

НЕЙРОХИМИЯ

т. 6, № 4, 1987

УДК 612.822.1.015

Н+-АТРаза МЕМБРАН СИНАПТИЧЕСКИХ ПУЗЫРЬКОВ МОЗГА: ИДЕНТИФИКАЦИЯ И ХАРАКТЕРНЫЕ СВОИСТВА СИСТЕМЫ ТРАНСПОРТА_Н*

МЕЛЬНИК В. И., ГЛЕБОВ Р. Н.

НИИ общей патологии и натологической физиологии АМН СССР, Москва

Исследовано участие АТРазы мембран синаптических пузырьков мозга крыс и активном транспорте II⁺, который измеряли с помощью флуоросцентного амина акридиноранжа. АТР-зависимый транспорт II⁺ устранялся N-атилмалемиидом (NEM), а АТРазная активность разделялась на два компонента, отличающихся по чувствительности к ингибитору.

Основной компонент (74%) чувствителен к NEM и идентифицирован как H+-АТРаза на основании следующих критериев: а) совместная с Н+-насосом очистка во время выделения мембран: б) идентичная с ним чувствительность к NEM; в) избирательная стимуляция активности в присутствии СІ- или разобщителей; г) близость характеристик к таковым Н+-насоса-К_{та} для Mg-ATP (0,64 мM) и рН-онтимум (6,0). Найдено, что максимальные градиенты рН-генерируются при рН 7,5-8,0, где активность H+-насоса сильно лимитируется визой концентрацией П1.

Минорный компонент АТРазной активности полностью устойчив к действию NEM и проявлял К_{та} для Mg-ATP=0,10 мМ и широкий рН-оптимум в щелочной области.

Кислая среда внутри синаптических пузырьков (СП) нервной ткани, необходимая для поддержания их нормальных функций (активности локализованных там ферментов, процессов сопряженного транспорта медиаторов и их предшественников), поддерживается мембранным H+-насосом за счет энергии АТР [1, 2]. H+-насос СП отличается от H+-насосов классического митохондриального типа устойчивостью к олигомицииу, меньшей чувствительностью к дициклогексилкарбоднимиду и высокой чувствительностью к NEM [1]. Этими свойствами он близок к протонным насосам секреторных гранул и других органелл кислого компартмента клетки: лизосом, эндосом, «одетых» везикул и аппарата Гольджи [3].

Транспорт H⁺ через мембрану СП является АТР-зависимым, что предполагает участие соответствующей H⁺-АТРазы. Механизм сопряжения между гидролизом АТР и транслокацией H⁺ не может быть выясиен без кинетической характеристики обеих активностей—АТРазной и транслоказной. Однако АТРазная активность СП. особенно в неочищенных препаратах [1, 4], явно гетерогенна, а применяемые пигибиторы в большинстве случаев недостаточно специфичны.

В настоящей работе исследовали возможность применения NEM для избирательного выявления активности H⁺-АТРазы мембран СП. В низких концентрациях NEM полностью блокирует транспорт H⁺ [1] и частично ингибирует АТРазную активность [5, 6]. Результаты поклзывают, что в выбранной нами системе измерения NEM проявляет свойства специфического ингибитора H⁺-АТРазы. Идентификацию NEM-чувствительного компонента в качестве H⁺-АТРазы подтверждает совместное с активностью H⁺-насоса обогащение в процессе очистки мембран СП и идентичность их функциональных и кинетических свойств.

Необходимой частью работы было изучение кинетических свойств H^+ -насоса. При этом потребовалось уточнить существующие методические подходы, основанные на использовании проникающих слабых оснований, в частности флуоресцентного амина акридиноранжа (АО). Проведенный кинетический анализ показал, что система транспорта H^+ в СП активируется субстратом транспорта— H^+ , причем максимальная активация наблюдается при рН 6,0. В то же время градиент рН (ΔpH) достигает максимальной величины в физиологической, слабощелочной области рН 7,5—8,0.

Матерналы и методы

Очищенные мембраны СП мозга получали после осмотического шока неочишенной фракции синаптосом, применяя условия центрифупрования, предложенные в работе March, Thornton [7]. Ткань целого мозга крыс массой 200-250 г промывали в среде выделения (0.32 М сахароза, 10 мМ трис-HCl, рН 7,4 при 4°) и размельчали за 4 «хода» тефлонового пестика в стеклянном гомогенизаторе (зазор 0,2 мм, скооость вращения 500 об/мин) в 6-8 объемах среды. Гомогенат центрифугировали 10 мин при 1000 g, супернатант сливали, а осадки повторио гомогенизировали и центрифугировали. Объединенные супериатанты центрифугировали 10 мин при 10000 g. Полученный осадок исочищенных синаптосом суспендировали в 8 объемах бидистиллированной воды н гомогенизировали в том же гомогенизаторе (3 «хода» пестика. 1500 об/мин). Последовательным центрифугированием лизата (55000 g, 60 мин, снова 55000g, 60 мин и 100000g, 75 мин) получали три осадка субклеточных фракций Ф1, Ф2 и Ф3 соответственно. Последняя фракция представляла собой очищенные мембраны СП. Осадки суспендировали в среде выделения до концентрации белка 2-4 мг/мл и хранили небольшими аликвотами при -20° в течение 1-2 недель.

Активность H⁺-насоса измеряли методом непрерывной регистрации трансмембранного ΔрН с помощью Флуоресцентного слабого основания АО [1, 8]. Измерения проводили в кварцевых кюветах спектрофлуорометра «Hitachi MPF-4» (Япония) при длинах воли возбуждения и испускания 491 и 530 им соответственно. Среда измерения (конечный объем 2 мл) содержала 2 мкМ АО в 150 мМ КСІ, 20 мМ НЕРЕЅ/трис pH 7,4 при 25°. После 4 мин преинкубации белка (8—15 мкг/мл для Фз) инициировали транспорт Н⁻¹ добавлением 1 мМ Mg-АТР (эквимоляриая смесь MgSO4 и трис-АТР, pH 7,4) и после снижения флуоресценции АО до стационарного уровня добавляли 10 мкл 2 M (NH4)2SO4 для обращения флуоресцентного ответа (рис. 1). Устраняя ДрН, добавлекие соли аммония позволяет точно определить исходный уровень флуоресценции (Fe) с учетом изменения. вызванного неспецифическим (такой же эффект оказывает АDP) взаимодействием зонда с АТР в момент внесения последиего [1].

Величину У. А. Н⁺-насоса в стандартных условиях измерения выражали из относительной величины изменения флуоресценции АО. Скорость транспорта принимали равной начальной скорости тушения Флуоресценции АО (—dF/dt, диапазон линейности—до 25 мкг белка/мл) в мин^{-г.}мг⁻¹, а величину стационарной аккумуляции H⁺—отношению потушенной флуоресценции зонда к испотушениой (F₀—F)/F, диапазон линейности—до 13 мкг белка/мл) в мг⁻¹. Эти величины пропорциональны изменениям концентрации H⁺ внутри везикул при поддержании постоянного рН среды [8].

Измерение АТРезных и АМРазной активностей. Общую Mg²⁺-АТРазную активность измеряли при инкубации белка (15—25 мкг/мл) в течение 30 мин в присутствии 2 мМ Mg-АТР в такой же среде, что и аля транспорта H⁺, только без АО (рН 7,4 при 37°). В части опытов вместо КСІ среда содержала NaCl либо 0,3 М сахарозу. Олигомициичувствительную АТРазную активность определяли как активность, ингибируемую 0,5 мкг/мл олигомицином, а NEM-чувствительную—как активность, ингибируемую 0,2 мМ NEM. Na⁺, К⁺-АТРазную активность определяли как разность в отсутствие и в присутствии 1 мМ уабаина в среде, содержащей 2 мМ Mg-АТР, 130 мМ NaCl. 20 мМ КСl, 20 мМ НЕРЕЅ/трис (рН 7,4 при 37°).

Активность кислой АМРазы (кислой 5'-нуклеотидазы, маркера лизосом) [9] измеряли при инкубации белка (0,8 мг/мл) в течение 30 мин в присутствии 5 мМ Mg.АТР (эквимолярная смесь MgCl₂ и Na₂AMP) в 0,1 M Na⁺-ацетатном буфере (рН 5,0 при 37°).

АМР- и АТРазные реакции инициировали добавлением субстратов (конечный объем 1 мл) после 20 мин преинкубации белка в присутствии или в отсутствие ингибиторов и ионофоров. Реакции останавлитали и определяли содержание образовавшегося при гидролизе субстратов Рі добавлением 1 мл свежеприготовленного реактива, состоящего из следующих компонентов: 10%-ный ДДС-№а, 2 М ацетатный буфер, приготовленный титрованием трисом до рН 4.3 0,1 М СиSO4, 2%-ный молибдат аммония и 10%-ная аскорбниовая кислота в соотношении 1:8:0,1:1:0,2. Реактив слобилен на льду 30—40 мин после добавления аскорбата. Через 25 мин при компатной температуре (или при 37° в тех случаях, когда необходимо предупредить выпадение осад-

519

ка ДДС-К) измеряли экстинцию проб при 735 им. Содержание Ра рассчитывали, исходя из прироста экстинции, вызванного присутствием в инкубировавшихся параллельно «холостых» (белок добавляли после остановки реакции) пробах 200 имоль КН₂PO₄ в полной среде инкубации, включающей АТР или АМР, которые, как и КСІ, занижают окраску ([10] и собственные данные), обусловленную восстановлением фосфомолибдатного комплекса.

Материалы. Использовали АО, NEM, олигомиции, карбонилцианид m-хлорфенилкарбазон (CI-CCP), валиномиции и сахарозу фирмы «Serva» (ФРГ), неорганические соли квалификации х. ч. Олигомиции, CI-CCP и валиномиции добавляли в пробы из спиртового раствора так, что конечная концентрация этанола составляла 0,5%, и столько же спирта добавляли в контрольные пробы. Трис-АТР получали пропусканием раствора Na₂ATP («Reanal», Венгрия) через колонку с катионообменником Dowex 50w×2 в H²-форме. Элюат нейтрализовали трисом, и концентрацию ATP определяли спектрофотометрически, принимая значение ε₂₅₉= 15400 M⁻¹·см⁻¹.

Результаты исследования

Флуоресцентные ответы АО, наблюдавшиеся при последовательном добавлении СП и Mg-ATP в среду измерения (рис. 1), были аналогичные тем, которые описаны для неочищенной фракции СП мозга [1]. Отличия сводятся к двум моментам: во-первых, величина У.А. транспорта Н+ в очищенных препаратах в 3-4 раза выше; во-вторых, эндогенный градиент оН (ДоН), который проявляется в тушении флуоресценции АО при добавлении СП (подробнее см. [1]), в очишенных мембранах значительно ниже и в отсутствие АТР полностью рассенвается за 3-4 мин, в отличие от 15 мин для неочищенной фракции. Последнее обстоятельство, очевидно, вызвано длительным пребыванием везикул в гипоосмотической среде в процессе выделения, в чем применяемый нами метод отличается от исходной процедуры March. Thorion [7]. Вследствие этого наши препараты представляют собой «тени» или мембраны СП с вымытым в процессе выделения содержимым. Такие препараты удобны для исследования транспорта Н+, гак как буферной емкостью внутонвезикулярного объема «теней» можно поенебречь, что упрощает интерпретацию такого нараметра, как аккумуляиня H+.

Для уточнения локализации H⁺-часоса и оценки чистоты препаратов на всех стадиях очистки, следующих за осмотическим шоком грубой фракции синаптосом, измеряли активности транспорта H⁺, различных АТРаз и маркерных ферментов наиболее вероятных примесей. Из табл. 1 видно, что маркер митохондрий—олигомицинчувствительная АТРаза полностью удаляется в процессе очистки. Кроме того, в отсутствие АТР добавление 1 мМ NADH не вызывало подкисления везикул (не показано), что служит дополнительным указанием на отсут-

520

ствие «вывернутых наизнанку» внутренних мембран митохондрий—субмитохондриальных частиц. Величина У.А. маркера плазмалеммы— Na+, К-АТРазы значительно снижалась в ходе очистки. Возможно, что неполное удаление плазмалеммы вызвано прогрессирующей везакуляризацией поверхностной мембраны синаптосом при гипотонической обработке. Величина У.А. лизосомного маркера—кислой АМРазы была низкой во всех фракциях порядка на два ниже, чем в очищенных лизосомах [9], а с учетом распределения белка основная часть фермента сосредоточена во фракции крупных частиц Ф₁.



Рис. 1. Изменения флуоресценции акридиноранжа при последовательном добавлении мембран СП и Mg-АТР. Стрелками указаны моменты добавления СП (12.5 мкг белка/мл). Mg-АТР (1.0 мМ) и (NH4)₂SO₄ (10 мМ)

Рис. 2. Ингибирующее действие NEM на транспорт II+ (1) и АТРазную активность (2) мембран СП в стандартной КСІ-содержащей среде. Крипая 1—общая для скорости транспорта (О) и аккумуляции II+ (•;

В отличие от маркерных ферментов митохондрий, плазмалеммы и лизосом, величина У. А. АТР-зависимого транспорта H⁺ резко возрастала в процессе очистки (табл. 1). Это показывает, что H⁺-насос действительно является компонентом мембраны СП. В то время как общая АТРазная активность не проявляла корреляции с каким-либо маркерным ферментом, что объясняется ее суммарным характером, наблюдалась положительная корреляция между транспортом H⁺ и NEM-чувствительным компонентом АТРазной активности.

На рис. 2 представлены концентрационные зависимости ингибирурщего действия NEM на транспорт H⁺ и АТРазиую активность мембран СП. Полное ингибирование транспорта H⁺ и максимальное торможение АТРазной активности (на 74% в КСІ-содержащей среде) наблюдается при 0,2 мМ NEM, и дальнейшее повышение концентрации ингибитора не приводит к дополнительному ингибированию АТРазной активности Полумаксимальное торможение транспорта H⁺ и чувствительного к ингибированию компонента АТР-азной активности наблюдалось при 13 и 12 мкМ NEM соответственно. Такие же результаты были получены при определении АТРазной активности в сахарозной среде. Когда ингибитор добавляли после АТР, степень торможения транспорта Н+ эначительно снижалась, достигая максимально 15—20%. Защита субстратом от ингибирования тиоловыми реагентами описана для многих SH-зависимых ферментов. Полученные результаты позволяют предположить, что только основной, NEM-чувствительный компонент АТРазной активности связан с транспортом Н+ и может быть отождествлен с Н+АТРазой.

Tab.uusa I

Активность	Фрокция		
	Φ1	Φ:	Φ3
Общая АТРазная, мкмоль-	43,3±4,5	32,7+2,7	37,8+1,3
Олигомициичувствительная АТРаза, мкноль-мг-1-ч-1	21,6±3,9	0,6±1.0	0,0 <u>+</u> 0,7
NEM-чувствительная А ГРаза, мкноль-мг ⁻¹ .ч ⁻¹	6.2±1.8	16,7±2.4	28.3±1.6
	58,8+5,4	44.7±5,0	7,1±1,5
Кислая АМРаза, мкмоль-	0,30±0,10	0,32+0,07	0.22±9,06
Транспорт H+ : скорость, мин ⁻¹ . мг ⁻¹ аккумуляция, мг ⁻¹ Выход беляв, мг г сырой ткани	3,2+0,7 5,8+0,5 7,15+2,11	14.2+7.6 29.2+11.6 0,38±0.18	45.5+3,1 77,5±2,2 0,20+0,04

Удельная активность маркерных ферментов и транспорта протонов в субклеточных фракциях Фа. Фо. Фо.

Примсчание. Представлены данные 4-5 опытов. О размерностях величии транспорта Н+ см. раздел «Методы исследования».

АТРазная активность мембран СП стимулировалась в присутствии КСІ или NaCI (табл. 2). Очевидно, стимуляция обусловлена СІ⁻, сопряженный перенос которых обеспечивает электронейтральность транспорта Н⁺ [1]. В присутствии NEM активация АТРазной активности не наблюдается, следовательно, это свойство присуще только NEM-чувствительному компоненту.

Разобщители устраняют ДрН либо создавая высокую проводимость для H⁺ в мембране (протонофор Cl -CCP), либо связывая H⁺ при акхумуляции внутри везикул в ответ на ДрН (проникающие слабые основания). В обоих случаях, нарушая сопряжение между гидролизом АТР и транспортом ионов, разобщители вызывают стимуляцию H⁺-АТРаз, работающих в их присутствии «вхолостую». На рис. З показано действие двух разобщителей — протонсфора Cl-CCP и валиномицина на транспорт H⁺ в мсмбранах СП. В согласии с предыдущими данными [1], аалиномиции, который обычно проявляет свойства К⁺-спеунфического ионофора, более аффективно устранял транспорт H⁺ в присутствии NaCl, чем KCl. Для обоих разобщителей характерно, что значительно более высокие концентрации требовались для торможения скорости транспорта, чем аккумуляции H⁺. Величины Ко.5 равиялись для Cl -CCP 0.50 и 0.20 мкМ, а для валиномиципа—0.85 и 0.35 мкМ в присутствии KCl и 0.35 и 0.10 мкМ в присутствии NaCl соответственил.

Оба нонофора-разобщителя, а также представитель проникающих слабых оснований—NH₃, добавленный в виде раствора (NH₄)₂SO₄, нарушая сопряжение с транспортом H⁺, избирательно стимулировали (табл. 2) NEM-чувствительную АТРазную активность, не влияя на активность, проявляющуюся в присутствии NEM (NEM-резистентный компонент). Стимуляция наблюдалась в сахарозной и в KCI-содержащей средах, то есть в условиях электрогенного и электронейтрального транспорта H⁺ соответственно.

Таблица 2

	АТРазная активность, %		
Vacanus current			
условия спыта	6e3 NEM	+NEM	
сахароза сахароза + СІ-ССР сахароза + валіномиции КСІ КСІ+СІ-ССР КСІ+(NH ₁) ₂ SO ₄ КСІ-і (лн ₁) ₂ SO ₄ КСІ-і малиюмиции NaCl	100 119±5** 134±10** 145±6 168±9** 170±14** 183±16** 152±7* 150±14**	36+2 36+3 36+2 36+3 36+3 36+3 40+4 39+3	

Изменения АТРазной активности мембран СП при вездействии хлоридов и разобщителей в присутствии и в отсутствие NEM

Примечание. Концентрации: 300 мМ сахароза, 150 мМ КСІ, 150 мМ NaCl, 10 мкМ СІ-ССР, 2 мкМ цалиномиции, 10 мМ (NH₄)₂SO₄, 0,2 мМ NEM, За 100% принята активность в сахарозной среде в отсутствие NEM и разобщителей. Представлены данные 6 (с СІ-ССР) ими 3 (с сульфатом аммония и вализсикцииом) опытов. " ρ <0,005 но сравнению с сахарозной средой. "" ρ <0,01 по сравнёнию с отсутствие разобщителя

Оба компонента АТРазной активности проявляли гиперболические зависимости от концентрации Mg-ATP, а линеаризация в координатах Хейнса-Вулфа (см. [11]) показала, что они сильно отличаются по сродству к субстрату (рис. 4). NEM-чувствительный компонент характеризустся величиной Km 0,64 мM, а соответствующая величина для NEM-резистентного компонента составляет 0,10 мМ. Исследование подобной зависимости активности H⁺-насоса с помощью флуоресцентного зонда АО поклзало, что она описывается кривой сложной, негиперболической формы, причем увеличение концентрации Mg-ATP выше 1 мМ вызывало снижение флуоресцентных ответов. Это вызвано усилением взаимодействия зонда с АТР при увеличении концентрации последнего, поэтому были применены особые методические приемы, которые будут описаны в отдельной публикации, с помощью которых установили, что величина K_m H⁺-насоса близка величине K_m NEM-чувствительного компонента.

Исследования рН-зависимостей двух компонентов АТРазной активности показали (рис. 5. а), что NEM-чувствительный компонент проявляет четкий пик активности при рН 6,0. Стимуляция активности вприсутствии КСІ наблюдалась во всем исследованном диапазоне рН. В то же время активность NEM-резистентного компонента была максимальной в щелочной области.



Рис. 3. Влияние протонофора СІ-ССР (а) и валиномицина (б) на транспорт H⁺ в мембранах СП (в %). Измерения проводная в присутствии 150 мМ КСІ (1, 2) или NaCI (3, 4). Представлены средние величны скорости транспорта (1, 3) и аккумуляции H⁺ (2, 4) из трех опытов

АТР-зависимые флуоресцентные ответы АО, которые отражают транспорт H⁺, проявляли особую зависимость от pH, будучи максимальными при pH 7,5—8,0 (рис. 5, б, кривые 1 и 2). Обычно считается, что эта зависимость тождествениа pH-зависимости H⁺-насоса. На самом деле, согласно известному уравнению [8, 12]. флуоресцентные ответы пропорциональны величиие трансмембранного градиента концентрации H⁺:

$$\frac{F_{0}-F}{F} = \frac{[H^{+}]_{in}}{[H^{+}]_{ex}} \cdot \frac{v_{in}}{v_{ex}}$$
(1)

где индексы in и ех относятся к внутри- и вневезикулярному объемам (V) соответственно. Активность H⁺-насоса, конечно, следует пыражать не с помощью термодинамического параметра [H⁺]₁₀/[H⁺]_{сх}, а кинетического—количества переносимых через мембрану ионов. Поэтому величина аккумуляции H⁺ будет пропорциональна достигаемой в стационарном состоянии концентрации H⁺ внутри везикул:

$$[H^+]_{in} \cdot V_{in} = [H^+]_{ex} \cdot V_{ex} \cdot (F_0 - F)/F$$
(2)

Учитывая, что при одинаковой концентрации белка V_{In} и V_{ex} постоянны, удельную величину аккумуляции H⁺ можно выразить как

$$[H^{-}]_{ex} = \operatorname{const} [H^{-}]_{ex} \cdot (F_{g} - F)/F$$
(3).

Такой же подход справедлив и в отношении скорости транспорта H^+ . Дифференцируя уравнение (3) с учетом того, что для начальных изменений флуоресценции (F_0 —F)/F можно заменить на (F_0 —F)/ F_0 , получим:

$$d[H^{+}]_{it} dt = -const [H^{+}]_{ex} dF dt$$
(4).

Таким образом, при варьировании рН среды оба параметра—скорость и величниу флусресцентных ответов—следует умножать на концентрацию Н⁺ в среде измерения.



Рис. 4. Зависимости скорости (у) АТРазных реакций от концентрации Мд-АТР (s) в координатах Хойиса-Вулфа. NEM-чузствительную (1, 2) и NEM-резистентную (3, 4) АТРазные активности измеряли в присутствии 150 мМ КСІ (1 и 3.) или 300 мМ сахарозы. (2, 4.). Даниме для 3 и 4 представлены одной общей прямой

Чтобы представить данные на одном рисунке, не меняя масштаба, воспользуемся тем, что величина [H⁺]ех при изменении рН среды на 0,5 единиц каждый раз изменяется в 10^{0,5} раз, то есть в 1 10 раз. Выбрав подходящую экспериментальную точку в качестве начальной для отсчета величины флуоресцентных ответов в остальных точках, отличающихся на п.0.5 единиц рН, достаточно разделить (при повышении рН) или умножить (при снижении рН) на п.10 раз. На рис. 5, 6 приведены полученные таким способом кривые, построенные при выборе рН 6,5 и рН 5,5 для начала отсчета (крипые 4 и 5, из которых видно, что максимальная аккумуляция H^+ наблюдается при pH 6.0. Точно такой же результат получен и для скорости транспорта (кривая 3). Таким образом, pH-зависимости H^+ -насоса и NEM-чувствительной АТРазы практически одинаковы ,и их активность в широком диапазоне стимулируется повышением концентрации H^+ в среде.



Рис. 5. рН-Зависимости АТРазных активностей (а) и Ит-насоса (б) мембран СП: а—NEM-чувствительная (1, 2) и NEM-резистентная (3, 4) активности в присутствии 150 мМ КСІ (1 и 3. О) или 300 мМ сахарозы (2, и 4, •). Результаты для 3 и 4 представлены одной общей кривой: 6—скерость генерации (1) и величина (2) стационариого гразиента концентрации Ит; скорость (3) и величина (4, 5) стационариого гразиента концентрации Ит; скорость (3) и величина (4, 5) стационариого аккумуляции Ит в относительных сдиницах (см. текст) при выборе для начала отсчета точек рН 6.5 (3, 4) или рН 5,5 (5). Измерени: проводили при 25°, используя в качестве буферов МЕУ/грис в диапавоне рН 5,0—6,5 и НЕРЕУ/трис в диапазоне рН 7,0—9,0 при суммарной концентрации буферных компонентов 40 мМ

Обсуждение результатов

Анализ распределения маркерных ферментов, проведенный в настояшей работе, подтверждает локализацию Н⁺-насоса в мембране СП мозга. Правда, мы не исследовали распределение «одетых» везикул, однако удельные величины АТРазной активности и транспорта Н⁺ в них на порядок ниже, чем в мембране СП [3]. К тому же было показано, что в использованиом нами режиме центрифугирования «одетые» везикулы, имеющие большие размеры и плотность. Удаляются на промежуточных стадиях выделения СП [7]. Явное отличие в распределениях активности H⁺-насоса и маркера плазмалеммы, вопреки недавнему утверждению [13], свидетельствует об отсутствии связи H⁺-насоса с синаптической мембраной.

Отдифференцировать активность АТРазы, ответственной за трансворт Н (без солюбилизации, в нативной мембране СП), можно лишь с помощью специфических ингибиторов. Свойства такого ингибитора проявляет NEM: активность, не связанная с транспортом H⁺, резистента к его действию, а активности Na⁺, K⁺- и Ca²⁺-транспортной АТРаз, проявляющих к нему известную чувствительность, не могли проявиться без добавления Na⁺ или Ca²⁺ в среду измерения. Ингибирование соответствующей АТРазы полностью объясняет действие NEM на транспорт H⁺, и нет никаких оснований предполагать его косвенное, «разобщающее» действие [14]. Такой вывод подтверждается защитным эффектом АТР и отсутствием расхождений в действии NEM на два параметра активности H⁺-насоса (рис. 2). Действие разобщителей как раз характеризуется такими расхождениями—скорость транспорта более устойчива, чем величина аккумуляции (рис. 3).

Функциональные свойства NEM-чувствительной АТРазы полностью соответствуют идентификации ее в качестве Н⁺-транспортной АТРазы. Они включают: а) подверженность действию разобщителей: б) стимуляцию активности анионом хлора: в) совпадение кинетических характеристик с таковыми H⁺-насоса.

Действие разобщителей не требует особого комментария, за исключением валиномицина. Даже не касаясь отсутствия специфичности этого ионофора в отношении К⁺, объяснить его действие стимуляцией электрогенного входа катионов невозможно, так как в присутствии Сl⁻ мембраиный потенциал не мог образоваться. К тому же такой потенциал (положительный внутри) должен был привести к торможению АТРазной активности, а наблюдается, наоборот, стимуляция. Так что механизм разобщающего действия валиномицина в наших опытах остается непонятным. Подобные эффекты в отношении АТР-зависимого транспорта АХ наблюдали в интактных, не подворгшихся осмотическому шоку, СП электрического органа ската [15]. Аномальные эффекты валиномицина наблюдали также в других мембранных системах [16].

Стимуляция активности H⁺-АТРазы хлоридом, впервые отмеченная в хромаффинных гранулах (ХГ) надпочечников [17], наблюдается при всех экспериментальных условиях—во всем исследованном диапазоие рН и концентраций Mg-АТР, в присутствии и в отсутствие разсбщителей. Возможно, она отражает более общее свойство H⁺-АТРазы, чем просто потребность в проникающем анноне для поддержания электронейтральности. Иначе трудно объяснить, почему стимуляция наблюдается в присутствии разобщителей (табл. 2).

Имеющиеся в литературе (на материале секреторных гранул) данные о кинетических свойствах H⁺-насоса основаны исключительно на изучении генерации мембранного потенциала. Были получены очень низкие сценки K_m для Mg-ATP [14, 18]. тогда как рH-зависимость в ряде работ характеризовалась максимумом в районе рH 6—6.5 [18— 20]. Однако применение термодинамических параметров для изучения кинетики в общем случае неприемлемо, о чем свидетельствует анализ поведения термодинамического (ΔрН) и кинетического (активность) параметров при варыпровании рH среды. Разработанный нами для этого случая чисто кинетических способ выражения активности H⁺-насоса из флуоресцентных ответов АО легко распространяется и на другие методы. Например, изотопные, основанные на аккумуляции слабых оснований или слабых кислот, если вместо $(F_0 - F)/F$ использовать отношение концентраций $C_{in} C_{ex}$. Скорость проникновения незаряженной формы АО не лимитирует даже при низких рH, когда ее количество сильно уменьшается, так как изменения флуоресценции быстро обратимы и не наблюдается отличия между рH-профилями скорости и величины аккумуляции.

Найденные таким способом кинетические характеристики Н⁺-насоса совпадают с таковыми H⁺-АТРазы (рН-оптимум 6,0 и Km для Mg-АТР 0.64 мМ). Это является независимым подтверждением справедливости примененного подхода, а также исключает возможность присутствия более чем одной АТРазы со сходной чувствительностью к NEM. Кинетические характеристики H⁺-АТРазы находят подтверждение в ряде работ, где изучали общую АТРазную активность СП мозга [6], ХГ [19, 21] и секреторных гранул нейрогипофиза [20], что обусловлено давно известным для ХГ [22] преобладанием в ней NEM-чувствительного компонента. Правда, иногда сообщали характеристики, близкие таковым NEM-резистентного компонента. Однако в этих работах препараты СП хранили [5] или ХГ подвергали длительной обработке [23] при 4°, а это, как известно [5]. приводит к быстрой инактивации NEM-чувствительной АТРазы.

Различия в проявлении кинетических и термодинамических параметров, отмеченные выше, имсют непосредственное отношение к анализу сопряженных транспортных процессов. Так, жестко сопряженный транслорт H+ и Cl., способный вызвать осмотический лизис и выход содержимого, характеризуется в ХГ оптимумом рН 5.8-6.2 и Ки для Mg-ATP 0.6 мМ [24], а сопутствующие изменения объема-близкой величиной К. 0.5 мМ [25], что совпадает с описанной выше кинетикой Н+-илсоса. Другая ситуация наблюдается при непрямом сопряжении. когда транспорт Н+ создает движущую силу (в термодинамическом смысле) для сопряженного процесса. АТР-зависимый траиспорт катехоламинов [26] и АХ [15] в СП резко возрастает с повышением оН среды и достигает максимума в районе рН 7,5-8,0, повторяя рН-зависимость генерации ДрН, отмеченную в настоящей работе. Таким образом, характер pH-зависимости (зависимость от концентратии Mg-ATP не была описана для двух последних процессов) может служить прямым указанием на механизм сопряжения—кинетический (поямой) или термодинамический (косвенный).

Кинетический анализ показывает, что активность как H⁺-насоса, так и H⁺-АТРазы проявляет двухфазную зависимость от концентрации H⁺. Наблюдаемая при повышении концентрации H⁺ до 1 мкМ активация свидетельствует, во-первых, что генерация ΔрН обусловлена транслокацией H⁺ внутрь везикул (а не OH⁻ изнутри) и, во-вторых, что фермент, ссуществляющий эту транслокацию, можно классифицировать как H⁻-стимулируемую Mg²⁺-зависимую АТРазу. Активность

528

фермента в физиологических условиях лимитируется низкой концентрацией H⁺ в цитоплазме, зато при этом с минимальными энергетическими затратами поддерживается максимальная величина ΔpH для обеспечения биоэнергетики везикул.

В отличие от NEM-чувствительной, NEM-резистентная ATPаза, по-видимому, является примесным компонентом в препаратах СП, так как ее активность снижается в процессе очистки. Похожая ситуация наблюдается при анализе распределения XГ в градиентах плотности [22]. NEM-резистентная ATPаза может использовать в качестве субстрата Ca^{2+} -ATP (неопубликованные данные), который не поддерживает транспорт H⁺ [1]. Кинетические характеристики ее близки к таковым низкоаффинной Ca^{2+}/Mg^{2+} -ATPазы синаптических мембран мозга, что указывает на вероятное происхождение этой активности в препаратах мембран СП.

H+-ATPase OF BRAIN SYNAPTIC VESICLE MEMBRANES. IDENTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF AN H+-TRANSPORT SYSTEM

MELNIK V. I., GLEBOV R. N.

Research Institute of General Pathology and Pathophysiology, USSR, Academy of Medical Sciences, Moscow

The involvement of an ATPase of brain synaptic vesicle membranes in the active H⁺-transport as monitored with a fluorescent weak base, acridine orange, has been studied. The ATP-dependent H⁺-transport was abolished by N-ethylmaleimide (NEM) while the ATPase activity was resolved into two components differing in their sensitivity to the inhibitor.

A major component (74%) was sensitive to NEM and was identified as an H -ATPase on the basis of the following criteria: a) copurification with the H⁺-pump during isolation of the membranes, b) their identical sensitivities towards NEM, c) selective stimulation of the activity by the presence of Cl⁻ or uncouplers. d) similarity of characteristics to those of the H -pu.np, i. e., K_m for Mg-ATP of 0.64 mM and pH-optimum 6 0. Maximal pH gradients were generated at pH 7,5-8,0, where the activity of the H⁺-pump was found to be severely limited by a low H concentration.

A minor component of the ATPase activity was completely resistent to NEM and exhibited a K_m of 0.10 mM and a broad pH-optimum in the alkaline range.

ΛΗΤΕΡΑΤΥΡΑ

- 1. Мелник В. И., Глебов Р. Н., Крыжановский Г. Н. Бюл. эксперим. биол. и мел., т. 99, № 1. с. 35—38, 1985.
- 2. Stadler H. Tsukita S. EMBO J., v. 3, № 13, p. 3333-3337, 1984.
- 3. Rudnick G. Annu. Rev. Physiol., v. 48, p. 403-413, 1986.
- 4. Глебов Р. Н., Мельник В. И., Крыжановский Г. Н. Бюл. эксперим. биол. и мед., т. 98, № 11, с. 539—541, 1984.
- 5. Харченко Н. К., Килинов С. А., Полякова Н. М. Укр. биохим. жури., т. 45. № 5. с. 581—586, 1973.
- 6. Tsudzuki T. J. Biochem., v. 55, No 2, p. 567-574, 1979.
- 7. March P. E., Thornton E. R. Biochem. and Biophys. Res. Commun., v. 110, 16 3. p. 804-810, 1983.
- 8. Lee H.-C., Forte J. C. Biochim. et hiophys. acta. v. 508. Nr 2, p. 339-356, 1978.
- 9. Burnside J. Schneider D. L. Biochem. J., v. 204, N. 2, p. 525-534, 1982.
- 10. Walter U. Experientia, v. 37. No 12, p. 1263-1265, 1981.
- 11. Корниш-Боулен Э. Основы ферментативной кинетики, М., Мир. 1979.
- 12. Schaldiner S., Rottenberg H., Avron M. Europ. J. Biochem., v. 25, p. 64-70, 1972.
- Van Dyke R. W., Scharschmidt B. F., Steer C. J. Biochim. et biophys. acta, v. 812, № 2, p. 423-436, 1985.
- Flatmark T., Gronberg M., Husebye E., Berge S. V. FEBS Lett., v. 149, No 1, p. 71-74, 1982.
- Anderson D. C., King S. C., Parsons S. M. Biochemistry, v. 21, Nº 13, p. 3037-3043, 1982.
- Negendank W., Shaller C. Biochim. et hipphys. acta, v. 693, Nr 2, p. 316-322, 1982.
- 17. Pazoles C. J., Creutz C. E., Rumu A., Pollard H. B. J. Biol. Chem., v. 255, No 16, p. 7863-7869, 1980.
- Pollard H. B., Zinder O., Hojjman P. G., Nikodejevic O. J. Biol. Chem., v. 251, No 15, p. 4544-4550, 1976.
- 19. Bashford C. L., Radda G. K., Ritchie G. A. FEBS Lett., v. 50, p. 21-24, 1975.
- 20. Russell J. T. J. Biol, Chem., v. 259, No 15, p. 9496-9507, 1984.
- 21. Winkter H., Hörtnugl H., Hörtnugl H., Smith A. D. Biochem. J., v. 118, No 2, p. 303-310, 1970.
- 22. Kirshner N., Kirhsner A. G., Kamin D. L. Biochim. et biophys. acta, v. 113, No 2, p. 332-335, 1966.
- Johnson R. G., Beers M. F., Scarpa A. J. Biol. Chem., v. 257, No 18, p. 10701-10707, 1982.
- 24. Pazoles C. J., Pollard H. B. J. Biol. Chem., v. 253, No 11, p. 3962-3969, 1978.
- 25. Phillips J. H., Allison Y. P. Biochom. J., v. 170, Nº 3, p. 651-672, 1978.
- 26. Maron R., Kanner B. I., Schuldiner S. FEBS Lett., v. 93, No 2, p. 237-240, 1979.

Поступила 25. VI 1987