



УДК 577.12.02:577.152

МЕМБРАННЫЕ ЛИПИДЫ КАК РЕГУЛЯТОРЫ
МЕЖБЕЛКОВЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ

БОЛДЫРЕВ А. А., ЛОПИНА О. Д., ПРОКОПЬЕВА В. Д.

Кафедра биохимии МГУ им. М. В. Ломоносова, Москва

В обзоре рассмотрены способы, посредством которых липидная фаза мембраны может регулировать работу переносимых систем— Ca^{2+} - и Na^{+} -насосов. Конкретизированы понятия «микровязкость» и «гидрофобный объем» липидного бислоя и показано, что эти параметры взаимосвязаны и играют существенную роль в регуляции межбелковых взаимодействий в олигомерных ансамблях транспортных АТФаз. Приведены доказательства в пользу того, что АТФ в миллимолярных концентрациях модифицирует взаимоотношения между транспортными АТФазами и липидным бислоем, устраняя контроль за работой ферментов со стороны липидной фазы.

Рассмотренные закономерности, в общем, должны иметь место в случае различных мембранных структур, в том числе и в нервной ткани.

В конце 60-х—начале 70-х годов сформировалась гипотеза, согласно которой биологические мембраны представляют собой липидный бислой со встроенными в него молекулами интегральных белков («мозаичная структура»). Одновременно были разработаны методы выделения мембранных белков [1—3]. Первым крупным успехом в развитии этого направления явилась очистка интегрального белка митохондриальной мембраны—цитохромоксидазы [4]. Позднее в виде изолированных белок-липидных комплексов удалось получить целый ряд других мембранных белков, в том числе и транспортные АТФазы: Na^{+} , K^{+} -АТФазу [5] и Ca^{2+} -АТФазу из мембраны саркоплазматического ретикулума [6]. Было установлено, что для проявления активности мембранных ферментов необходимо присутствие липидов: их удаление приводит к агрегации белка, сопровождающейся потерей ферментативной активности. Минимальное количество фосфолипидов, необходимое для поддержания белка в активном состоянии, составляет 25—30 моль фосфолипидов/моль белка.

На основании этих опытов была сформулирована концепция аннулярных (пограничных) липидов, связанных с интегральным белком и играющих специфическую роль в его функционировании. Она была подтверждена экспериментами, в которых установлено структурирующее воздействие белка на состояние липидного бислоя (это, в част-

ности, было показано методами ЭПР-спектроскопии). Кроме того, была обнаружена корреляция между критическими температурами для ферментативной активности мембранных белков и состояния их липидного окружения. Основываясь на этой концепции, неудачи, возникшие при реконструкции функций отдельных мембран в случае встраивания белков в липосомы из индивидуальных липидов (чаще всего лецитина), исследователи объясняли отсутствием специфического липидного окружения [7, 8].

Однако стали появляться факты, не соответствовавшие концепции аннулярных липидов. Так, оказалось, что гидролитическая активность Na^+ , K^+ -АТФазы может быть восстановлена самыми разными фосфолипидами кислой природы [9]. После удаления липидов Ca^{2+} -АТФазу можно было реактивировать как кислыми фосфолипидами, так и различными детергентами, причём степень реактивации хорошо коррелировала с величиной гидрофильно-липофильного коэффициента для используемых детергентов [10, 11].

Для характеристики белок-липидных взаимодействий использовали физические методы (ЭПР-спектроскопию, протонный ЯМР, флуоресцентную спектроскопию), получая противоречивые результаты. Так, измерение поляризации флуоресценции зондов, погружённых в бислой, позволяет оценить подвижность порядка 10^8 — 10^{10} с⁻¹, данные протонной и дейтериевой ЯМР-спектроскопии— 10^6 — 10^{10} и 10^4 — 10^5 с⁻¹ соответственно, в то время как ЭПР-спектроскопия характеризует движение с частотой 10^7 — 10^9 с⁻¹. Все это не позволяло сделать однозначного вывода о роли аннулярных липидов в функционировании мембранных ферментов.

Измеряя подвижность фосфолипидов в мембране саркоплазматического ретикулума, Шарпан и соавт. установили, что обмен между аннулярными и общими липидами бислоя происходит с частотой большей, чем 10^3 с⁻¹ (то есть, один оборот за 0,001 с) [12]. Число оборотов мембранных ферментов оценивается в 10^2 с⁻¹. Это означает, что превращение одной молекулы субстрата происходит за 0,01 с. Таким образом, расчёт времени жизни аннулярного слоя липидов показывает, что за время превращения ферментом одной молекулы субстрата слой липидов вокруг него успевает многократно смениться. Эти факты заставили сомневаться в том, что именно аннулярный слой липидов специфическим образом регулирует активность мембранных ферментов, скорее всего, на неё влияет состояние всей (или значительной части) липидной фазы мембраны.

Результаты опытов по реактивации мембранных ферментов различными детергентами и липидами позволяют считать, что главная функция липидов заключается в создании определенного гидрофобного окружения вокруг белка, без которого невозможно поддержание нативной конформации фермента. Степень реактивации Ca^{2+} -АТФазы, например, существенным образом зависит от толщины липидного бислоя, в который этот фермент встраивается, а при оптимальной толщине бислоя—от вязкости (упорядоченности) липидного окружения [13].

Это обусловлено, по-видимому, тем, что для осуществления ферментативной реакции молекула белка должна обладать определённой подвижностью в плоскости мембран (так называемая вращательная подвижность). Для Ca^{2+} -АТРаза вращательная подвижность, соответствующая оптимальной активности фермента, характеризуется величиной времени корреляции $\sim 5 \cdot 10^{-8}$ с [14]. Снижение вращательной подвижности (увеличение времени корреляции до $\sim 8 \cdot 10^{-4}$ с) при встраивании АТРаза в упорядоченный бислой, состоящий из динальмитоналецитина при той же температуре (0°) приводило к почти полному ингибированию ферментативной активности [14]. В этих условиях добавление детергента активировало Ca^{2+} -АТразу не за счёт её солюбилизации (Ca^{2+} -АТРаза остается встроением в мембранные фрагменты), а благодаря изменению микровязкости гидрофобного окружения, что восстанавливало вращательную подвижность почти до исходного уровня. Такого рода факты заставляют по-новому взглянуть на дискуссию, развернувшуюся в последнее время, по поводу причины вызываемых температурой переходов в мембранных ферментах.

Эти исследования начались с экспериментов, в которых была установлена корреляция между влиянием температуры на ферментативную активность и состоянием окружающего белок бислая. Было показано, в частности, что графики Аррениуса для Ca^{2+} -АТРаза имеют такой же вид, как и для параметров, характеризующих состояние бислая (измерения проводили с использованием метода ЭПР-спектроскопии и спиновых меток, погружённых в бислой на различную глубину [15]). Авторы, обнаружившие это явление, предположили, что липиды бислая при изменении температуры претерпевают фазовый переход, который резко изменяет ферментативную активность мембранных белков. Однако последующие эксперименты с использованием других физических методов (ЯМР-спектроскопии, дифракции рентгеновских лучей) показали, что липиды в мембране саркоплазматического ретикулума остаются жидкими даже при температуре 5° , хотя подвижность их жирнокислых цепей менялась с её понижением [16].

В последнее время появилась другая точка зрения, согласно которой изменения конформации мембранных ферментов при изменении температуры возникают сами по себе, а не вызываются изменением состояния бислая [17, 27]. Эта гипотеза подтверждалась тем, что использование некоторых апробированных методов (например, регистрация поляризации флуоресценции липидного зонда дифенилгексатриена) не обнаруживало критических изменений в упорядоченности липидов в мембране саркоплазматического ретикулума при температурах 10 — 40° [18]. С другой стороны, это предположение было подтверждено результатами экспериментов, в которых наблюдали зависевшее от температуры изменение конформации солюбилизированной Ca^{2+} -АТРаза при температуре 20 — 22° [17].

Подробный анализ итогов работ такого рода показал, что эту проблему нельзя считать решённой. Действительно, солюбилизован-

ные препараты мембранных ферментов часто содержат значительное количество мембранных липидов (до 30 моль липидов/моль белка), а в цитированной выше работе Andersen и соавт. [17] содержание липидов в солюбилизированных препаратах АТРа́зы проверено не было. Определение параметров, характеризующих состояние нового липид-детергентного окружения солюбилизированного белка, проводили лишь в редких случаях, и тогда в них выявлялась корреляция между температурами, при которых изменялась конформация солюбилизированного белка и свойства его гидрофобного окружения.

Анализируя состояние этой проблемы, мы пришли к заключению, что в настоящее время описаны как собственно термoinдуцированные изменения конформации мембранных ферментов (например, Ca^{2+} -АТРа́зы при 38—40° [15]), так и конформационные переходы, вызываемые изменением состояния (упорядоченности) липидного окружения (например, Na^{+} , K^{+} -АТРа́зы при температуре 20° [19]). Для цитохромоксидазы описаны оба случая [20—22]. Что касается вызванного температурой изменения конформации Ca^{2+} -АТРа́зы при температуре 20°, то этот вопрос нельзя считать окончательно решённым. Однако мы полагаем, что имеющиеся в настоящее время экспериментальные факты свидетельствуют о согласованных изменениях в области 20° как подвижности (упорядоченности) углеводородных цепей липидов, так и конформации Ca^{2+} -АТРа́зы. Поскольку известно, что в некоторых случаях эта согласованность может нарушаться (см. далее), мы склонны считать, что регуляция ферментативной активности Ca^{2+} -АТРа́зы может осуществляться за счёт изменения состояния окружающего белок липидного бислоя. В настоящем обзоре рассмотрены собственные экспериментальные данные, подтверждающие эту концепцию.

Для оценки состояний липидной фазы в мембране саркоплазматического ретикула́ма нами были избраны два независимых подхода, рекомендуемых в литературе [23—25]. Один из них связан с изменением поляризации флуоресценции дифенилгексатриена (ДФГ). После преникубации ДФГ с мембранными ферментами он обнаруживается преимущественно в области, занятой гидрофобными (жирнокислотными) цепями липидов, хотя при наличии большого количества белка и высокой концентрации ДФГ этот зонд может связываться и с гидрофобными областями белка [24]. Однако при соблюдении определённых ограничений поляризация флуоресценции ДФГ характеризует плотность упаковки углеводородных цепей бислоя. Второй подход заключается в регистрации поведения другого флуоресцентного зонда — пирена, который также располагается между цепями жирных кислот. Столкновение возбужденной и невозбужденной молекул пирена приводит к образованию эксимера, флуоресцирующего в иной области, чем мономер. Степень эксимеризации пирена зависит от того, насколько велика вероятность встречи его молекул в гидрофобном участке мембраны, что, в свою очередь, определяется не только плотностью упаковки жирнокислотных цепей липидов, но и концентрацией пирена в данном участ-

ке. Изменение плотности упаковки липидов сопровождается изменением так называемого «гидрофобного объема» мембраны, доступного для пирена, а, значит, и изменением активной концентрации пирена. Таким образом, степень эксимеризации пирена характеризует два взаимосвязанных, но неодинаково изменяющихся параметра—плотность упаковки углеводородных цепей липидов и гидрофобный объем бислоя [23, 25]. В эксперименте степень эксимеризации оценивают по соотношению пиков флуоресценции, присущих мономерной и эксимерной формам пирена. При сравнении графика Аррениуса для поляризации флуоресценции ДФГ и эксимеризации пирена в мембранах саркоплазматического ретикулума с графиком для ферментативной активности Ca^{2+} -АТФазы, локализованной в этих мембранах (рис. 1), ока-

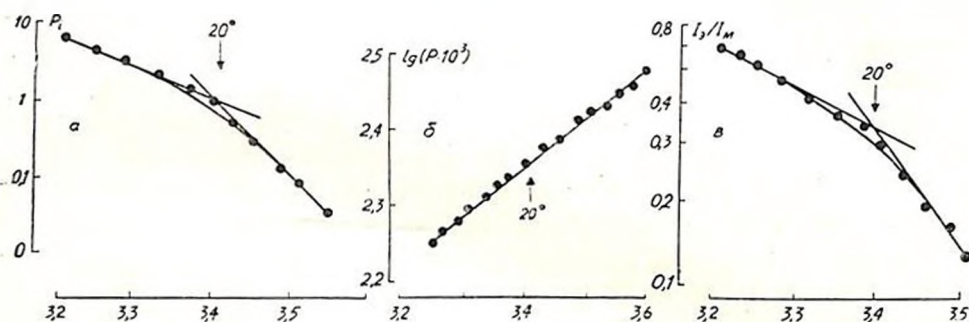


Рис. 1. График Аррениуса для гидролиза АТФ Ca^{2+} -АТФазой (а), поляризации флуоресценции дифенилгексатриена (б) и эксимеризации пирена, выражаемой соотношением флуоресценции эксимерной и мономерной форм (I_e/I_m) (в) в мембранах саркоплазматического ретикулума. По оси абсцисс— $1/T \cdot 10^{-3}$, по оси ординат— v_0 , мкмоль P_i /мг белка/мин. Подробности проведения экспериментов опубликованы ранее [41, 44, 50]

залось, что последний похож на график, описывающий температурную активность эксимеризации пирена: оба процесса зависят от температуры нелинейно, и на обоих графиках обнаруживается перегиб в одной и той же (в пределах точности измерения) области температур (20°). В то же время, зависимость поляризации флуоресценции ДФГ в координатах Аррениуса была строго линейной, что согласуется с литературными данными [18]. Поскольку последняя величина характеризует плотность упаковки углеводородных цепей в бислое, можно заключить, что в исследуемом интервале температур ($10\text{--}40^\circ$) не происходило критического изменения состояния мембранных липидов.

Поскольку графики, описывающие температурную зависимость поляризации флуоресценции ДФГ и эксимеризации пирена, различаются, вероятно, появление перегиба на графике Аррениуса для реакции эксимеризации пирена связано с изменением не плотности упаковки углеводородных цепей, а другого параметра, влияющего на степень эксимеризации,—гидрофобного объема бислоя. Сходство графиков Аррениуса для параметров эксимеризации пирена и для активности фермента также свидетельствует о корреляции между изменениями фер-

ментативной активности Ca^{2+} -АТФазы и гидрофобного объема липидного бислоя, что согласуется с полученными ранее данными о влиянии толщины мембраны и площади гидрофобных контактов фермента с липидным окружением на его активность [13].

Зависимость ферментативной активности мембранных белков от состояния (упорядоченности) липидного бислоя продемонстрирована и на другой понтранспортирующей системе— Na^+ , K^+ -АТФазе. Эта проблема была обсуждена нами ранее [19]. График Аррениуса для активности Na^+ , K^+ -АТФазы аналогичен таковому для Ca^{2+} -АТФазы (рис. 1, а). Изучение состояния липидов в препаратах Na^+ , K^+ -АТФазы с использованием различных физических методов показало, что имеется корреляция между графиками Аррениуса для ферментативной активности и для параметров, характеризующих состояние бислоя. Необходимо отметить, что для препаратов Na^+ , K^+ -АТФазы изменение состояния бислоя при температуре 20° регистрируется с использованием двух флуоресцентных методов, примененных нами и для исследования Ca^{2+} -АТФазы саркоплазматического ретикулума—поляризации флуоресценции ДФГ и степени эксимеризации пирена. По-видимому, в плазматической мембране, в отличие от мембраны ретикулума, в области 20° одновременно изменяется как гидрофобный объем, так и плотность упаковки липидов в бислой. Более того, различные воздействия, изменяющие плотность упаковки липидов, аналогичным образом изменяли и графики Аррениуса как для ферментативной активности, так и для параметров, характеризующих физическое состояние бислоя.

Важным фактором, регулирующим плотность упаковки липидов в бислой, является содержание в нем холестерина, изменение концентрации которого приводит к изменению плотности упаковки липидов, что, в свою очередь, может отразиться на активности встроенных в мембрану ферментов. Удобным объектом для изучения этих взаимоотношений являются эритроциты. В норме содержание холестерина в мембране эритроцитов колеблется, причём обнаруживается корреляция между активностью Na^+ , K^+ -АТФазы эритроцитарных мембран и содержанием в них холестерина: чем выше количество холестерина и, соответственно, выше микровязкость бислоя, тем ниже ферментативная активность [26]. Исследование больных атеросклерозом показало, что такая корреляция характерна и для эритроцитов пациентов с разной тяжестью заболевания. Мембрана эритроцитов контактирует с липопротеидами крови, являющимися переносчиками холестерина. Липопротеиды низкой плотности встраиваются в мембраны, а липопротеиды высокой плотности извлекают его оттуда. Таким образом, содержание холестерина в мембране эритроцитов определяется как его содержанием в крови, так и соотношением в ней указанных липопротеидов. Удалось создать модель зависимости активности Na^+ , K^+ -АТФазы от состояния мембраны, инкубируя эритроциты в среде с липопротеидами низкой, а затем высокой плотности. В первом случае имело место ингибирование ферментативной активности, которое

почти полностью устранялось после обработки эритроцитов липопротендами высокой плотности (рис. 2). Аналогичные эксперименты были поставлены и с Ca^{2+} -АТФазой саркоплазматического ретикулума: увеличение количества холестерина в мембране вызывало пропорциональное снижение активности этого фермента [28].

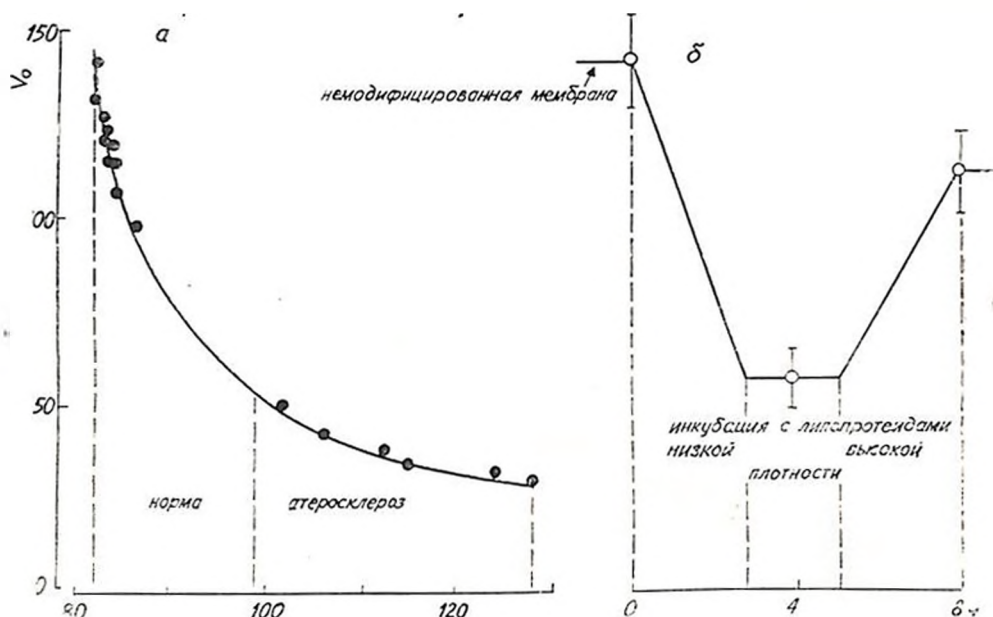


Рис. 2. Зависимость активности Na^+ , K^+ -АТФазы эритроцитов от содержания холестерина в мембранах [26] (мкмоль P_i /мг белка/ч. 10^{-2} , по оси ординат). а—корреляция между удельной активностью и соотношением холестерин/фосфолипиды (по оси абсцисс мкг/мг) в эритроцитах пациентов с разной степенью выраженности атеросклероза. б—уровень активности Na^+ , K^+ -АТФазы в нормальных эритроцитах, после их инкубации с липопротендами низкой плотности и последующей инкубации обработанных таким образом эритроцитов с липопротендами высокой плотности: по оси абсцисс—время инкубации эритроцитов с липопротендами, проводимой перед определением активности фермента

Таким образом, изменение, по крайней мере, двух параметров, характеризующих бислой—его структурной упорядоченности (микровязкости) и гидрофобного объема, может влиять на активность мембранных ферментов. Существует два способа, с помощью которых может осуществляться такое регуляторное влияние. Во-первых, изменение плотности упаковки липидного бислоя может сказаться на собственной подвижности молекулы белка. Во-вторых, что не исключает первый способ регуляции, многие мембранные белки образуют олигомерные комплексы, и изменение состояния липидной фазы, по-видимому, отражается на характере межбелковых взаимодействий в них.

Данные о формировании олигомерных комплексов транспортных АТФаз получены с использованием различных методов (некоторые из них представлены в таблице). Однако физиологическое значение олиго-

меризации пока не выяснено. Первоначально были высказаны соображения, что ионные насосы способны осуществлять транспортную функцию лишь в олигомерном состоянии [19, 29]. Однако в настоящее время появились данные о том, что мономер Ca^{2+} -насоса также может транспортировать ионы [30]. Предполагалось также, что в олиго-

Таблица

Доказательства олигомерной организации транспортных АТРаз

Способ определения функционально активной единицы	Обнаруженный феномен	Интерпретация	Ссылки
Метод молекулярной мишени	Mg Ca^{2+} -АТРазы вдвое превышают её размеры, определённые методом электрофореза в присутствии додецилсульфата; то же обнаружено для Na^{+} , K^{+} -АТРаз	В мембране транспортных АТРазы образуют димеры	[32] [19]
Электронно-микроскопический анализ	Ca^{2+} -АТРаза в мембране образует глобулы, размер которых в 2—4 раза превышает Mg индивидуальной молекулы; то же обнаружено для Na^{+} , K^{+} -АТРаз	Молекулы транспортных АТРаз образуют в мембране олигомерные ансамбли	[19, 29, 32—36]
Индуктивно-резонансный межбелковый перенос	Молекулы Ca^{2+} -АТРазы, меченные флуорофорами, составляющими донорно-акцепторную пару, при реконструкции в липосомы демонстрируют способность к резонансной миграции энергии	При реконструкции молекулы АТРазы спонтанно ассоциируют в олигомерные ансамбли	[37]
Использование сшивающих агентов	Образование межбелковых сшивок в мембранном препарате Na^{+} , K^{+} -АТРазы почек зависит от уровня их фосфорилирования	Na^{+} , K^{+} -АТРаза является тетрамером с функционально неравноценными протомерами	[38]
Кинетические исследования	по АТР для Na^{+}, K^{+}-АТРазы головного мозга в оптимальных условиях равен 3,1—3,6, а по ИТР, GTP, UTP-1; количество участков связывания Na^{+}, K^{+}-АТРазой почек разных лигандов (АТР уабанна, ванадата) вчетверо отличается от количества центров фосфорилирования фермента Ингибирование Ca^{2+}-АТРазы саркоплазматического ретикулаума реагентами на $-\text{COOH}$ и $-\text{SH}$ группы осуществляется кооперативно, так что K_i в 2—4 и более раз превышает величину константы модификации соответствующих групп фермента	Na^{+}, K^{+}-АТРаза головного мозга функционирует как тетрамер при гидролизе АТР; при использовании других субстратов протомеры комплекса работают независимо; Na^{+}, K^{+}-АТРаза почек представляет собой олигомер, содержащий 4 функционально различающихся протомера При взаимодействии с ингибиторами Ca^{2+}-АТРаза выступает как олигомер, состоящий из 2—4 и более протомеров	[19] [39] [34]

мерном состоянии ионные насосы более устойчивы по отношению к температурным и другим внешним воздействиям. Но проведённые недавно эксперименты показали, что увеличение содержания липидов в мембране со встроенной в неё Ca^{2+} -АТРазой, приводившее к диссе-

инации олигомерных комплексов, напротив, повышало термостабильность этого фермента [31]. Скорее всего, как в случае с водорастворимыми ферментами, образование олигомеров необходимо для более тонкой регуляции ферментативной активности транспортных АТФаз. В связи с этим можно выяснить, какие факторы влияют на взаимодействие белков в олигомерном комплексе и какие параметры в работе ионных насосов затрагиваются при этих изменениях.

Однако прежде мы вернёмся к вопросу, на что влияет изменение состояния липидной фазы: на свойства (подвижность) каждой белковой субъединицы или на их взаимодействие? В настоящей ситуации, когда практически нет данных о функциональном значении олигомерной конструкции транспортных АТФаз, последний вопрос требует экспериментальной проверки. Мы попытались провести её с использованием Ca^{2+} -АТФазы саркоплазматического ретикулума, измеряя вращательную подвижность этого фермента, меченого эритрозином или N-3-пиренилмаленимидом [40, 41]. Эксперименты были проведены совместно с сотрудниками Лондонского университета С. Restall, Р. Quinn и Ch. Stubbs.

При использовании Ca^{2+} -АТФазы, меченой N-3-пиренилмаленимидом, измеряли поляризацию флуоресценции, характеризующую вращательную подвижность молекулы (или той её части, к которой прикреплена метка) в диапазоне 10^6 с^{-1} . Оказалось, что в широком интервале температур (от 8 до 42°) существенных изменений этот параметр не претерпевает (рис. 3, а). Однако в области $15\text{--}35^\circ$ можно было заметить слабое, но повторявшееся от эксперимента к эксперименту снижение поляризации флуоресценции. Предполагая, что этот факт отражает определенные структурные перестройки белка, вызванные изменением температуры, мы обратились к методу флэш-фотолиза, позволяющему определить вращательную подвижность белка в диапазоне $10^5\text{--}10^3 \text{ с}^{-1}$ (особенности метода флэш-фотолиза, разобранные в лаборатории D. Chapman, подробно описаны ранее [40]). В этой серии экспериментов была измерена быстрая компонента времени корреляции (τ_1), характеризующая подвижность молекулы в микросекундной временной шкале. В этих опытах наблюдается существенное изменение подвижности белка в области температур $15\text{--}35^\circ$, что можно объяснить изменением как подвижности мономера Ca^{2+} -АТФазы, так и четвертичной структуры фермента (переходом из олигомерного в мономерное или другое менее ассоциированное состояние) (рис. 3, б).

В экспериментах с Na^+ , K^+ -АТФазой мы использовали другой подход. Известно, что протомер этого фермента состоит минимум из двух субъединиц: α -субъединицы с M_r 100 кД, имеющей АТФ-связывающий центр, и β -субъединицы—гликопротеида с $M_r \sim 45$ кД. Эксперименты последних лет (в частности, опыты со сшивающими агентами) свидетельствовали, что Na^+ , K^+ -АТФаза образует и более сложные олигомерные комплексы ($\alpha_2\beta_2$) [42]. Определяя зависимость Na^+ , K^+ -АТФазной активности от концентрации АТФ при различных

температурах и рассчитывая величину $\rho_{\parallel}$ мы обнаружили, что с понижением температуры величина этого коэффициента уменьшалась с 3,4 до 1,0 [19]. Поскольку каждая α -субъединица содержит только один АТР-связывающий центр, величина $\rho_{\parallel}$, равная 3,4, может свидетельствовать о взаимодействии в процессе гидролиза АТР 4 α -субъединиц, что соответствует (при температурах выше 20°) структуре $\alpha_4\beta_4$. При

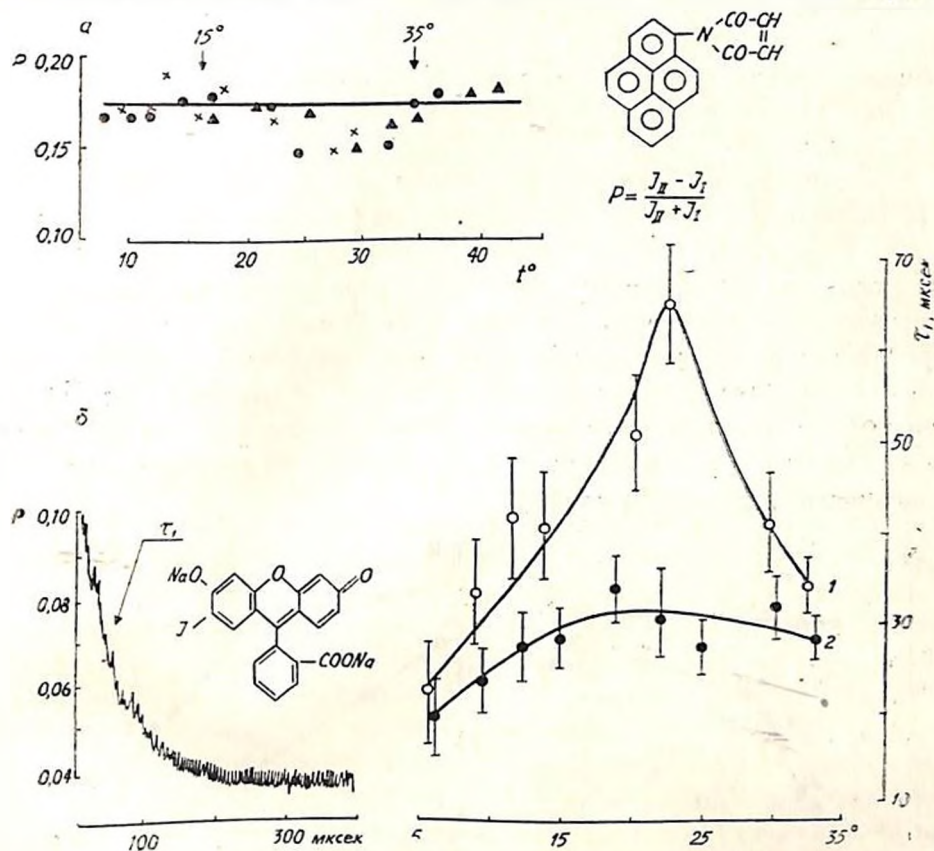


Рис. 3. Определение вращательной подвижности Ca^{2+} -АТФазы саркоплазматического ретикулума разными способами. а — измерение поляризации флуоресценции (P) препаратов, Ca^{2+} -АТФазы которых ковалентно помечена N-3-пиренилмаленимидом (приведена также структура метки и формула расчета P); условия экспериментов опубликованы ранее [44]. б — измерение поляризации (анизотропии) флуоресценции эритрозиновой метки, ковалентно связанной с Ca^{2+} -АТФазой тех же препаратов ретикулума: пример записи одной кривой, полученной методом флэш-фотолиза, и измерение величины τ_1 при разных температурах в контроле (1) и в присутствии 2 мМ АТР (2). Величины τ_1 рассчитаны из экспериментальных кривых с помощью машинной обработки [40]

температуре ниже 20° величина $\rho_{\parallel}$ близка к 1, что свидетельствует об отсутствии взаимодействия между протомерами. Необходимо отметить, что резкое изменение величины $\rho_{\parallel}$ наблюдается в области 20°, то есть при той температуре, которая резко сказывается на плотности упаковки липидов в бислой. Эти данные свидетельствуют о том, что состоя-

ние бислая может регулировать взаимодействия между протомерами в олигомерном комплексе.

Одновременно с этим было замечено, что реакция гидролиза АТФ Na^+ , K^+ -АТФазой нелинейна во времени. Через 1,5—3 мин после начала реакции скорость уменьшалась и сохраняла постоянное значение на протяжении последующих 15—20 мин. График Аррениуса для начальной фазы реакции имел перегиб при 20° , причину которого мы обсуждали выше. Вторая фаза гидролиза характеризуется линейным графиком Аррениуса [43]. Авторы, обнаружившие это явление, предположили, что существуют две изоформы фермента с различной величиной $U.A.$

Аналогичная особенность характерна и для Ca^{2+} -АТФазы. Скорость гидролиза АТФ этим ферментом изменяется во времени так же, как и в случае с Na^+ , K^+ -АТФазой. График Аррениуса для гидролиза АТФ (как и для аккумуляции Ca^{2+}) в начальной фазе реакции имеет типичный вид, обсужденный ранее (рис. 1, а). Температурная зависимость второй фазы реакции в координатах Аррениуса была линейной (рис. 4, б). Нелинейность гидролитической и Ca^{2+} -транспортирующей активностей во времени проявлялась лишь в температурном интервале 15— 35° , то есть в той области, в которой было обнаружено изменение подвижности Ca^{2+} -АТФазы [44].

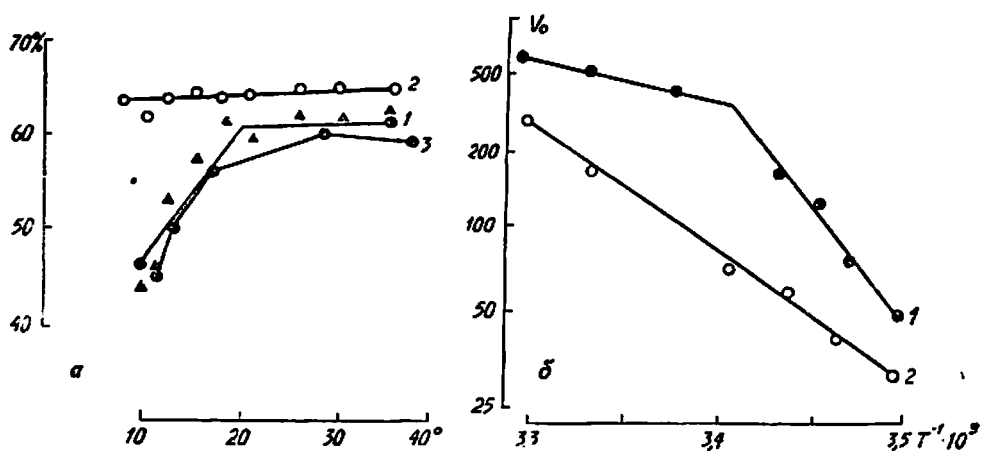


Рис. 4. Температурная зависимость тушения флуоресценции триптофанильных радикалов Ca^{2+} -АТФазы ретикулума (а) в контроле (1) и в присутствии 1,5 мМ АТФ (2) или ГТФ (3) и активности Ca^{2+} -АТФазы (в $\mu\text{моль Ca}^{2+}/\text{мг белка}/\text{мин}$, по оси ординат) тех же препаратов (б), измеренной по начальной скорости до и после преникубации фермента с 1,5 мМ АТФ (-1- и -2- соответственно)

Эти факты позволили нам предположить, что после взаимодействия Ca^{2+} -АТФазы с АТФ происходило медленное изменение конформации фермента, причем в новом конформационном состоянии фермент, по-видимому, не обладал чувствительностью к изменению фазового состояния бислая. Нельзя исключить, что это изменение конформации пред-

ставляет собой переход фермента в иное олигомерное состояние, происходящее под влиянием АТР.

Мы обратили внимание на тот факт, что перегибы на кривых, описывающих нарастание количества продукта ферментативной реакции во времени (как для Na^+ , K^+ -АТРазы, так и для Ca^{2+} -АТРазы) появляются лишь в том случае, если в качестве субстрата используют АТР в миллимолярных концентрациях. Другие субстраты транспортных АТРАЗ—GTP, ITP, UTP, как и АТР в низких концентрациях,—гидролизуются линейно.

Эти данные вновь обращают внимание на значение АТР, как модификатора транспортных АТРАЗ, впервые отмеченное в конце 60-х годов для Na^+ , K^+ -АТРазы J. Skou, который сравнивал гидролиз двух субстратов: АТР и ацетилфосфата. Оба вещества представляют собой макроэргические соединения, способные обеспечивать образование промежуточного фосфорилированного производного Na^+ , K^+ -АТРазы. Однако активный транспорт ионов был обнаружен лишь в том случае, когда фермент использовал в качестве субстрата АТР, ацетилфосфат же гидролизвался «вхолостую». Skou [45] заключил, что АТР является не только субстратом Na^+ , K^+ -АТРазы, но и модифицирует фермент, причем другие соединения, гидролизующиеся Na^+ , K^+ -АТРАЗой, модифицирующим действием не обладают.

Позднее было установлено, что гидролиз АТР транспортными АТРАзами не описывается уравнениями Михаэлиса-Ментен, в то время как UTP, GTP, ITP и ацетилфосфат гидролизуются теми же ферментами в соответствии с классической «гиперболической» кинетикой [19, 34, 46]. Это подтверждало, что АТР проявляет дополнительное, модифицирующее действие. Однако как осуществляется этот эффект АТР—путем непосредственного влияния нуклеотида на белок или посредством его воздействия на липидный бислой мембраны—оставалось неясным. Выбрать одну из этих возможностей мы могли лишь после сравнительного исследования действия АТР на липидный бислой и на конформацию фермента (например, Ca^{2+} -АТРазы).

Для этой работы были использованы различные флуоресцентные методы: поляризация флуоресценции ДФГ, эксимеризация пирена, флуоресценция дансильного радикала, ковалентно связанного с фосфатидилэтаноламинном бислоем, флуоресценция пиренильного радикала, ковалентно связанного с Ca^{2+} -АТРАЗой, а также собственная флуоресценция Ca^{2+} -АТРазы. Следует отметить, что различные области мембраны характеризовались неодинаковым температурным поведением. Если в гидрофобной части бислоя вызванные температурой перестройки происходили при 20° , то поверхности бислоя и молекулы Ca^{2+} -АТРазы характеризовались наличием двух критических температур. 15 и 35° . В гидрофобной области белка мы не обнаружили резких конформационных перестроек в интервале температур $8\text{--}40^\circ$ [47].

Во всех перечисленных случаях АТР не оказывал влияния на термoinдуцированные перестройки мембраны. Мы предположили, что

АТР изменяет характер белок-липидных взаимодействий, вследствие чего, невзирая на изменения, происходящие в бислое, не происходят конформационные сдвиги белка, сказывающиеся на активности ферментативного белка, то есть он перестает реагировать на изменения, происходящие в гидрофобной области липидного бислоя.

Для подтверждения этой концепции мы использовали метод индуктивно-резонансного переноса энергии с остатков триптофана, находящихся в гидрофобной части молекулы Ca^{2+} -АТРазы, на пирен, локализованный между углеводородными цепями липидов [41]. Оказалось, что эффективность переноса энергии, измеряемая по тушению собственной флуоресценции белка (донора энергии) при добавлении к мембранам ретикулума пирена (акцептора энергии) почти не изменялась при снижении температуры от 40 до 20° (рис. 4, а). Дальнейшее понижение температуры сопровождалось уменьшением эффективности переноса. Так, если в интервале температур от 40 до 20° интенсивность флуоресценции белка была снижена на 60—65%, то при температуре 18° эффективность переноса составляла лишь 40%, а при 10—12°—25—30%. Резкое снижение эффективности переноса энергии при температурах ниже 20° может быть обусловлено уменьшением доступности для молекул пирена триптофанилов белка вследствие образования в этих условиях тесных белковых ассоциатов [23, 33, 41, 47].

В присутствии АТР в высоких концентрациях эффективность тушения собственной флуоресценции Ca^{2+} -АТРазы в области высоких температур не изменялась. Однако резкого снижения эффективности переноса, наблюдаемого в среде без АТР при температурах ниже 20°, в этом случае не происходило (рис. 4, а). Добавление в кювету 1,5—3 мМ АТР приводило к тому, что при температурах от 8 до 40° степень тушения флуоресценции составляла 60—70% [41]. Низкие концентрации АТР (10—100 мкМ) или 1,5—2,5 мМ GTP такого действия не оказывали.

Снижение эффективности переноса энергии в среде без АТР при низких температурах свидетельствует об уменьшении белок-липидных контактов в мембране, причем АТР препятствует такому изменению.

В независимых экспериментах по изучению конформации Ca^{2+} -АТРазы с использованием SH-реагентов в нашей лаборатории было установлено, что АТР менял конформацию фермента, по-видимому, изменяя его четвертичную структуру [34].

Суммируя вышеизложенное, мы можем заключить, что действие АТР направлено на изменение конформации транспортных АТРАЗ (возможно, их четвертичной структуры), что приводит к изменению характера белок-липидных взаимодействий и освобождает фермент от контроля со стороны липидной части мембраны.

Подтверждением этого вывода являются эксперименты, в которых определяли температурную зависимость Na^+ , K^+ -АТРазы после обработки препарата фосфолипазой С. Такая обработка приводила к выпрямлению температурной зависимости в координатах Аррениуса,

но не устраняла индуцируемого температурой изменения состояния бислоя (график Аррениуса для параметра, характеризующего подвижность углеводородных цепей бислоя, сохранял перегиб). Другими словами, обработка мембран фосфолипазой С не влияла на характер ответа липидной фазы на изменение температуры, но приводила к нарушению белок-липидных взаимодействий таким образом, что Na^+ , K^+ -АТРаза переставала на них реагировать [48]. Этот факт еще раз подтверждает, что конформация белка изменяется не непосредственно под влиянием температуры, а в результате изменения состояния липидной фазы. Таким образом, олигомерная организация ионных насосов предоставляет возможность для регуляции ферментативной активности за счет изменения плотности упаковки липидов в мембране или гидрофобного объема липидного окружения.

В заключение следует сказать, что рассмотрение межбелковых взаимодействий в качестве механизма регуляции работы мембранных ферментов не ограничивает роль липидов мембраны лишь созданием определенной специальной среды, в которой функционирует фермент, а отводит им решающее место в обеспечении приспособительной реакции клетки [49].

Авторы признательны акад. С. Е. Северину (МГУ) за плодотворную дискуссию, проф. D. H. Chapman (Лондонский университет) за предоставленную возможность проведения ряда экспериментов в его лаборатории, а также коллегам С. Restall, Ch. Stubbs и P. Quinn, с которыми были проведены и обсуждены эти эксперименты.

MEMBRANE LIPIDS AS REGULATORS OF PROTEIN-PROTEIN INTERACTIONS

BOLDYREV A. A., LOPINA O. D., PROKOPIEVA V. D.

Chair of Biochemistry, I. V. Lomonosov State University, Moscow

Paper reviews the means by which membrane lipid phase may regulate the work of Na^+ and Ca^{2+} pumps. The categories of "microviscosity" and "hydrophobic volume" are defined. It's demonstrated that these two categories are interconnected, temperature is of polar effect on them and they are essential for the regulation of protein-protein interactions in the oligomeric conformations of transport ATPases. Evidence is brought that ATP abolishes the control of lipid phase on the operation of transport ATPases.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Chapman D., Byrne P. Proc. Roy. Soc., Ser. A., v. 290, p. 115—142, 1966.
2. Singer S., Nicholson G. Science, v. 175, p. 720—731, 1972.
3. Helenius A., Simons K. Biochim. et biophys. acta, v. 415, p. 29—79, 1975.
4. Jost P., Griffith O., Capaldi R., Vanderkooi G. Biochim. et biophys. acta, v. 311, p. 141—152, 1973.

5. Dixon J. F., Hokin L. E. Arch. Biochem. and Biophys., v. 163, p. 749—758, 1974.
6. Mac Lennan D. H. J. Biol. Chem., v. 245, p. 4508—4518, 1970.
7. Jost P., Griffith O.—In: Biomol. Struct. and Funct. (ed. by P. Agris), p. 25—54, Acad. Press., N. Y.—S. F.—L., 1978.
8. Дергунов А. Д., Капрелянц А. С., Кабишев А. А., Симакова Н. М., Молчанов М. И., Островский Д. Н. Биохимия, т. 47, с. 296—304, 1982.
9. Roelofsen B. Life Sci., v. 29, p. 2235—2247, 1981.
10. Warren G., Metcalfe J. Biochem. Soc. Trans., v. 5, p. 517—520, 1977.
11. Melgunov V. I., Akimova E. I. FEBS Lett., v. 121, p. 235—238, 1980.
12. Chapman D. H.—In: Biological Membranes, v. 4, p. 179—230, Acad. Press., L. C. A., 1982.
13. Johansson A., Keightley C., Smith G., Richards Ch., Heskeith T., Metcalfe I. J. Biol. Chem., v. 256, p. 1643—1650, 1981.
14. Hidalgo C., Thomas D., Ikemoto N. J. Biol. Chem., v. 253, p. 6879—6887, 1978.
15. Inesi G., Millman M., Eletre S. I. Molecular Biol., v. 81, p. 483—504, 1973.
16. Davis D. G., Inesi G., Gulik-Krzyawicki T. Biochemistry, v. 15, p. 1271—1276, 1976.
17. Andersen J. P., LeMaire M., Moller J. V. Biochim. et biophys. acta, v. 603, p. 84—100, 1980.
18. Madden T. D., Quinn P. J. FEBS Lett. v. 107, p. 110—112, 1979.
19. Болдырев А. А.—В кн.: Итоги науки и техники, сер. Биологическая химия, т. 17, с. 75—144, 1982.
20. Yoshida S., Orii Y., Kawato S., Ikegami A. J. Biochem., v. 86, p. 1443—1450, 1979.
21. Kawato S., Ikegami A., Yoshida S., Orii Y. Biochemistry, v. 19, p. 1598—1603, 1980.
22. Kawato S., Yoshida S., Orii Y., Ikegami A., Kinoshita K. Jr., Biochim. et biophys. acta, v. 634, p. 85—92, 1981.
23. Владимиров Ю. А., Добрецов Г. Е. Флуоресцентные зонды в исследовании биологических мембран, М., Наука, 1980.
24. Kinoshita K., Kawato S., Ikegami A., Yoshida S., Orii Y. Biochim. et biophys. acta, v. 647, p. 7—17, 1981.
25. Vanderkooi J. M., Calles J. B. Biochemistry, v. 13, p. 4000—4006, 1974.
26. Ходжакулиев Б. Г. Активность Na^+ , K^+ -АТФазы в мембранах эритроцитов у больных ишемической болезнью сердца с наличием коронарного атеросклероза, канд. дис., М., 1980.
27. Dean W. L., Tanford C. Biochemistry, v. 17, p. 1683—1690, 1978.
28. Madden T. D., Chapman D., Quinn P. J. Nature, v. 279, p. 538—541; 1979.
29. Klingenberg M. Nature, v. 290, p. 449—454, 1981.
30. Møller J. V., Andersen J. P., Jørgensen P. L. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., v. 363, p. 462—463, 1982.
31. Щербакова Н. С., Ритов В. Б., Тарховецкий Ю. С., Козлов Ю. П. Биохимия, т. 45, с. 1503—1508, 1980.
32. Møller J. V., Andersen J. P., Le Meire M.—Mol. and Cell. Biochem., v. 42, p. 83—107, 1982.
33. Rice D. M., Meadows M. D., Scheinman A. O., Goni F. M., Gomes-Fernandez J., J. C., Moscarello M. A., Chapman D., Oldfield B. Biochemistry, v. 18, p. 5933—5903, 1979.
34. Рубцов А. М. АТФ как субстрат и регулятор Са-АТФазы саркоплазматического ретикулума, канд. дис., М., 1982.
35. Jørgensen P. L. Biochim. et biophys. acta, v. 694, p. 27—68, 1982.
36. Джанджугазян К. Н. Структурно-функциональные исследования Na , K -АТФазы из почек свиньи, автореф. канд. дисс., М., 1982.
37. Vanderkooi J., Jeronimas A., Nakamura H., Martonosi A. Biochemistry, v. 16, p. 1262—1267, 1977.

38. Askari A., Huang W. H., Anticau J. M. *Biochemistry*, v. 19, p. 1132—1140, 1980.
39. Hansen O., Jensen J., Norbi J., Ottolenghi P. *Nature*, v. 280, p. 410—412, 1979.
40. Restall C., Arrondo L., Elliot D., Jaskowska A., Weber W., Chapman D. *Biochim. et biophys. acta*, v. 670, p. 433—440, 1981.
41. Boldyrev A. A., Lopina O. D., Prokopjeva V. D., Stubbs Ch., Quinn P. *Biochem. Int.*, v. 6, p. 297—305, 1983.
42. Winter C. G., Moss A. J.—In: Na, K-ATPase. Structure and kinetics (ed. by Skou J. C., Norby J. G.), p. 25—32, L., N.-Y. San Francisco, 1978.
43. Grisar T., Franck G., Schoffentels E. *Neurochim. Int.*, v. 2, p. 311—320, 1980.
44. Прокопьева В. Д. Оценка роли различных областей мембраны в обеспечении модифицирующего действия АТФ на Са-АТФазу саркоплазматического ретикула, канд. дисс., М., 1982.
45. Skou J. Ch. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, v. 242, p. 168—184, 1974.
46. Boldyrev A. A., Svinukhova I. A. *Biochim. et biophys. acta*, v. 707, p. 167—170, 1982.
47. Прокопьева В. Д., Лопина О. Д., Болдырев А. А. *Биофизика*, т. 28, с. 40—44, 1983.
48. Boldyrev A. A. *Studia biophys.*, v. 84, p. 153—160, 1981.
49. Кренс Е. М. Липиды клеточных мембран, Л., 1981.

Поступила 11. X. 1983: