

УДК 577.153

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАСТВОРИМОЙ H^+ -АТРАЗЫ МИТОХОНДРИЙ ГОЛОВНОГО МОЗГА БЫКА

КОРЯГИН А. С.

Кафедра биохимии Горьковского медицинского института

Характерной особенностью мозговой ткани является постоянный и высокий уровень энергетического обмена с интенсивным потреблением глюкозы и кислорода. По активности окислительных процессов мозг занимает ведущее место среди других органов и тканей, потребляя до 20—25% всего кислорода, поступающего в организм [1]. Основное количество АТР мозг получает в процессе окислительного фосфорилирования. Ферментной системой, осуществляющей синтез АТР в этом процессе, является митохондриальная АТР-синтетаза (F_0F_1 -АТРаза или H^+ -АТРаза). Осуществление АТР-синтетазной и АТР-гидролазной реакций связывают с самым высокомолекулярным белковым компонентом H^+ -АТРазного комплекса—растворимой H^+ -АТРазой (сопрягающий фактор F_1 или F_1 -АТРаза) [2]. F_1 -АТРаза различных организмов имеет сложную олигомерную структуру и состоит из пяти типов субъединиц: α , β , γ , δ , ϵ [3].

Большинство работ по изучению физико-химических характеристик, кинетики и регуляторных свойств этого фермента выполнены на препаратах сердца и печени. Данные о сопрягающем факторе F_1 из головного мозга отсутствуют, хотя эти сведения для нервной ткани имеют особое значение.

Целью настоящего исследования явилось изучение физико-химических характеристик растворимой H^+ -АТРАЗЫ, выделенной из головного мозга.

Растворимую H^+ -АТРАЗу (КФ 3.6.1.3) выделяли из митохондрий головного мозга быка по методу Horstman, Racker [4] в нашей модификации [5]. Для оценки гомогенности препарата применяли метод электрофореза в 5%-ном ПААГ, приготовленном на буфере трис-НСl, pH 7,5 [6]. Окраску гелей проводили 0,25%-ным раствором Кумасси R-250. Величину M_r субъединиц определяли методом электрофореза по Laemmli [7]. Активность фермента оценивали pH-метрическим методом [8]. Инкубационная смесь содержала (в мм): АТР—2, $MgSO_4$ —2, трис-НСl—3, pH 8,3. В пробу конечным объемом 7 мл вносили 10—15 мкг белка. АТРАЗную реакцию регистрировали в течение 1—2 мин.

При исследовании влияния олигомицина на активность фермента его добавляли в инкубационную среду в конечной концентрации 1,5 мкг/мл. Реакцию регистрировали через 2 мин после введения в ячейку олигомицина. Изучение действия водорастворимого карбоднимид (ЦМКД) проводили методом преникубации фермента в среде следующего состава: 0,25 М сахараза, 0,25 мМ ЦМКД, 10 мМ трис-НСl, pH 7,0 при 20°. Количество инкубируемого белка соответствовало 0,5 мг в объеме 0,5 мл. Активность регистрировали через 20, 40, 60 мин после начала преникубации. Влияние 2,4-динитрофенола (ДНФ) исследовали в инкубационной среде, содержащей (в мМ): ДНФ—2, АТФ—2, $MgSO_4$ —2, трис-НСl—3, pH 7,5.

Оценивая чистоту полученного препарата, определяли его гомогенность по наличию в геле одной полосы. Степень очистки фермента по сравнению с перзичным неочищенным препаратом равна ~ 11 . У.А. фермента составила 16—24 мкмоль P_i /мин на мг белка.

Установлено, что митохондриальная F_1 -АТРаза мозга имеет олигомерную структуру и содержит пять типов субъединиц: α , β , γ , δ , ϵ (рис. 1) с M_r 53, 50, 29, 19, 11,8 кД соответственно. Из данных денситометрии выявлено количественное соотношение субъединиц $\alpha:\beta:\gamma:\delta:\epsilon$ как 3:3:1:1:1. Учитывая полученные данные по величине M_r и стехиометрии субъединиц, рассчитана M_r исследуемого фермента, которая составила 370 кД. Подобная величина приводится для M_r F_1 -АТРаза из митохондрий сердца быка [9].

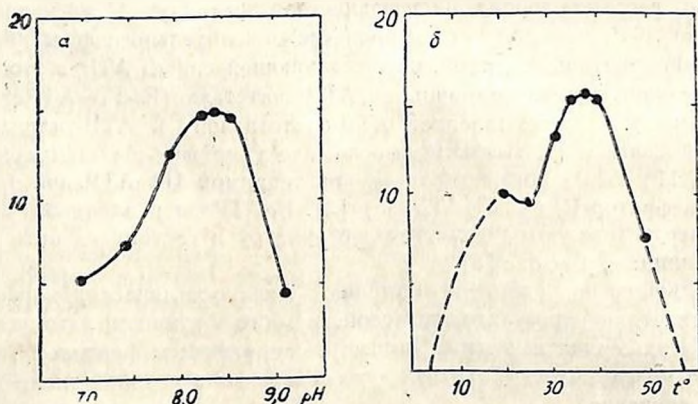


Рис. 2. Зависимость АТРазной активности фактора F_1 от pH среды (а) и температуры среды (б). По оси ординат—активность в мкмоль P_i /мин/мг белка

Проведенные исследования показали, что митохондриальная растворимая H^+ -АТРаза не чувствительна к олигомицину и ингибируется ЦМКД. Водорастворимый карбоднимид вызывает к 60 мин после начала преникубации ингибирование АТРазной активности примерно на 40%. Близкая степень ингибирования ферментативной активности ЦМКД показана для АТРаза из сердца быка [10].

Изучение влияния ДНФ на F_1 -АТразу мозга показало отчетливую (до 67%) стимуляцию начальной скорости АТРазной реакции. До

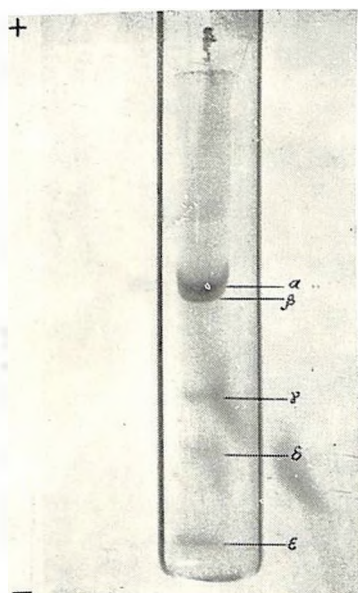


Рис. 1. Электрофорез растворимой H^+ -АТРаза в ПААГ в присутствии $DDC \cdot Na$

сих пор не ясен механизм этого увеличения каталитической активности, обнаруженного также в отношении фермента из других тканей. По мнению Акименко и соавт. [11], стимулирующее действие ДНФ не связано с истинной активацией фермента, а обусловлено снятием торможения, вызываемого ADP—продуктом АТРазной реакции.

Исследование влияния pH среды на активность фермента показало, что смещение pH в щелочную сторону до 8,5 повышает АТРазную активность. Дальнейшее увеличение pH приводит к быстрому снижению активности фермента (рис. 2, а). Полученные результаты соответствуют подобным данным для фактора F₁ из других тканей [12, 13].

При определении зависимости активности фермента от температуры выявлено уменьшение активности в интервале от 20 до 25°. Максимальную активность наблюдали при 37°. Дальнейшее повышение температуры до 50° приводит к уменьшению активности фермента (рис. 2, б). Аналогичную двухфазную температурную зависимость имеет растворимая АТРаза из сердца быка [14].

Приведенная физико-химическая характеристика растворимой митохондриальной H⁺-АТРазы головного мозга быка—олигомерная организация, субъединичный состав, величина M_r, температурный и pH оптимумы ферментативной активности—позволяют сделать заключение о сходстве её свойств с F₁-АТРазами, выделенными из других тканей.

PHYSICO-CHEMICAL CHARACTERISTIC OF SOLUBLE H⁺-ATPase FROM BRAIN MITOCHONDRIA

KORYAGIN A. S.

Chair of Biochemistry, Medical School, Gorky

The soluble H⁺-ATPase from bovine brain has been investigated. Judged by SDS-PAAG electrophoresis the purified ATPase contained α , β , γ , δ and ϵ subunits. The dependence of the ATPase activity from pH and temperature is established. The properties of the soluble H⁺-ATPase from bovine brain are similar with those of ATPase from other tissues.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Нейрохимия (под ред. М. И. Прохоровой), Л., ЛГУ, 1979.
2. Козлов Н. А., Черняк Б. В.—В кн.: Успехи биологической химии, т. 24, с. 65—82, М., Наука, 1983.
3. Kagawa Y., Sone N., Hirata H., Yosida M. J. Bioenerg. and Biomembr. 11, № 3/4, p. 39—78, 1979.
4. Horstman L. L., Racker E. J. Biol. Chem., v. 245, p. 1336—1344, 1970.
5. Хаатова Е. М., Новикова Н. А., Корягин А. С. Автор. свид. на изобрет. № 1070479, кл. G 01 N 38/50.
6. Маузер Г. Диск-электрофорез. Теория и практика электрофореза в полиакриламидном геле. М., Мир, 1971.
7. Laemmli U. K. Nature, v. 227, p. 114—125, 1970.

8. Болдырев А. А., Лебедев А. В., Ритов В. Б. Вopr. мед. химии, т. 15, с. 622—626, 1969.
9. Knowles A. F., Ginefsky H. S. J. Biol. Chem., v. 247, p. 6624—6630, 1972.
10. Имедидзе Э. А., Козлов Н. А., Метельская В. А., Мильгрюн Я. М. Биохимия, т. 43, с. 1404—1412, 1978.
11. Акименко В. К., Минков Н. Б., Виноградов А. Д. Биохимия, т. 36, с. 655—658, 1971.
12. Акименко В. К., Минков Н. Б., Бакеева Л. Е., Виноградов А. Д. Биохимия, т. 37, с. 348—359, 1972.
13. Noustek J., Drahota Z. Biochem. et biophys. acta, v. 484, p. 127—139, 1977.
14. Киядзе А. А., Евтодченко Ю. В., Сухомудренко А. Г. Биофизика, т. 25, с. 232—233, 1980.

Поступила 5. IV 1985

Н О В Ы Е К Н И Г И

Neurotransmitters in Action (ed. by David Bausfield), Elsevier Biomedical Press, Amsterdam—New York, Oxford, 1985.

В сборнике представлены статьи, в которых освещены наиболее выдающиеся успехи последних лет в понимании химических основ передачи нервного импульса. Большинство из них охватывает механизмы «существования» различных нейротрансмиттерных систем, действия субстанции Р — первого нейронервотрансмиттера пептидной природы, опиоидных пептидов — семьи нейронервотрансмиттеров и рецепторов. Ряд статей посвящен роли дофамина в патологии нервной системы, функции нейронервотрансмиттеров в поведенческих реакциях в норме и патологии и т. д.

Aging of the Brain (ed. by W. H. Gispen and S. Traber), Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 1984.

Сборник материалов 1-го Международного симпозиума по проблемам старения мозга, состоявшегося 16—18 ноября 1982 г. в Кologne, ФРГ. Симпозиум освещал вопросы морфологических и нейрохимических коррелятов старения, пластичности и регенерации, циркуляции и метаболитических коррелятов в функции мозга, поведенческих коррелятов у животных и человека, старческих заболеваний.