно теряет связь с мембраной 25% адсорбированной креатинкиназы (табл. 1). С нарастанием ионной силы фосфатного буфера солиubilизация креатинкиназы увеличивается. При максимальной ионной силе фосфатного буфера (1,75) митохондриальные мембраны теряют более 40% активности фермента. Такой же солиubilизирующий эффект достигается при действии на мембраны электролитов другой природы (NaCl и ADP) с меньшей ионной силой — 0,2—0,3.

Таблица 1

Креатинкиназная активность в мембранной фракции митохондрий мозга после действия электролитов с различной ионной силой ($n=6$)

Солиubilизирующий эффект	Активность (%)
Контроль (H ₂ O)	100
K ⁺ Na ⁺ - фосфатный буфер (M)	
0,1	75
0,7	66
1,75	58
NaCl (0,2M)	58
ADP (0,3M)	58

Из полученных результатов следует, что эффективность солиubilизации мембраносвязанной креатинкиназы мозга зависит не только от ионной силы электролита, но и его природы.

Таблица 2

Эффективность солиubilизации митохондриальной креатинкиназы при повторной обработке мембран фосфатным буфером ($n=5$)

Условия опыта	Активность (%)
Контроль (H ₂ O)	100
0,1 M фосфатный буфер	
1-кратная обработка	75
2-кратная обработка	68
3-кратная обработка	56
4-кратная обработка	56
0,7 M фосфатный буфер	
2-кратная обработка	66
3-кратная обработка	55
1,75 M фосфатный буфер	
2-кратная обработка	55
	56

Изучено повторное действие электролитов на солиubilизацию креатинкиназы (табл. 2). При повторном действии фосфатного буфера с ионной силой 0,1 максимальная солиubilизация фермента и постоянство его активности на мембранах достигается после 3-кратной обработки. С повышением ионной силы фосфатного буфера от 0,7 до 1,75 тот же результат достигается после двух- и однократного его действия соответственно. Следовательно, конечный результат солиubilизирующего действия электролита может достигаться изменением ионной силы или повтор-

ностью его действия.

Сравнительная оценка эффективности солюбилизирующего действия ADP, NaCl и фосфатного буфера на креатинкиназу из митохондрий мозга и сердца показала, что в мозгу максимально солюбилизируется до 40% адсорбированной креатинкиназы, тогда как в сердце при однократном действии перечисленных выше электролитов с ионной силой в пределах 0,02—0,1 с мембран солюбилизируется более 90% активности мембраносвязанного фермента [8]. Это позволяет предположить, что неэлектростатические взаимодействия креатинкиназы с мембранами митохондрий в мозгу составляют большую долю, чем в сердце.

Инкубация митохондриального экстракта, содержащего креатинкиназу с фракцией отмытых электролитом мембран повышает в последних активность креатинкиназы более чем на 30% (табл. 3). Эта величина активности адсорбированного фермента не имеет достоверных отличий от

Таблица 3

Повторная адсорбция митохондриальной креатинкиназы на митохондриальных мембранах (n = 5)

Условия опыта	Активность креатинкиназы (в мкмоль креатината / мг белка / мин)
Митохондриальные мембраны (MM), обработанные H ₂ O	2,90 ± 0,03
MM, обработанные 0,2 M NaCl	1,82 ± 0,02
MM после инкубации с солюбилизатором	2,55 ± 0,05

активности креатинкиназы в мембранах, обработанных водой. Заметный прирост активности в мембранах и приближение ее к исходному уровню свидетельствуют об отсутствии необратимых изменений митохондриальной креатинкиназы при ее солюбилизации.

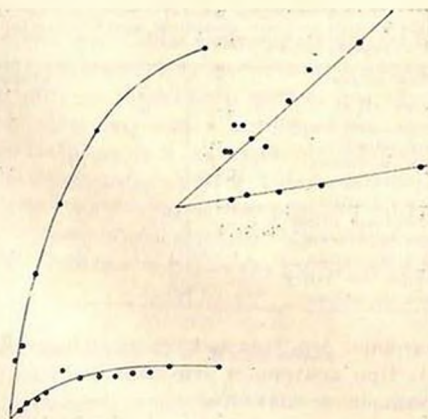


Рис. Кинетика креатинкиназной реакции в прямых и обратных величинах (n=7); 1 — в экстракте из митохондрий, 2 — в препарате митохондриальных мембран

Изучена кинетика креатинкиназной реакции в осадке митохондриальных мембран и в солюбилизате из митохондрий. У митохондриальной креатинкиназы, связанной с мембранной фракцией, зависимость начальной скорости реакции от концентрации креатинфосфата подчиняется уравнению Михаэлиса-Ментен (рисунок). Найденная в координатах Лайнуивера-Берка константа Михаэлиса по креатинфосфату равна 1,0 мМ. Средняя величина константы сродства, полученная из 4 опытов вполне удовлетворительна, поскольку показатель точности определения равен 3,6% [15].

При переходе митохондриальной креатинкиназы в растворимое состояние сохраняется классический тип кинетики для креатинфосфата. Отличительным признаком солюбилизованного фермента является увеличение максимальной скорости реакции при неизменном сродстве фермента к субстрату (рисунок). Наличие двух кинетически различных форм креатинкиназы, отличающихся по активности, показано также на митохондриальной креатинкиназе из сердечной мышцы [6]. Максимальная скорость митохондриальной креатинкиназы, связанной с мембранами, по данным авторов, составляет только половину максимальной скорости в экстракте [6]. По мнению ряда исследователей [16—18], регуляция митохондриальной креатинкиназы может осуществляться через изменение соотношения ди-, гексо- и октомеров. Олигомеризация молекулярных форм фермента сопровождается снижением ее активности [19], однако молекулярная природа этого явления требует дополнительного исследования.

Таким образом, полученные результаты показывают, что креатинкиназа в митохондриях мозга находится в свободном и связанном состояниях. Активность фермента в растворимой и мембранной фракциях после гипотонической обработки митохондрий распределена поровну.

Под влиянием ионной силы электролитов различной природы с мембранами теряет связь дополнительно еще половина адсорбированной на них креатинкиназы. Эффективность солюбилизации зависит от ионной силы электролитов и его природы. Оставшаяся на мембранах креатинкиназа не чувствительна к солюбилизирующему действию испытанных электролитов.

Взаимодействие с мембранами изменяет кинетические свойства креатинкиназы, снижая максимальную скорость обратной реакции.

Существование митохондриальной креатинкиназы в двух взаимобратимых состояниях, отличающихся по кинетическим свойствам, указывает на реальную возможность регуляции ее активности за счет структурных компонентов клетки.

THE BRAIN MITOCHONDRIAL CREATINEKINASE

Khvatova E.M., Semenova T.S., Yakobson L.I.

Kirov Medical Institute, Gorky

Solubilization of creatine kinase and its bindig with mitochondrial membranes in phosphate buffer solutions of various ionic strength was studied. Rat brain creatine kinase is found in the soluble and membrane-bound forms in equal proportion. Enzyme dissociation from membranes depends on ionic

strength and number of treatment cycles with the solubilization medium. Full restoration of the creatine kinase ability to bind with membrane testifies to the absence of solubilization-induced irreversible changes of the enzyme. Interaction with membrane alters kinetic properties of the enzyme lowering the maximal rate of creatine and ATP formation. The existence of two mutually convertible states of rat brain creatine kinase points out to a possibility of the enzyme control through its binding with membranes in the cell.

ЛИТЕРАТУРА

1. Jacobus W.E., Lehninger A.Z. J. Biol. Chem., v.248, p.4803—4810, 1973.
2. Сакс В.А. Успехи биол. химии, т.23, с.40—64, 1983.
3. Jacobus W.E. Ann. Rev. Physiol., v.47, p.707—725, 1985.
4. Watts D.C. In the Enzymes (ed. F.D. Boyer), v.8, p.383—455, Acad. Press, N.Y., 1973.
5. Weves R.A. Reuteligreger C.P.M., Dam B. Clin. Chim. acta, v.119, p.209—223, 1982.
6. Липская Т.Ю., Молокова Е.В. -В кн.: Биохимия и биофизика мышц (под ред. С.Е. Северина), с.118—129, М., Наука, 1983.
7. Swanson P.D. J. Neurochem., v.14, p.343, 1967.
8. Lapin E.P., Maker H.S., Lehrer G.M. J. Neurochem., v.23, p.465—469, 1974.
9. Fonye A., Somogyi J. Acta Physiol. Acad. Sciens Hung., v.18, N3, p.191—198, 1960.
10. Sacs V.A., Chernusova G.B., Voroncov J.J., Smirnov N., Chazov E. Circ Res., suppl.111, v.34, p.138—149, 1974.
11. Ennor A.N., Morrison I.R. Physiol. Acad. Sciens Hung., v.38, p.613, 1958.
12. Лызлова С.Н., Тааме Н., Стефанов В.Е., Южкова Т.А. -В кн.: Структурные основы и регуляция биологической подвижности, с.108, 1980.
13. Booth F.J., Clarc J.B. Biol. J., v.170, N1, p.145—151, 1978.
14. Липская Т.Ю., Белоусова А.В. Биохимия, т.45, вып.7, с.1155—1164, 1980.
15. Корниш-Боуден Э. -В кн.: Основы ферментативной кинетики, с.251, 1979.
16. Липская Т.Ю., Кедишвили Н.Ю., Каленоса М.Е. Биохимия, т.50, вып.10, с.1571—1581, 1985.
17. Marcillat O., Goldshmidt D. Biochim. et biophys. acta: Bioenergetics, v.890, N2, p.233—241, 1987.
18. Hall N., Addis P., Deluco M. Biochem. et Biophys. Res. Commun., v.76, p.950—956, 1977.
19. Федосов С.Н., Белоусова А.В. Биохимия, т.54, вып.1, с.54—67, 1989.

Поступила 24.02.1989