

АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ БІОХІМІЇ ім. О. В. ПАЛЛАДИНА

на правах рукопису

КРОПОВА
Світлана Анатоліївна

GTP-ЗАЛЕЖНА РЕГУЛЯЦІЯ
ПАСИВНОГО ТРАНСПОРТУ КАЛЬЦІЮ
В ПЛАЗМАТИЧНІЙ МЕМБРАНІ МІОМЕТРІЮ

03.00.04.-БІОХІМІЯ

А в т о р е ф е р а т
дисертації на здобуття вченого ступеня
кандидата біологічних наук

Київ 1993



Науковий керівник Д.Б.Н., проф. М.Д.Курський

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук,
МАЛІШЕВА М.К.кандидат біологічних наук,
ІОМЕНКО А.Й.Провідна установа - Київський державний університет
ім.Тараса Шевченка

Захист дисертації відбудеться "14".....1993 р.

о 14 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради
Д 016.07.01 для захисту дисертацій в Інституті біохімії
ім.О.В.Палладіна АН України за адресою: 252601 м.Київ-30,
вул.Леонтовича 9.З дисертацією можна ознайомитися в бібліотеці Інституту
біохімії ім.О.В.Палладіна АН України.

Автореферат розісланий "13".....1993 р.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради
канд.біол.наук

Кирсенко О.В.

Актуальність проблеми.

Проблема тонких регуляторних механізмів, які забезпечують трансмембранну передачу сигналу, знаходиться в центрі уваги біохіміків та молекулярних біологів. Це відноситься до GTP-зв'язуючих білків (G-білків), які здійснюють координацію дії позаклітинних ефektorів з внутрішньоклітинними месенджерами. Модуляція їх активності відбувається як за рахунок нековалентних впливів гуаніновими нуклеотидами - GTP та GDP - і йонами магнію (Higashijima, 1987), кальмодуліном (Katada, 1987), так і за рахунок ковалентної модифікації фосфорилуванням (Lewis, 1990) та ADP-рибозилуванням (Ueda, 1985).

Ca²⁺-канали можуть бути стратегічно важливими місцями, які зв'язують поза- та внутрішньоклітинні події, оскільки кальцій є універсальним регулятором фізіологічної поведінки клітини.

Внутрішньоклітинні осциляції концентрації йонів кальцію, які регулюють і скорочувальну активність гладеньких м'язів, запускаються, в тому числі, агоніст-індукованими змінами функціональної активності і G-білків (Birnbaumer, 1990). Вплив агоніста може бути нівельовано ADP-рибозилуванням G-білків за допомогою бактеріальних токсинів (Gilman, 1987). Однак ряд клітин містять ендогенну ADP-рибозилтрансферазу (Коц, 1990; Ueda, 1985; Peterson, 1990), що припускає втягнення цих регуляторних механізмів до широкого кола метаболічних та функціональних процесів.

Гетерогенність G-білків (Birnbaumer, 1990) - ще один фактор, який визначає складність регуляторних процесів та координованість їх дій.

Дослідження частіше всього проводяться з використанням агоністів саме для відокремлення певного типу G-білка. Другий експериментальний шлях - виділення індивідуальних субодиниць G-білків та вивчення їх впливу на активність вторинних посередників в штучних ліпідних системах. Дані вивчення впливу внутрішньоклітинних модуляторів активності G-білків та індукованих ними змін активності систем(и) вторинних месенджерів в літературі відсутні.

Виходячи з вищесказаного уявлялось, що вивчення GTP-залежних механізмів транспорту кальцію дозволить наблизитися до розуміння функціональної спрямованості та доцільності дії внутрішньоклітинних активаторів та інгібіторів активності G-білків.

Мета та завдання дослідження.

Метою роботи було вивчення біохімічних механізмів GTP-залежної регуляції функції системи, яка пасивно транспортує кальцій, в плазматичних мембранах гладеньких м'язів міометрію.

Для досягнення цієї мети вирішувались такі завдання:

- 1) Вивчити вплив ендогенних модуляторів - гуанінових нуклеотидів, йонів магнію та мембранозв'язаного кальмодуліну на пасивний транспорт кальцію в сарколемі міометрію.
- 2) Охарактеризувати вплив екзогенних модуляторів активності G-білків - фтороалюмінату та ADP-рибозилування коклюшним токсином - на пасивний транспорт кальцію.
- 3) Визначити спектр G-білків в плазматичній мембрані міометрію свині за допомогою ADP-рибозилування коклюшним та холерним токсинами.
- 4) Дослідити кінетичні характеристики зв'язування та гідролізу GTP плазматичними мембранами міометрію.

Наукова новизна роботи.

В представленій роботі доведена принципова можливість регуляції пасивного транспорту кальцію в плазматичній мембрані міометрію за допомогою GTP-залежних реакцій поза агоністіндукованої активації системи.

Встановлено, що сарколема міометрію містить два типи G-білків, які ADP-рибозилуються холерним та коклюшним токсинами, причому, субстрат холерного токсину в тканині гладеньких м'язів ідентифіковано вперше.

Показано, що регуляторною компонентою G-білків в відношенні структури, яка пасивно транспортує кальцій, є α -субодиниця, а в $\beta\gamma$ -двомірний комплекс, який утворюється під час активації G-білків, мабуть, не впливає на пасивний транспорт кальцію в сарколемі міометрію.

Доказано, що інгібіторна регуляція пасивного транспорту кальцію здійснюється α -субодиницею G_i/G_o-білка, чутливого до коклюшного токсину.

На основі кінетичного аналізу експериментальних даних продемонстрована просторова рів'яданість сайтів зв'язування GTP та Mg^{2+} на плазматичній мембрані міометрію.

Теоретична та практична значимість роботи.

Одержані результати свідчать про те, що в клітинах гладеньких м'язів міометрію існує GTP-модульована система регуляції пасивного транспорту кальцію, незалежна від активації рецепторів, яка здатна різнонаправлено міняти пасивні потоки кальцію через плазматичну мембрану в залежності від фізіологічних вимог та/або умов в клітині.

Експериментальні дані можуть бути використані для цілеспрямованого пошуку внутрішньоклітинних аналогів фізіологічної дії GTP, а також активаторів ендогенних ADP-рибовилтрансфераз з метою розробки фармакологічно та фізіологічно адекватних регуляторів скорочувальної активності гладеньких м'язів міометрію.

Апробація роботи. Результати досліджень та основні висновки були представлені на Міжнародному симпозіумі "Структура и функции регуляторних полипептидов" (Москва, 1992); на VI Українському біохімічному з'їзді (Київ, 1992); на наукових семінарах Інституту біохімії ім.О.В.Палладіна АН України.

Публікації. З теми дисертації опубліковано 6 робіт.

Структура та об'єм роботи. Дисертація складається з вступу, огляду літератури (4 розділи), опису методів дослідження (1 розділ), викладу та обговорення одержаних результатів (1 розділ), заключення, висновків та списку використаної літератури (206 джерел, з яких 19 вітчизняних та 187 закордонних). Робота викладена на 135 сторінках машинописного тексту, ілюстрована 16 малюнками та 14 таблицями.

Методи дослідження.

Експерименти проводили на плазматичних мембранах міометрію свині, які виділяли за методом, який було розроблено в відділі (Кондратюк, 1986).

Пасивний транспорт кальцію в фракції переважно інвертованих везикул сарколеми міометрію вивчали за допомогою ізотопного методу (Костерин, 1983; Кондратюк, 1986). Радіоактивність визначали на рідинному сцинтиляційному спектрометрі "Beckman" (США). Аналіз кінетики пасивного транспорту кальцію проводили з використанням методу Альгранаті (Algranati, 1963).

Для вивчення впливу гуанінових нуклеотидів, АТР, йонів алюмінію, магнію та фториду, а також комплексного йону фтороалюмінату на пасивний транспорт кальцію в середовище пасивного транспорту вносили наступні кінцеві концентрації досліджуваних модулаторів:

- 1) GDP - 0,1-1,0-10,0-100,0 мкМ; 1 мМ;
- 2) GTP - 0,1-1,0 мМ і АТР - 1,0 мМ в присутності 2 мМ Mg^{2+} ;
- 3) Mg^{2+} ; - 1,0 мкМ; 0,1-1,0-10,0 мМ;
- 4) Al^{3+} - 10,0 мкМ;
- 5) F^- - 1,0 и 10,0 мМ;
- 6) AlF_4^- - в відношенні Al^{3+}/F^- - 1/100 (10 мкМ Al^{3+} плюс 1 мМ F^-) і в відношенні Al^{3+}/F^- - 1/1000 (10 мкМ Al^{3+} плюс 10 мМ F^-).

ADP-рибозилування коклюшним токсином плазматичних мембран міометрію проводили за методом Рібейро-Нето (Ribeiro-Neto, 1985) в модифікації (Коц, 1990) з наступним вивченням пасивного транспорту кальцію згідно вищезгаданого методу (Кондратюк, 1986).

Визначення GTPазної активності нативних та ADP-рибозильованих коклюшним токсином плазматичних мембран міометрію проводили за методом Лібмана (Liebman, 1990).

Зв'язування GTP з плазматичною мембраною міометрію проводили за методом Брандта (Brandt, 1986). Для аналізу кінетики зв'язування GTP з сарколемою міометрію та нуклеотидного обміну використовували перетворення Скотчарда та модель Фергюсона (Ferguson, 1986).

Визначення субстратів холерного та коклюшного токсинів в плазматичній мембрані міометрію з допомогою ADP-рибозилування згаданими токсинами проводили за методом Коца (Коц, 1990) з допомогою $[^{32}P]-NAD^+$, синтезованого за методом Кассела (Cassel, 1978), з наступним електрофорезом в градієнті поліакриламідного геля в присутності додецилсульфату натрію за методом Леммлі (Laemmli, 1970) та авторадіографії білкових смуг.

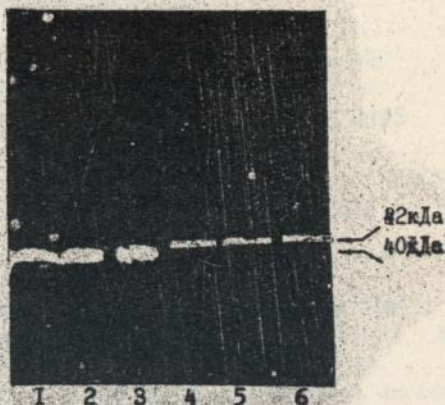
Експериментальні дані оброблювали методами варіаційної статистики.

ОСНОВНІ РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ.

1. Ідентифікування субстратів бактеріальних токсинів в сарколемі міометрію свині.

малюнок 1.

Електрофореграма субстратів коклюшного (1-3) та холерного (4-6) токсинів в плазматичній мембрані міометрію.



ADP-рибовилуванням в допомогою $[^{32}\text{P}]\text{-NAD}^+$ в присутності холерного та коклюшного токсинів в плазматичній мембрані міометрію ідентифіковано два білкові субстрати з молекулярними масами 42 і 40 кДа, відповідно (малюнок 1). Припускається, що це α -субодиниці Gs - та Gi/Go -білків.

Ендогенну ADP-рибовилтрансферазну активність (в присутності тільки NAD^+ та GTP) в плазматичній мембрані міометрію виявити не вдалося, можливо, із-за її поза мембранної локалізації.

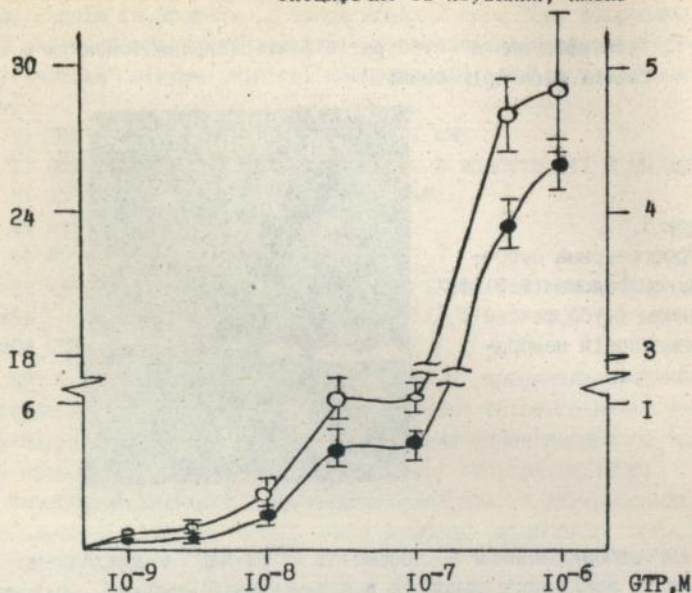
2. Характеристика GTP-зв'язуючих сайтів плазматичної мембрани міометрію.

Слідуючим кроком в наших дослідженнях стало визначення кінетичних характеристик процесу, який запускає активацію G-білків, а саме, - зв'язування GTP.

Криві зв'язування GTP в середовищі, яке містить Mg^{2+} , та в позбавленому магнію, показано на малюнку 2.

З представлених даних видно, що кількість місць зв'язування (Bmax) в середовищі без магнію в низькоафінному сайті в 3,6 рази

специфічне зв'язування, пмоль



малюнок 2. Вплив 10 мМ Mg²⁺ на зв'язування GTP плазматичними мембранами міоцитів. Специфічне зв'язування в середовищі без магнію (о) - ліва шкала, в середовищі з Mg²⁺, (●) - права шкала.

перевищує кількість місць зв'язування в високоафінному сайті (таблиця 1). Це дозволило нам умовно позначити високоафінний сайт як GTP-зв'язуючий сайт, ADP-рибозильований холерним токсином, а низькоафінний сайт - як GTP-зв'язуючий сайт, ADP-рибозильований коклюшним токсином. Подібне припущення ґрунтується на відомому факті: олігомерний Gi-білок - субстрат коклюшного токсину - зв'язує GTP у 4 рази більше, ніж олігомерний Gs - субстрат холерного токсину (Ferguson, 1986).

Спорідненність високо- та низькоафінного сайтів сарколеми міоцитів зростає в присутності Mg²⁺, (таблиця 1). Можливо, це зв'язано з тим, що за відсутності екзогенного Mg²⁺, один GTP не викликає дисоціації субодиниць GTP-зв'язуючих сайтів міоцитів, що і визначає знижену афінність гетеротримірного комплексу до

Таблиця 1.

ВПЛИВ ЙОНІВ МАГНІЮ НА V_{max} ТА K_d ЗВ'ЯЗУВАННЯ GTP
В ВИСОКО- ТА НИЗЬКОАФІННОМУ САЙТАХ САРКОЛЕМИ МІОМЕТРІЮ
(дані на 1 мг мембранного білку).

[Mg ²⁺], мМ	високоафінний сайт		низькоафінний сайт	
	V_{max} , пмоль	K_d , нМ	V_{max} , пмоль	K_d , мкМ
0	9,80 ± 1,80	39,61 ± 0,39	35,51 ± 4,49	0,16 ± 0,02
10,0	1,56 ± 0,12	4,77 ± 0,43	4,94 ± 0,08	0,064 ± 0,002

GTP. Таким чином, різниця в K_d для зв'язування GTP в високо- та низькоафінному сайтах міометрію відображають їх структурну - залежну від йонів магнію - різницю в процесі функціонування.

Для визначення характеру впливу йонів магнію на зв'язування GTP з плазматичними мембранами були одержані кінетичні параметри, які характеризують цей процес, - K_m та V_{max} (таблиця 2).

Таблиця 2.

ВПЛИВ ЙОНІВ МАГНІЮ НА ЗНАЧЕННЯ K_m ТА V_{max}
ЗВ'ЯЗУВАННЯ GTP З ПЛАЗМАТИЧНИМИ МЕМБРАНАМИ МІОМЕТРІЮ
В ВИСОКО- ТА НИЗЬКОАФІННОМУ САЙТАХ
(дані на 1 мг мембранного білку).

[Mg ²⁺], мМ	високоафінний сайт		низькоафінний сайт	
	K_m , нМ	V_{max} , пмоль	K_m , мкМ	V_{max} , пмоль
0	17,85 ± 2,95	2,74 ± 0,35	0,31 ± 0,07	35,95 ± 2,92
10,0	12,84 ± 5,32	0,69 ± 0,27*	0,30 ± 0,08	6,51 ± 0,77*

* $p < 0,05$

Км, як для високо-, так і для низькоафінного сайтів, не залежить від наявності в середовищі Mg^{2+} . Разом з тим, в присутності 10 мМ Mg^{2+} , відбувається достовірне зниження V_{max} в обох сайтах. На основі цих кореляцій можна зробити висновок про неконкурентно-модулюючий вплив іонів магнію на зв'язування GTP з плазматичною мембраною міометрію, причому, сайти зв'язування GTP та Mg^{2+} , мабуть, просторово роз'єднані.

Швидкість зв'язування GTP з плазматичними мембранами міометрію досить низька (таблиця 3), що може бути пояснено наявністю ендогенно-зв'язаного з α -субодиницею GDP, оскільки відомо, що швидкість асоціації GTP з G-білками обмежується швидкістю дисоціації ендогенного GDP від G-білку (Higashijima, 1987).

Таблиця 3.

ВПЛИВ ІОНІВ МАГНІЮ НА БЕЛИЧИНУ КОНСТАНТИ ШВИДКОСТІ
ЗВ'ЯЗУВАННЯ GTP В ВИСОКО- ТА НИЗЬКОАФІННОМУ САЙТАХ
САРКОЛЕМИ МІОМЕТРІЮ.

[Mg ²⁺], мМ	: високоафінний сайт, хв ⁻¹	: низькоафінний сайт, хв ⁻¹
0	0,066 ± 0,002	0,035 ± 0,001
10,0	0,048 ± 0,003	0,019 ± 0,001

Для Gі-білку константа швидкості зв'язування GTP в середовищі без магнію становить 0,041 ± 0,005 хв⁻¹ (Ferguson, 1986), за другими даними - коливається для різних субтипів Gі-білків від 0,025 до 0,192 хв⁻¹ (Carty, 1990).

Як видно з таблиці 3 в присутності іонів магнію константа швидкості зв'язування GTP знижується в 1,4-1,8 рази і для високої і для низькоафінного сайтів, що задовільно узгоджується з опублікованими даними про зниження аналогічного параметра в 1,2-1,3 рази для Gо-білку (Higashijima, 1987) та індивідуальних α -та β -субодиниць (Ferguson, 1986).

Для плазматичних мембран міометрію константа швидкості дисоціації GTP в середовищі без магнію становила 0,052 ± 0,002 хв⁻¹ для високоафінного сайту та 0,034 ± 0,001 хв⁻¹ для низькоафінно-

го, що в останньому випадку не протирічить даним літератури (Ferguson, 1986) для Gi-білку: $0,028 \pm 0,003 \text{ хв}^{-1}$.

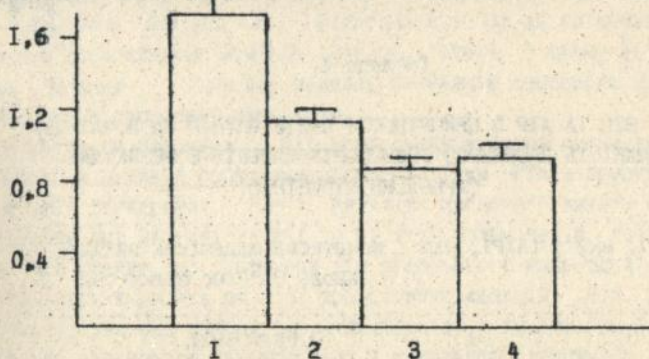
Таким чином, одержані результати зв'язування GTP з сарколемою міометрію свідчать про те, що GTP-зв'язуючі сайти на плазматичній мембрані міометрію дійсно існують, стабілізуються в присутності гуанінових нуклеотидів та Mg^{2+} і, мабуть, просторово відділені від сайтів зв'язування Mg^{2+} .

3. Вплив гуанінових нуклеотидів, ATP та Mg^{2+} на пасивний транспорт кальцію в сарколемі міометрію.

Гуанінові нуклеотиди, ATP і Mg^{2+} відносяться до групи ендогенних модюляторів активності GTP-зв'язуючих білків, які змінюють їх функціонування незалежно від рецептор-діючих агоністів.

Проведені дослідження показали, що екзогенний GDP, взятий в широкому діапазоні концентрацій, не впливає на пасивний транспорт кальцію (малюнок 3), що свідчить про те, що GDP-лігандована форма G-білка - незалежно від його типу - неактивна в регуляторному відношенні.

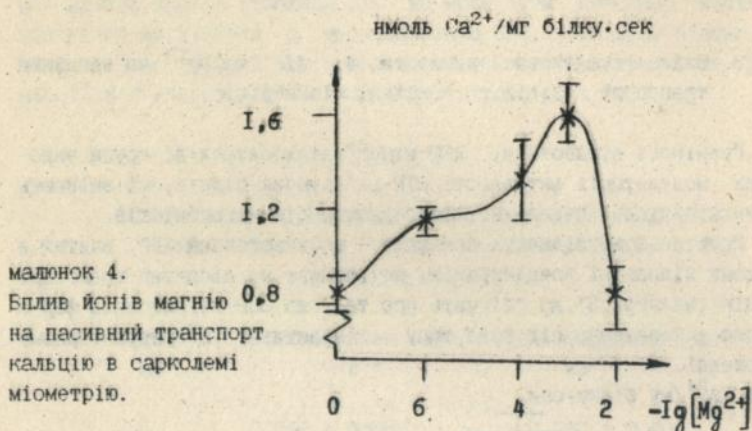
нмоль Ca^{2+} /мг білку·сек



малюнок 3. Вплив гуанінових нуклеотидів на початкову швидкість пасивного виходу кальцію з інвертованих везикул сарколеми міометрію:

- | | |
|----------------|-----------------------|
| 1 - 1 мМ GTP | 3 - контроль |
| 2 - 0,1 мМ GTP | 4 - 0,1 мМ-0,1 мМ GDP |
| | - 9 - |

Відомо, що механізм активації-інактивації α -субодиниці G-білку, який регулюється процесами зв'язування та гідролізу GTP (Gilman, 1987), вимагає присутності йонів магнію. Під час використання в якості модулюючого активність G-білків агента йонів магнію, ми одержали двухфазну криву (малюнок 4), яка свідчить про наявність двох типів місць зв'язування даного катіону в мембранними структурами міомерію.



Таблиця 4.

ВПЛИВ GTP ТА АТР В ПРИСУТНОСТІ ЙОНІВ МАГНІЮ НА ПОЧАТКОВУ ШВИДКІСТЬ ПАСИВНОГО ТРАНСПОРТУ КАЛЬЦІЮ В ВЕЗИКУЛАХ САРКОЛЕМИ МІОМЕРІЮ.

[GTP], мМ : [АТР], мМ : початкова швидкість виходу,
нмоль Ca^{2+} /мг білку·сек

0	0	0,59 ± 0,04
0	1,0	0,88 ± 0,04
0,1	0	0,78 ± 0,03
1,0	1,0	1,16 ± 0,09

Відомо, що G-білки в плазматичних мембранах багатьох тканин тісно асоційовані з нуклеотиддифосфокіназою, здійснюють трансфосфорильовання ендогенного GDP на α -субодиниці G-білку (Otero, 1990) за рахунок ATP або GTP (Heidbischel, 1990).

Одержані нами результати про активуючу дію GTP та ATP на пасивний транспорт кальцію в сарколемі міомерію (малюнок 4, таблиця 4) свідчить на користь припущення про можливість асоціації G-білків тканин гладеньких м'язів міомерію з нуклеотиддифосфокіназою та пояснює активацію G-білків сарколеми міомерію незалежно від агоністів-індукуючих активацію рецепторів.

4. Вплив іонів алюмінію, фториду та комплексного йона фтороалюмінату на пасивний транспорт кальцію.

Ряд G-білків можуть активуватися сумішшю фторид-іонів та йонів алюмінію, які дають комплексний йон фтороалюмінату (AlF_4^-) (Inoue, 1990; Higashijima, 1987). При цьому відбувається дисоціація α -субодиниці G-білка від $\beta\gamma$ -димера (Kohonen, 1989), а при цьому α -субодиниця, але не $\alpha 1/\alpha 2$, переходить в розчинну форму та дисоціює від мембрани (Скурат, 1989). Таким чином концентрація $\beta\gamma$ -димерного комплексу в мембрані зростає. Відомо, що $\beta\gamma$ -димер здатний модулювати ряд систем вторинних месенджерів, незалежно від α -субодиниць (Katada, 1987; Birnbaumer, 1990) та зв'язувати кальмодулін плазматичних мембран (Katada, 1987). В цьому зв'язку виникає питання про $\beta\gamma$ -залежну регуляцію пасивного транспорту кальцію в сарколемі міомерію.

Для цього ми позбувались від мембранозв'язаного кальмодуліну шляхом обробки везикул сарколеми міомерію 1 мМ EGTA в присутності 0,2 М NaCl (Кондратюк, 1988). Вивчення пасивного виходу кальцію з везикул, які містять та які не містять кальмодулін, дозволяє зробити припущення про інгібуючу дію ендогенного кальмодуліну на активність структури, яка пасивно транспортує кальцій. Цей вплив може бути зумовлений взаємодією кальмодуліну з $\beta\gamma$ -димером Gi/Go-білку та/або взаємодією кальмодуліну з каналною структурою. Для визначення ролі $\beta\gamma$ -субодиниць G-білків в модуляції транспорту кальцію в сарколемі міомерію ми вивчили вплив комплексного йону фтороалюмінату на цей процес.

Експерименти показали, що окремо 1 мМ F^- , 10 мкМ Al^{3+} та їх комбінація не чинять впливу на пасивний транспорт кальцію, неза-

лежно від присутності в мембрані кальмодуліну, в той час як 10 мМ F^- інгібує його в 3,5 рази в порівнянні з контролем (таблиця 5) для везикул з кальмодуліном, можливо, за рахунок присутності ендогенного Al^{3+} в тканині (Anderson, 1991). Фтороалюмінат в відношенні Al^{3+}/F^- - 1/1000 повністю інгібує пасивний вихід кальцію з везикул сарколеми місметрію,

Таблиця 5.

ПОЧАТКОВА ШВИДКІСТЬ ВИХОДУ КАЛЬЦІЮ
З ІНВЕРТОВАНИХ ВЕЗИКУЛ САРКОЛЕМИ МІСМЕТРІЮ,
ЯКІ МІСТЯТЬ ТА НЕ МІСТЯТЬ КАЛЬМОДУЛІН, ПІД ВПЛИВОМ
ФТОРИД-ІОНУ, ІОНУ АЛЮМІНІЯ ТА ФТОРОАЛЮМІНАТУ.

[F ⁻], мМ : [Al ³⁺], мМ :		початкова швидкість виходу	
		: нмоль Ca ²⁺ /мг білку·сек	
		: везикули з : везикули без	
		: кальмодуліном : кальмодуліну	
0	0	0,69 ± 0,02	0,90 ± 0,03
10,0	0	0,23 ± 0,09*	0
0	0,01	0,59 ± 0,02	0,92 ± 0,01
10,0	0,01	0	0

*p < 0,05

незалежно від присутності в мембрані кальмодуліну (таблиця 5). Інгібування забезпечується блокуванням GTPазної активності

$\alpha 1/\omega$ -субодиниць G-білку плазматичної мембрани місметрію із-за відсутності субстрату для реакції, оскільки активація G-білку комплексним йоном фтороалюмінату здійснюється за рахунок його взаємодії з ендогенним GDP на α -субодиниці, що імітує ефект GTP (Deterre, 1987).

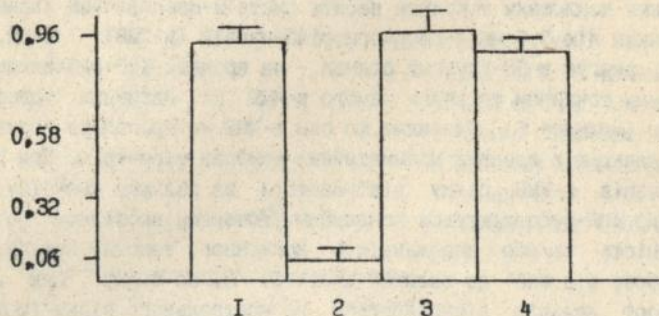
Таким чином, інгібуючий вплив активованих фтороалюмінатом G-білків на пасивну проникність сарколеми місметрію для кальцію, мабуть, не залежить від присутності в мембрані кальмодуліну, який має зв'язуючу $\gamma\gamma$ -димер здатність.

Відповідно, індивідуальні $\gamma\gamma$ -субодиниці G-білку не є регуляторним

компонентом системи, яка пасивно транспортує кальцій в міометрії сама по собі.

Б. Вплив ADP-рибовилування коклюшним токсином плазматичних мембран міометрію на пасивний транспорт кальцію в них.

нмоль Ca^{2+} /мг білку·сек



малюнок Б. Вплив цистеїн-специфічного ADP-рибовилування коклюшним токсином сарколеми міометрію на пасивний транспорт кальцію в них :

- 1 - контроль
- 2 - дослід з 10 мкг/мл токсину
- 3 - дослід з 10 мкг/мл токсину+0,5 мМ п-хлормеркурій-бензоат
- 4 - контроль + 0,5 мМ п-хлормеркурійбензоат

ADP-рибовилування коклюшним токсином G-білків, чутливих до нього, приводить до зміни активності аденілатциклази, фосфоліпази С, каналних структур. Рахують, що G-білки - субстрати коклюшного токсину втягуються в зниження концентрації внутрішньоклітинного кальцію (Gilman, 1987).

Одержані результати свідчать про те, що ADP-рибовилування коклюшним токсином везикул сарколеми міометрію веде до суттєвого інгібування пасивних потоків кальцію через мембрану (малюнок Б).

В результаті експериментів з варіювання концентрації коклюшного токсину та часу інкубації везикул з ним можна констатувати, що під час інкубації везикул (2 мкг/мл білку плазматичних

мембран) в 10 мкг/мл коклюшного токсину на протязі 1 години відбувається повне ADP-рибозилування всіх сайтів G-білку - субстрату цього токсину в сарколемі міомерію.

Відомо, що: а) коклюшний токсин ADP-рибозилує тільки зв'язані в плазматичною мембраною G-білки (Jacobson, 1990); б) ковалентна модифікація відбувається на залишку цистеїну (Voskaert, 1987). Для доказу того, що і в тканині гладеньких м'язів міомерію ADP-рибозилування коклюшним токсином носить цистеїн-специфічний характер, ми вивчили дію 0,5 мМ п-хлормеркурійбенаоату (п-ХМБ) - який, як відомо, реагує з SH-групами білків - на процеси ADP-рибозилування коклюшним токсином та вплив самого п-ХМБ на пасивний транспорт кальцію (малюнок 5). Очевидно, що сам п-ХМБ не проявляє впливу на вихід кальцію з везикул плазматичних мембран міомерію. При цьому модифікація п-ХМБ білку відбувається на залишку цистеїну, який звичайно ADP-рибозилується коклюшним токсином, наслідком чого є неадатність та/або неможливість коклюшного токсину приєднувати ADP-рибову від NAD^+ до залишку цистеїну $\alpha 1/\omega$ -білку. При цьому транспорт кальцію відновлюється до контрольного рівня (малюнок 5).

Таким чином, суттєве інгібування пасивного транспорту кальцію в сарколемі міомерію під впливом ADP-рибозилування коклюшним токсином свідчить про те, що один із механізмів регуляції системи, яка пасивно транспортує кальцій в міомерії, здійснюється через G-білок, чутливий до коклюшного токсину.

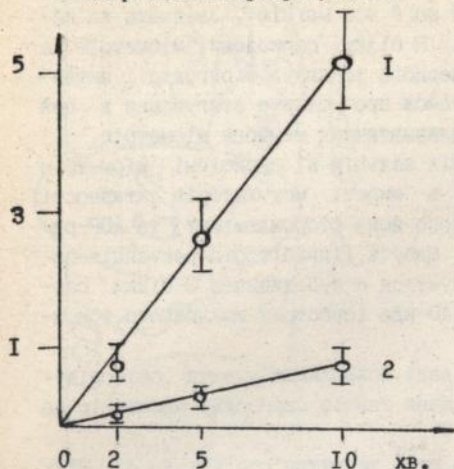
6. Характеристика GTPазної активності сарколеми міомерію.

Необхідність GTPазної активності α -субодиниці G-білку диктується необхідністю в його інактивації.

Ми показали, що інгібування коклюшним токсином GTPазної активності везикул сарколеми міомерію суттєво (в 5,5 рази) в порівнянні з немодифікованими ADP-рибовою везикулами (малюнок 6).

Оскільки інгібування GTPазної активності плазматичних мембран міомерію відбувається за відношення концентрацій коклюшного токсину та мембранного білку 1/200, а саме таке їх співвідношення викликає максимальне інгібування пасивного транспорту кальцію в сарколемі міомерію, ми припускаємо, що саме інгібування GTPазної активності G-білку плазматичних мембран міомерію, чутливого до коклюшного токсину, змінює активність кальцій-транспор-

туючої системи в міометрії.
неорганічний фосфат, пмоль



малюнок 6.

Активність GTPази нативних (1) та ADP-рибозильованих коклюшним токсином (2) плазматичних мембран міометрії за інкубації їх з 10 нМ $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-GTP}$.

Розраховане згідно експериментальних даних значення K_m GTPазної реакції для нативних плазматичних мембран складає $0,15 \pm 0,02$ мкМ, а для ADP-рибозильованих коклюшним токсином - $22,51 \pm 1,00$ мкМ. Це свідчить про те, що афінність ADP-рибозильованного G-білку до GTP зростає.

Таким чином, цистеїн-специфічна ковалентна модифікація G-білку - субстрату коклюшного токсину в міометрії - по-різному впливає на просторову організацію GTP-зв'язуючого сайту та сайту, який приймає участь в гідролізі GTP. Зв'язано це, можливо, з конформаційними перебудовами в ADP-рибозильованному білку та його стабілізацією в цьому стані (Winslow, 1986).

ЗАКЛЮЧЕННЯ

Зміна концентрації кальцію в цитозолі є важливою регуляторною компонентою, яка забезпечує контроль скорочувальної активності міометрію. Рецептор-опосередкована регуляція контрактильної активності гладеньких м'язів забезпечується GTP-зв'язуючими білками.

Ми показали, що і в відсутності агоніста має місце GTP-залежна регуляція пасивного транспорту кальцію в сарколемі міомет-

рiю.

Експерименти, якi демонструють активацiю пасивного транспорту кальцiю (в присутностi GTP, ATP та β нiв магнiю), свiдчать на користь втягування α -субодиницi G-бiлку сарколеми мiометрiю з мол.масою 42 кДа (субстрат холерного токсину) в регуляцiї активностi канальної структури, а також про можливе втягування в цей процес нуклеотидифосфокiнази плазматичних мембран мiометрiю.

Ингiбування пасивних потокiв кальцiю в сарколемi мiометрiю досягається за використанням в якостi модуляторiв активностi G-бiлкiв фторид-йону, комплексного йона фтороалюмiнату та ADP-рибозилування коклюшним токсином. Мабуть, ингiбиторна регуляцiя пасивних потокiв кальцiю забезпечується α -субодиницею G-бiлка сарколеми мiометрiю з мол.масою 40 кДа (субстрат коклюшного токсину).

Одержанi експериментальнi данi дозволяють уявити собi слiдуючу модель активацiї GTP-зв'язуючих сайтiв сарколеми мiометрiю за вiдсутностi агонiстiв (малюнок 7).

В присутностi GTP (ATP) та Mg^{2+} ефективнiсть впливу α i-GTP- $\beta\gamma$ - та α i-GDP- $\beta\gamma$ - форм G-бiлку - субстрату коклюшного токсину з молекулярною масою 40 кДа на транспортний процес одинакова i, мабуть, якраз i визначає базальний транспорт кальцiю. Активацiя канальної структури здiйснюється, швидше всього, активованою α s-GTP-субодиницею G-бiлку - субстрату холерного токсину з молекулярною масою 42 кДа.

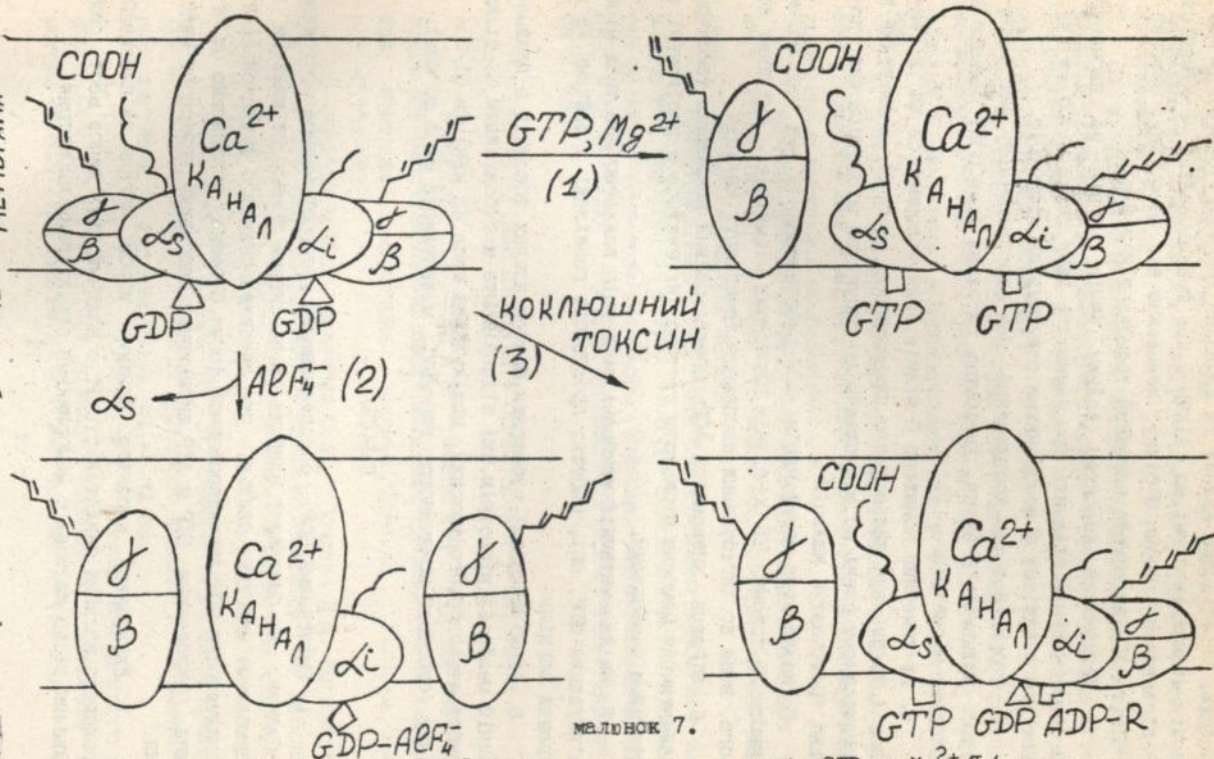
В присутностi фтороалюмiнату α s-субодиниця дисоцiює з плазматичної мембрани в цитозоль. Ингiбування пасивного транспорту кальцiю викликається α i-GDP-AlF₄- $\beta\gamma$ -субодиницею за рахунок блокування її GTPазної активностi. Можливо, збiльшення концентрацiї вiльних $\beta\gamma$ -димерних комплексiв в плазматичнiй мембранi також проявляє модулюючий ефект на транспорт кальцiю.

За ADP-рибозилування коклюшним токсином Gi/Go-бiлку ингiбування пасивного транспорту кальцiю забезпечується α i-GDP-ADP-рибозо- $\beta\gamma$ - модифiкованим тримером, а α s-GTP-субодиниця визначає незначний транспорт кальцiю, який все-таки вiдбувається за ковалентної модифiкацiї G-бiлку - субстрату коклюшного токсину.

ВИСНОВКИ

1. Екзогенний GDP, який забезпечує гетеротримерний стан

ПЛАЗМАТИЧНА
МЕМБРАНА
ЦИТОЗОЛ



GTP, Mg²⁺
(1)

ЦИКЛУШНИЙ
ТОКСИН
(3)

AEF₄ (2)

GTP GDP ADP-R

МАЛЮНОК 7.

Модель модуляції активності G-білків сарколеми міомерів GTP та Mg²⁺/1/, комплексним іоном фтороалемінату /2/ та АДФ-рибозильованим циклічним токсином /3/.

ДНБ ім. В. Стефанишин
АН України

G-білків, не здійснює впливу на пасивний транспорт кальцію в сарколемі міомерію свині, що свідчить про функціональну неактивність GDP-лігандованої форми G-білку, незалежно від його типу. Екзогенні GTP та ATP активують пасивний транспорт кальцію.

2. Двохфазний характер впливу йонів магнію на пасивний транспорт кальцію свідчить про наявність двох типів місць зв'язування цього катіону з мембранними структурами міомерію.

3. Фторид-йон та комплексний йон фтороалюмінату, які необоротно активують G-білки, інгібують пасивний транспорт кальцію в сарколемі міомерію.

4. Ву-димерний комплекс G-білків, який утворюється за їх активації та зв'язує кальмодулін плазматичних мембран, неактивний в регуляторному плані по відношенню до структури міомерію, яка пасивно транспортує кальцій.

5. Ковалентна модифікація ADP-рибозильованням за допомогою коклюшного токсину G1/Go-білків сарколемі міомерію, чутливих до нього, веде до інгібування пасивного транспорту кальцію.

6. GTPазна активність ADP-рибозильованих коклюшним токсином плазматичних мембран міомерію суттєво інгібується в порівнянні з нативними мембранами.

7. На плазматичній мембрані міомерію виявлено два типи місць зв'язування GTP, які, мабуть, просторово розділені з сайтами зв'язування магнію.

8. Ідентифіковані субстрати бактеріальних токсинів в плазматичній мембрані міомерію, які відповідають α -субодиницям Gs-білку (субстрат холерного токсину, молекулярна маса 42 кДа) та G1/Go-білку (субстрат коклюшного токсину, молекулярна маса 40 кДа).

ВЫВОДЫ

1. Экзогенный GDP, обеспечивающий гетеротримерное состояние G-белков, не оказывает влияния на пассивный транспорт кальция в сарколемме миеотрия свиньи, что свидетельствует о функциональной неактивности GDP-лигандированной форме G-белка, независимо от его типа. Экзогенные GTP и ATP активируют пассивный транспорт кальция.

2. Двухфазный характер влияния ионов магния на пассивный транспорт кальция свидетельствует о наличии двух типов мест связывания этого катиона с мембранными структурами миеотрия.

3. Фторид-ион и комплексный ион фтороалюмината, необратимо активизирующие G-белки, ингибируют пассивный транспорт кальция в сарколемме миометрия.

4. ВГ-димерный комплекс G-белков, образуемый при их активации и связывающий кальмодулин плазматических мембран, неактивен в регуляторном плане по отношению к пассивно транспортирующей кальций структуре миометрия.

5. Ковалентная модификация ADP-рибозилированием с помощью коклюшного токсина G1/Go-белков сарколеммы миометрия, чувствительных к нему, ведет к ингибированию пассивного транспорта кальция.

6. GTPазная активность ADP-рибозилированных коклюшным токсином плазматических мембран миометрия существенно ингибируется по сравнению с нативными мембранами.

7. На плазматической мембране миометрия обнаружено два типа мест связывания GTP, которые, по-видимому, пространственно разделены с сайтами связывания магния.

8. Идентифицированы субстраты бактериальных токсинов в плазматической мембране миометрия, которые соответствуют α -субъединицам Gs-белка (субстрат холерного токсина, молекулярная масса 42 кДа) и G1/Go-белка (субстрат коклюшного токсина, молекулярная масса 40 кДа).

ОСНОВНИ МАТЕРІАЛИ ДИСЕРТАЦІЇ ОПУБЛІКОВАНІ В СЛІДУЮЧИХ РОБОТАХ :

1. Кропотова С.А., Коц А.Я., Сенько Л.Н., Курский М.Д. Субстраты ADP-рибозилирования бактериальными токсинами в плазматической мембране миометрия свиньи//Докл.АН Украины.-1992.-N11.-С.151-153.

2. Курский М.Д., Кропотова С.А., Прищеп Л.А. Ингибирующее действие ADP-рибозилирования коклюшным токсином на пассивный транспорт кальция в плазматической мембране миометрия свиньи//Биохимия.-1992.-57.-N11.-С.1751-1755.

3. Кропотова С.А., Курский М.Д. Влияние гуаниновых нуклеотидов и ионов магния на пассивный транспорт кальция в сарколемме миометрия//Докл.АН Украины.-1993.-N1.-С.84-88.

4. Кропотова С.А., Курский М.Д. Влияние комплексного иона фтороалюмината на пассивный транспорт кальция в сарколемме миометрия свиньи//Укр.Биохим.журн.-1993.-65.-N1.-С.116-119.

465091

Безплатно

АВ 27.434