



УДК 577.23

ИССЛЕДОВАНИЕ ЭЛЕКТРОГЕННОЙ ФУНКЦИИ Ca^{2+} -АТФ-АЗЫ
НА ГРАНИЦЕ РАЗДЕЛА ФАЗ ОКТАН/ВОДА

Алиев М. Б., Богуславский Л. И., Волков А. Г.,
Бозлов И. А., Левицкий Д. О., Метельский С. Т.

Институт кардиологии им. А. Л. Мясникова
Академии медицинских наук СССР,

Институт электрохимии Академии наук СССР и отдел биоэнергетики
Межфакультетской лаборатории биоорганической химии
Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова

Обнаружен перенос положительных зарядов из воды в октан, катализируемый Ca^{2+} -АТФ-азой из саркоплазматического ретикулума сердечной мышцы. Изучена зависимость этого эффекта от рН и от концентраций АТФ, Ca^{2+} и *o*-фенаantroлина. Показано, что эффект чувствителен к ингибиторам Ca^{2+} -АТФ-азы: мерсалилу, этиленгликоль-бис(β -аминоэтил)-*N,N*-тетраацетату и тринитробензолсульфонату. Результаты исследования свидетельствуют о том, что Ca^{2+} -АТФ-аза из саркоплазматического ретикулума, адсорбированная на границе раздела октан/вода, обладает способностью переносить Ca^{2+} из водной фазы в октановую.

С помощью метода вибрирующего конденсатора [1—4] получены данные, свидетельствующие о способности трех различных типов H^+ -помп осуществлять энергозависимый перенос положительных зарядов из воды в октан. К этим H^+ -помпам относятся растворимые H^+ -АТФ-азы (сопрягающие факторы F_1), выделенные из митохондрий животных и из *Micrococcus lysodeikticus* [1—4], и бактериородопсин из *Halobacterium halobium* [3].

Предмет данного исследования — Ca^{2+} -АТФ-аза из саркоплазматического ретикулума скелетной мышцы. Нами было показано, что этот фермент катализирует сопряженный с АТФ-азной реакцией перенос положительных зарядов из воды в октан. Переносимые заряды являются двухвалентными катионами, а не протонами, так как эффект наблюдается в присутствии жирорастворимого хелатора — *o*-фенаantroлина [5], в то время как для переноса протонов был необходим жирорастворимый акцептор протонов.

Результаты, полученные при измерении скачка потенциала ($\Delta\phi$), свидетельствуют о том, что в определенных условиях гидролиз АТФ Ca^{2+} -АТФ-азой приводит к увеличению положительного заряда в октановой фазе (рис. 1). Эффект наблюдается в присутствии активной АТФ-азы, АТФ, Mg^{2+} , Ca^{2+} и жирорастворимого хелатора, связывающего двухвалентные катионы, например *o*-фенаantroлина. Величина образующегося $\Delta\phi$ (200—300 мВ) не зависит от того, какой компонент, необходимый для протекания реакции (фермент, АТФ или Ca^{2+}), добавляли последним. При добавлении в полную систему мерсалила $\Delta\phi$ резко падает. При увеличении концентрации *o*-фенаantroлина катализируемый Ca^{2+} -АТФ-азой скачок потенциала возрастает (рис. 2). Максимальный эффект наблюдает-

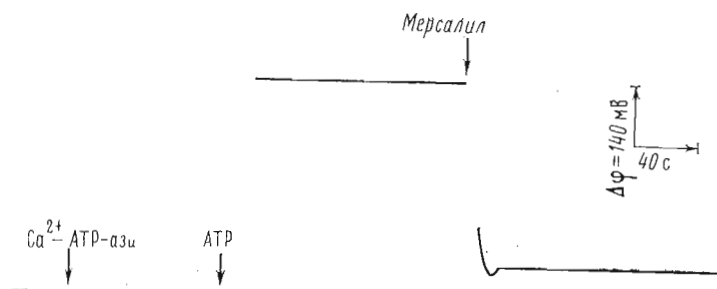


Рис. 1. Временная зависимость изменений $\Delta\phi$, генерируемых Ca^{2+} -АТР-азой в системе октан/вода;

ся при 0,3 мМ концентрации хелатора. В том случае, когда вместо *o*-фенаитролина использовали акцептор протонов 2,4-динитрофенол, генерации $\Delta\phi$ не наблюдалось.

Кривая зависимости $\Delta\phi$ от концентрации Ca^{2+} (рис. 3) показывает, что $\Delta\phi$ достигает максимального значения в диапазоне концентраций ионов Ca^{2+} 10^{-5} — 10^{-4} М. Дальнейшее увеличение концентрации Ca^{2+} в среде приводит к уменьшению $\Delta\phi$, по-видимому, вследствие ингибирования АТР-азной реакции высокими дозами Ca^{2+} [6]. Добавление этиленгликольбис (β -аминоэтил)-*N,N*-тетраацетата после Ca^{2+} приводило к исчезновению $\Delta\phi$, генерируемого Ca^{2+} -АТР-азой. Например, в одном из опытов этот ингибитор в концентрации $2 \cdot 10^{-5}$ М полностью устранял $\Delta\phi$, возникший при добавлении $1,5 \cdot 10^{-5}$ М CaCl_2 . При добавлении новой порции ($2 \cdot 10^{-5}$ М) CaCl_2 наблюдалось повторное образование $\Delta\phi$.

Сооставление зависимости от концентрации АТР значения $\Delta\phi$ (рис. 4, кривая 1) и скорости АТР-азной реакции в водном растворе (кривая 2) говорит о том, что в интервале концентраций АТР 10^{-6} — 10^{-3} М характер зависимости скорости АТР-азной реакции от концентрации субстрата существенно не изменяется при переводе фермента из раствора на границу раздела фаз.

Зависимость $\Delta\phi$ от рН имеет оптимум при нейтральном рН (рис. 5). Подобный оптимум был ранее описан для Ca^{2+} -АТР-азной реакции [7].

Мерсалил, реагент на SH-группы, ингибирующий Ca^{2+} -АТР-азу [8], сильно снижает генерируемый АТР-азой $\Delta\phi$ (рис. 1 и 6). Подавление способности фермента генерировать $\Delta\phi$ наблюдалось также при добавлении тринитробензосульфоната, реагента на SH- и NH_2 -группы белков (полумаксимальное ингибирование наблюдается в присутствии $3 \cdot 10^{-5}$ М тринитробензосульфоната). Существенно, что этот ингибитор нерастворим в октане, т. е. сам факт ингибирования свидетельствует о том, что SH- и NH_2 -группы Ca^{2+} -АТР-азы, необходимые для ее функции на межфазной границе, доступны для воды.

Известно, что гидроксиламин реагирует с высокоэнергетическим фосфорилированным интермедиатом Ca^{2+} -АТР-азной реакции $E \sim P$, приводя к инаktivации фермента [6]. Действительно, гидроксиламин в концентрации $3,7 \cdot 10^{-2}$ М полностью подавляет генерацию $\Delta\phi$ в изучаемой системе (рис. 7).

Приведенные результаты указывают на то, что Ca^{2+} -АТР-аза саркоплазматического ретикулума, расположенная на границе раздела октан/вода, переносит положительные заряды из воды в октан. Переносимые заряды скорее всего поливалентны, а не H^+ -ионы, так как для генерации $\Delta\phi$ Ca^{2+} -АТР-азой необходимо присутствие жирорастворимого акцептора поливалентных катионов в бифазной системе. Можно думать, что таким катионом является Ca^{2+} . Это предположение подтверждается сравнением данных, полученных в результате изучения других помп, локализованных на границе раздела октан/вода [1—4, 9—11]). Так, для генерации $\Delta\phi$

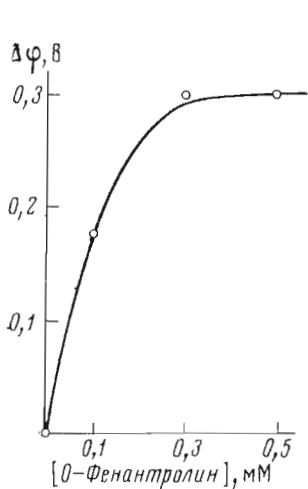


Рис. 2

Рис. 2. Зависимость $\Delta\phi$, генерируемого Ca^{2+} -АТФ-азой, от начальной концентрации *o*-фенантролина в водной фазе

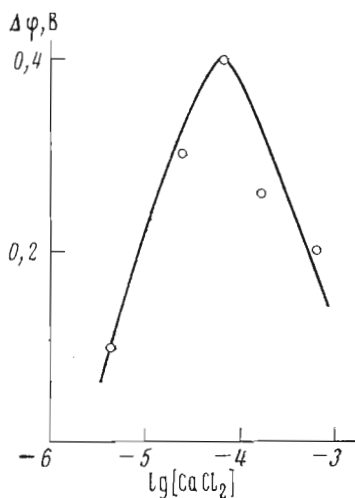


Рис. 3

Рис. 3. Зависимость $\Delta\phi$, генерируемого Ca^{2+} -АТФ-азой, от концентрации CaCl_2

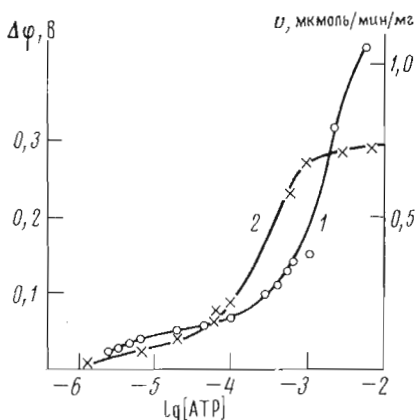


Рис. 4

Рис. 4. Зависимость $\Delta\phi$, генерируемого Ca^{2+} -АТФ-азой (1), и скорости АТФ-азной реакции v (2) от концентрации АТФ. Концентрация *o*-фенантролина — 0,5 мМ

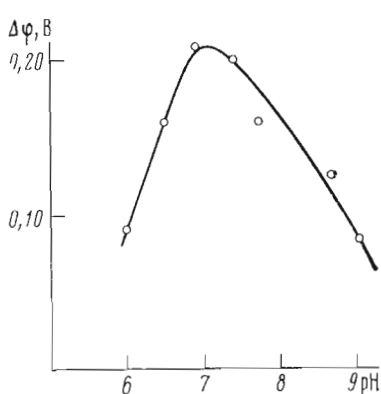


Рис. 5

Рис. 5. рН-кривые $\Delta\phi$, генерируемого Ca^{2+} -АТФ-азой

протонными помпами различных типов необходимо присутствие в системе жирорастворимого акцептора протонов, в то время как для образования $\Delta\phi$ посредством цитохромоксидазы — жирорастворимого акцептора электронов. Таким образом, можно предположить, что генерация $\Delta\phi$ Ca^{2+} -АТФ-азой должна происходить в присутствии акцептора Ca^{2+} в октано. Роль такого акцептора в наших опытах играл *o*-фенантролин. Однако было бы неправомерно исключить возможность транслокации через границу раздела октан/вода другого двухвалентного катиона, а именно Mg^{2+} , который также может акцептироваться *o*-фенантролином, находящимся в октано. Чтобы полностью исключить эту возможность, необходимо использовать жирорастворимый хелатор, избирательно связывающий Ca^{2+} , но не Mg^{2+} .

Экспериментальная часть

Приготовление Ca^{2+} -АТФ-азы. Растворимую АТФ-азу выделяли из саркоплазматического ретикулума скелетной мышцы кролика по методу Мак-Леннана [12] с некоторыми модификациями. Суспензию саркоплазматического ретикулума инкубировали при 0° в присутствии 0,22 %-ного дезоксихолата натрия (фирма ВС), очищенного с помощью активированного угля «Норит А» [13]. Спустя 20 мин суспензию центрифугировали 30 мин при 115 000g. Осадок дважды промывали 0,25 М сахарозой, 0,01 М трис-НСl (рН 8,0) и суспендировали в 0,66 М сахарозе, 1 мМ гистидине, 0,05 М трис-НСl (рН 7,6) при концентрации белка 10 мг/мл. Ca^{2+} -АТФ-азу солюбилизировали 0,45 %-ным дезоксихолатом натрия в присутствии ацетата аммония (10 % насыщения). Слегка просветленную суспензию центрифугировали 20 мин при 82 000 g. Осадок удаляли. Надосадочную жидкость обрабатывали ацетатом аммония до 12,5 % насыщения, после чего смесь мутнела. Ca^{2+} -АТФ-азу осаждали центрифугированием 20 мин при 82 000g и растворяли в 1,0 М сахарозе, 1 мМ гистидине, 0,05 М трис-НСl (рН 7,6) при конечной концентрации белка 25 мг/мл. Удельная активность препарата фермента соответствовала 20 мкмоль P_i /мин/мг белка. Препарат саркоплазматического ретикулума выделяли в соответствии с методом, описанным ранее [14]. Анализ скелетного саркоплазматического ретикулума (неочищенного препарата Ca^{2+} -АТФ-азы) с помощью электрофореза с додецилсульфатом натрия по методу Вебера и Осборн [15] показал, что Ca^{2+} -АТФ-аза составляет около половины белка препарата (зона 1 на рис. 8). Зона 2 соответствует, по-видимому, кальсеквестрину — Ca^{2+} -связывающему белку саркоплазматического ретикулума [12]. Электрофорез растворимой Ca^{2+} -АТФ-азы, приведенный в идентичных условиях, обнаруживает только один пик белка (с M 100 000—105 000, рис. 8).

Активность АТФ-азы. Активность Ca^{2+} -АТФ-азы измеряли по увеличению содержания неорганического фосфата в среде инкубации или по изменению оптической плотности при 340 нм в системе, содержащей НАД·Н, фосфоенолпируват, пируваткиназу и лактатдегидрогеназу. Скорость АТФ-азной реакции v выражали как мкмоль гидролизованного АТФ за 1 мин на 1 мг белка.

Концентрация белка. Для определения концентрации белка использовали модифицированный метод Лоури [16].

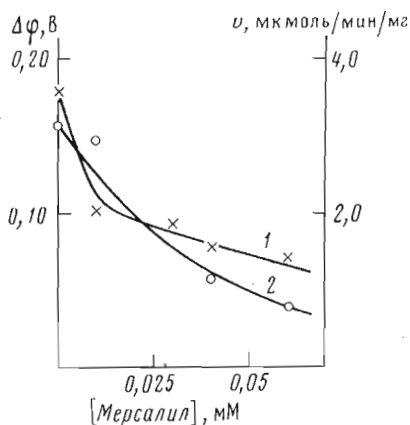


Рис. 6

Рис. 6. Ингибирование $\Delta\phi$ (1) и скорости АТФ-азной реакции v (2) мерсалилом

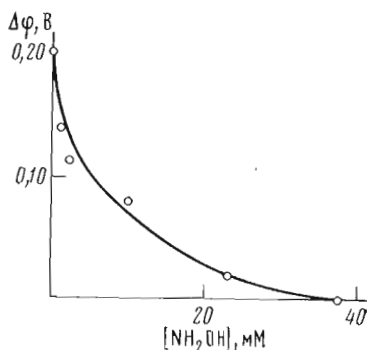
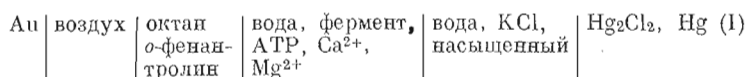


Рис. 7

Рис. 7. Ингибирование $\Delta\phi$, генерируемого Ca^{2+} -АТФ-азой, гидроксиламинем. Ингибитор (10^{-3} М) добавляли за 2 мин до измерения $\Delta\phi$

Измерение вольта-потенциала. Для измерения перераспределения зарядов между водой и октаном был использован метод вибрирующего электрода [17—19]. Вольта-потенциал измеряли в следующей цепи:



Систему октан/вода уравнивали с *o*-фенантролином в течение 24 ч. Остальные компоненты ферментативной реакции добавляли непосредственно перед измерением скачка потенциала. Все значения $\Delta\phi$, приведенные в статье, отсчитывали от фонового значения.

Состав водной фазы при определении временной зависимости $\Delta\phi$, генерируемого Ca^{2+} -АТР-азой при гидролизе АТР (рис. 1), а также зависимости $\Delta\phi$ от концентрации *o*-фенантролина (рис. 3): 0,05 М трис-НСl

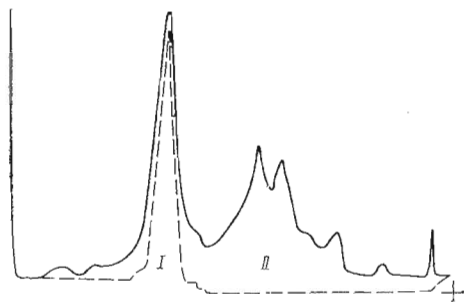


Рис. 8. Электрофореграммы препаратов саркоплазматического ретикулума и очищенной Ca^{2+} -АТР-азы из скелетной мышцы кролика. Сплошная линия — неочищенный препарат (саркоплазматический ретикулум) фермента, пунктирная — очищенный водорастворимый препарат

(рН 7,1), 1 мМ MgCl_2 , $1,5 \cdot 10^{-5}$ М CaCl_2 , 0,1 М КСl, 0,5 мМ *o*-фенантролин, очищенная Ca^{2+} -АТР-аза — 7 мкг белка/мл. Добавки: 1 мМ АТР и 0,1 мМ мерсалил.

Состав водной фазы при определении зависимости $\Delta\phi$ от концентрации *o*-фенантролина (рис. 2) и от концентрации АТР (рис. 4, 1): 0,05 М трис-НСl (рН 7,0), 0,1 М КСl, 5 мМ MgCl_2 , 5 мМ АТР, $1,5 \cdot 10^{-5}$ М CaCl_2 , 0,1 мг белка/мл саркоплазматического ретикулума.

Инкубационная смесь для измерения активности АТР-азы: 0,015 М имидазол (рН 7,0), 0,1 М КСl, 5 мМ MgCl_2 , $1,5 \cdot 10^{-5}$ М CaCl_2 , 1 мМ фосфоенолпируват, 0,14 мМ NADH, фосфоенолпируваткиназа (1 Е/мл), 5 мМ АТР, 0,025 мг/мл белка саркоплазматического ретикулума. Температура инкубационной смеси 25° (рис. 4, 2). При определении ингибирующего действия мерсалила на $\Delta\phi$ и скорость АТР-азной реакции (рис. 6), а также ингибирования гидроксиламином $\Delta\phi$ (рис. 7) измерения производили 2 мин спустя после добавления мерсалила или гидроксилamina к смеси, содержащей Ca^{2+} -АТР-азу. Скорость гидролиза АТР измеряли по накоплению неорганического фосфата в течение 5 мин после начала ферментативной реакции в среде следующего состава: 0,03 М трис-НСl (рН 7,0), 0,1 М КСl, $1,5 \cdot 10^{-5}$ М CaCl_2 , 5 мМ MgCl_2 , 5 мМ АТР, 0,03 %-ный тритон X-100 и саркоплазматический ретикулум (0,05 мг белка/мл). Температура инкубационной среды 30°.

Электрофорез проводили в присутствии додецилсульфата в полиакриламидных гелях. На гели наносили около 0,1 мг белка. После электрофореза гели окрашивали амидовым черным. В том случае, если препараты саркоплазматического ретикулума и Ca^{2+} -АТР-азы инкубировали с $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{АТР}$, радиоактивность обнаруживалась в зоне 1.

ЛИТЕРАТУРА

1. Богуславский Л. И., Волков А. Г., Козлов И. А., Метельский С. Т., Скулачев В. П. (1975) Биоорган. химия, 1, 1368—1378.
2. Богуславский Л. И., Волков А. Г., Козлов И. А., Милейковская Е. И., Каргополов А. В. (1976) Биоорган. химия, 2, 846—854.

3. Boguslavsky L. I., Kondrashin A. A., Kozlov I. A., Metelsky S. T., Skulachev V. P., Volkov A. G. (1975) FEBS Lett., 50, 223—226.
4. Богуславский Л. И., Волков А. Г., Козлов И. А., Метельский С. Т., Скулачев В. П. (1974) Докл. АН СССР, 218, 963—966.
5. Sillen L. G., Martell A. E. (1964) in Stability Constants of Metal Ion Complexes. The Chem. Soc. London.
6. Martonosi A. (1969) J. Biol. Chem., 244, 613—616.
7. Hasselbach V. (1964) Progr. Biophys. and Mol. Biol., 14, 167—222.
8. Inesi G., Godman J. J., Watanabe J. (1967) J. Biol. Chem., 242, 1637—1640.
9. Богуславский Л. И., Волков А. Г., Козлов И. А., Милейковская Е. И. (1975) Докл. АН СССР, 222, 726—729.
10. Богуславский Л. И., Волков А. Г., Кондрашин А. А., Скулачев В. П., Ясайтис А. А. (1975) Биоорг. химия, 1, 1673—1681.
11. Богуславский Л. И., Волков А. Г. (1975) Докл. АН СССР, 224, 1201—1204.
12. Machenau D. H. (1970) J. Biol. Chem., 245, 4508—4518.
13. Meissner G., Conner G. E., Fleisher S. (1973) Biochim. et biophys. acta, 298, 246—269.
14. Левицкий Д. О., Алиев М. К., Левченко Т. С., Липидкая И. Я., Смирнов В. Н. (1976) Биохимия, № 4.
15. Weber K., Osborn M. (1969) J. Biol. Chem., 244, 4406—4412.
16. Hartree E. F. (1972) Anal. Biochem., 48, 422—427.
17. Волков А. Г., Ложкин Б. Т., Богуславский Л. И. (1975) Докл. АН СССР, 220, 1207—1211.
18. Ягужинский Л. С., Богуславский Л. И., Волков А. Г., Рахманинова А. Б. (1975) Докл. АН СССР, 221, 1465—1468; Nature (1976) 259, 494—496.
19. Харкац Ю. И., Волков А. Г., Богуславский Л. И. (1975) Докл. АН СССР, 220, 1441—1444.

Поступила в редакцию
22.I.1976

STUDY OF THE ELECTROGENIC FUNCTION OF Ca^{2+} -ATPase AT THE OCTANE/WATER INTERFACE

ALIEV M. K., BOGUSLAVSKY L. I., VOLKOV A. G.,
KOZLOV I. A., LEVITSKY D. O., METELSKY S. T.

*Institute of Electrochemistry, Academy of Sciences of the USSR,
A. L. Myasnikov Institute of Cardiology, Academy of Medical Sciences
of the USSR; Department of Bioenergetics, Laboratory of Bioorganic
Chemistry, M. V. Lomonosov State University, Moscow*

Positive charge translocation from the water to the octane phase, carried out by Ca^{2+} -ATPase of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum, has been revealed. ATP, Ca^{2+} , Mg^{2+} and a lipid-soluble chelator, *o*-phenanthroline, are needed to achieve this effect. The dependence of the effect upon pH and the concentration of ATP, Ca^{2+} , and *o*-phenanthroline was measured. The effect was found to be sensitive to the Ca^{2+} -ATPase inhibitors: mersalyl, ethyleneglycol-bis(β -aminoethyl)-*N*-*N*-tetraacetate, [and trinitrobenzenesulfonate. It is concluded that Ca^{2+} -ATPase of sarcoplasmic reticulum located at the octane/water interface can accomplish ATP-dependent translocation of divalent cations (preferably, Ca^{2+}) from the water to the octane phase.