

УДК 577.153

ВОССТАНОВЛЕНИЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ СОЛЮБИЛИЗИРОВАННОЙ АДЕНИЛАТЦИКЛАЗЫ СЕРДЦА КРОЛИКА К ГОРМОНАМ И ГУАНИЛОВЫМ НУКЛЕОТИДАМ

*ГРИГОРЯН Г. Ю., БАЛДЕНКОВ Г. Н., АВДОНИН П. В.,
ПАНЧЕНКО М. П., ТКАЧУК В. А., ШВЕЦ В. И.*

Солюбилизация аденилатциклазы лубролом РХ приводит к потере ее чувствительности к гормонам, но сохраняет способность фермента активироваться гуаниловыми нуклеотидами и NaF. Луброл WX лишает аденилатциклазу чувствительности к гормонам и к NaF. Солюбилизация вызывает сдвиг оптимума pH аденилатциклазы в область нейтральных значений pH и значительно понижает термоустойчивость фермента. Вытеснение луброла РХ из солюбилизированного препарата фосфолипидами приводит к повышению базальной активности аденилатциклазы (фосфатидилсерин) или восстановлению чувствительности к адреналину и глюкагону (фосфатидилинозит). Восстановление чувствительности аденилатциклазы к катехоламинам с помощью фосфатидилинозита получено также после удаления ионообменной хроматографией избытка детергента, а также после замещения дуброла РХ в солюбилизированном препарате на холат. Активация реконструированной хроматографией избытка детергента, а также после замещения луброла детельствует об участии в активирующем эффекте β -адренергических рецепторов. Восстановление чувствительности аденилатциклазы к гормонам, происходящее под действием фосфатидилинозита, сопровождалось повышением активирующего влияния гуанилилимидодифосфата на фермент.

Аденилатциклаза (КФ 4.6.1.1, АТР-пирофосфат — лиаза, циклизующая) опосредует действие ряда гормонов и других биологически активных веществ на метаболизм и функциональную активность клетки. Выяснение механизмов регуляции активности этого фермента сопряжено с рядом трудностей, одна из которых обусловлена несовершенством существующих методов разделения и реконструкции аденилатциклазы и ее регуляторных белков. Являясь интегральным белком плазматических мембран, аденилатциклаза с трудом поддается солюбилизации. Применение неионных детергентов позволяет перевести часть мембраносвязанной аденилатциклазы в растворимое состояние, однако при этом исчезает чувствительность фермента к гормонам [1—4].

В работах Леви [2—4] было показано, что добавление фосфатидилинозита (ФИ) к солюбилизированной лубролом РХ аденилатциклазе из сердца кошки восстанавливает чувствительность фермента к катехоламинам, а чувствительность к глюкагону восстанавливается под действием фосфатидилсерина.

В настоящей работе проведено сравнение действия двух неионных детергентов — луброла РХ и WX на аденилатциклазу из сердца кролика. Охарактеризованы регуляторные свойства солюбилизированной аденилатциклазы, а также методы восстановления ее чувствительности к гормонам и гуаниловым нуклеотидам.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Фракцию плазматических мембран выделяли из сердца кролика по методу, описанному ранее [5].

Солюбилизация аденилатциклазы. К суспензии мембран объемом 6 мл (концентрация белка 3—5 мг/мл) приливали равный объем раствора детергента, содержащего 20 мМ трис-НСl (рН 7,4 при 4°), 20 мМ гистидин, 1 мМ ЭДТА, 1 мМ дитиотреитол, 5 мМ MgCl₂, а также 0,6%-ный или 1,2%-ный луброл WX или 1,2%-ный луброл PX. Суспензию медленно перемешивали в течение 1—2 ч при 4° и затем центрифугировали 1 ч при 105 000 г. Полученный осадок суспендировали в том же растворе без детергента. Белковую фракцию в надосадочной жидкости обозначали как солюбилизированный препарат аденилатциклазы.

Для удаления детергента из солюбилизированного препарата надосадочную жидкость, полученную после центрифугирования при 105 000 г, наносили на колонку (1,2×8 см) с ДЭАЭ-целлюлозой, уравновешенной буфером А, содержащим 10 мМ имидазол-НСl (рН 7,4 при 4°), 1 мМ ЭДТА, 5 мМ MgCl₂ и 1 мМ дитиотреитол, и затем колонку промывали тем же буфером до тех пор, пока оптическая плотность (280 нм) элюируемого раствора не снижалась до фоновых значений. Аденилатциклазу элюировали с колонки с помощью буфера А, содержащего дополнительно 1 М KCl. Фракции, обладающие активностью аденилатциклазы, объединяли и диализовали против 2 л буфера А в течение суток. Полученный таким способом препарат аденилатциклазы, освобожденный от избытка луброла PX, концентрировали на мембране МБ1-1111 под давлением азота с помощью прибора для ультрафильтрации (Ленинградское СКБ аналитического приборостроения).

Замещение луброла PX на холат натрия проводили с помощью колонки с ДЭАЭ-целлюлозой (1,5×8 см), уравновешенной буфером, содержащим 10 мМ имидазол-НСl (рН 7,4 при 4°), 1 мМ ЭДТА, 1 мМ дитиотреитол, 1 мМ MgCl₂ и 0,2%-ный луброл PX. После нанесения солюбилизированного препарата колонку промывали буфером, в котором луброл PX был замещен на 0,1%-ный холат натрия. Белковый пик, обладающий активностью аденилатциклазы, элюировали градиентом KCl и затем концентрировали в 5 раз с помощью ячеек для ультрафильтрации (модель 52, «Amicon», США) на мембране РМ 10 под давлением азота.

Реконструкцию гормональной чувствительности аденилатциклазы с помощью фосфолипидов осуществляли следующим образом: раствор фосфолипида в хлороформе упаривали досуха в ротормном испарителе и затем суспендировали в буфере, содержащем 10 мМ имидазол-НСl (рН 7,5 при 4°), 1 мМ ЭДТА, 1 мМ MgCl₂ и затем подвергали ультразвуковой обработке с помощью прибора УЗДН-1 с частотой 22 кГц в охлаждаемой ячейке 3 раза по 1 мин с перерывами в 30 с. Полученную таким образом суспензию липосом добавляли к равному объему солюбилизированной аденилатциклазы, перемешивали и инкубировали 24 ч при 4°.

В экспериментах с аденилатциклазой, освобожденной от избытка детергента, использовали липосомы из ФИ, приготовленные методом замораживания-оттаивания. Для этого раствор ФИ в хлороформе упаривали досуха в ротормном испарителе и суспендировали в буфере, содержащем 10 мМ имидазол-НСl (рН 7,5 при 4°), 1 мМ ЭДТА, 5 мМ MgCl₂ и 100 мМ KCl. Пробирку с суспензией ФИ замораживали в жидком азоте, потом оттаивали и повторяли эту процедуру 15 раз. После этого аликвоту суспензии липосом смешивали с аликвотой солюбилизированного препарата аденилатциклазы, освобожденного от избытка детергента.

В опытах по восстановлению гормональной чувствительности аденилатциклазы в присутствии холата натрия раствор ФИ в хлороформе испаряли в токе CO₂, липид растворяли в диэтиловом эфире и опять испаряли. В пробирку, покрытую пленкой ФИ, добавляли 150—300 мкл солюбилизированного препарата аденилатциклазы в 0,1%-ном холате натрия и смесь перемешивали до образования равномерной суспензии. Затем полученную смесь помещали в прибор для микроанализа и проводили диализ 50 ч против 1 л буферного раствора, содержащего 10 мМ имидазол-НСl (рН 7,5 при 4°) и 1 мМ ЭДТА. За 12 ч до окончания диализа в буферный раствор добавляли 1 г сервахрома XAD-2.

Определение активности аденилатциклазы проводили с помощью методов, описанных ранее [5]. При использовании в качестве субстрата аденилатциклазы АТР в высокой концентрации инкубационная среда содержала 50 мМ трис-НСl (рН 7,5 при 37°), 1 мМ ЭДТА, 1 мМ дитиотреитол, 5 мМ теofilлин, 5 мМ MgCl₂, 1 мМ АТР, 20 мМ креатинфосфат и 1 мг/мл креатинкиназы. При использовании низкой концентрации АТР активность аденилатциклазы определяли в присутствии 50 мМ трис-НСl (рН 7,5 при 37°), 0,1 мМ [¹⁴C]АТР (5·10⁵ имп/мин в пробе), 1 мМ 3':5'-АМР, 5 мМ MgCl₂, 1 мМ дитиотреитол, 1 мМ ЭДТА, 20 мМ креатинфосфат и 1 мг/мл креатинкиназы. Во всех случаях содержание препарата аденилатциклазы в среде инкубации составляло 5—50 мкг белка и реакцию проводили 10 мин при 37°.

В ряде опытов для измерения активности аденилатциклазы использовали [α -³²P]АТР. Ферментный препарат инкубировали 15 мин при 30° в 50 мкл инкубационной среды следующего состава: 50 мМ трис-НСl (рН 7,5 при 30°), 1 мМ ЭДТА, 5 мМ MgCl₂, 1 мМ 3':5'-АМР, 0,5 мМ [α -³²P]АТР (0,5 мкКи в пробе), 1 мМ дитиотреитол, 20 мМ креатинфосфат, 1 мг/мл креатинкиназы. Реакцию начинали добавлением в пробы 2—50 мкг ферментного препарата; смесь инкубировали 10—15 мин при 30°; реакцию останавли-

вали добавлением 200 мкл 0,5 н. HCl. Затем пробы выдерживали 15 мин при 90°, после чего их нейтрализовали 200 мкл 1,5 М имидазола. Образовавшийся [α - 32 P]-3':5'-AMP определяли по методу Уайта [6]. Содержимое пробы наносили на колонку, содержащую 1 г окиси алюминия, и элюцию проводили 5 мл буфера, содержащего 10 мМ имидазол-HCl (рН 7,5 при 20°), непосредственно в сцинтилляционные флаконы. Радиоактивность измеряли по Черенкову в жидкостном сцинтилляционном счетчике.

В работе использовали трис, дитиотреитол, имидазол, АТР, 3':5'-AMP, гуанил-5'-ил-имиодифосфат (ГИДФ), креатинкиназу, теофиллин, L-изопроterenол — фирмы «Sigma» (США); L-адреналин («Calbiochem», США); ДЭАЭ-целлюлозу DE-52 («Whatman», Англия); луброл WX и RX («Merck», ФРГ); ЭДТА, сервахром XAD-2 («Serva», ФРГ); гистамин («Fluka», Швейцария); гистидин, холат натрия, креатинфосфат («Reanal», Венгрия), фосфатидилхолин, фосфатидилсерин, фосфатидилинозит («Koch-Light», США), [α - 32 P]АТР («Amersham», Англия). В ряде случаев ФИ выделяли из пекарских дрожжей [7]. Препараты фосфолипидов были хроматографически однородными. Остальные реактивы отечественного производства квалификации ос. ч. или х. ч.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

После инкубации мембранного препарата с 0,3%-ным лубролом WX и последующего центрифугирования при 105 000 г в течение 1 ч в надосадочной фракции остается ~26% белка мембран и 12% активности аденилатциклазы (табл. 1). При увеличении концентрации луброла WX в 2 раза выход белка повышается до 35%, а количество солюбилизированной аденилатциклазы увеличивается в 2 раза. Однако в обоих случаях удельная активность солюбилизированной аденилатциклазы оказывается ниже, чем мембранной (табл. 1). При использовании 0,6%-ного луброла RX активность солюбилизированной аденилатциклазы оказывается близкой активности аденилатциклазы в нативных мембранах. В этом случае и выход белка, и количество солюбилизированной аденилатциклазы составляют 15% (табл. 1). Интересно отметить, что после обработки мембран 0,6%-ным лубролом WX резко повышается общая активность аденилатциклазы в осадке мембран (табл. 1). Возможно, такая активация является следствием разрушения структуры мембран под действием детергента. Характерной чертой препаратов солюбилизированной аденилатциклазы является полное отсутствие чувствительности к катехоламинам (табл. 2). Фторид не активировал аденилатциклазу в тех случаях, когда в качестве солюбилизирующего агента использовали луброл WX. Использование луброла RX позволяет сохранить чувствительность солюбилизированной аденилатциклазы к фториду.

Активность аденилатциклазы, солюбилизированной лубролом WX и лубролом RX, имеет одинаковую зависимость от рН среды. Как видно из рис. 1, мембраносвязанная аденилатциклаза имеет оптимум рН, равный 8,5. При солюбилизации оптимум реакции сдвигается в область нейтральных значений рН. Это ставит под сомнение точку зрения, согласно которой зависимость активности аденилатциклазы от значения рН среды определяется лишь степенью протонирования АТР [8, 9].

Таблица 1

Солюбилизация аденилатциклазы сердца кролика лубролом WX и лубролом RX
Удельная активность аденилатциклазы выражена в пмоль 3':5'-AMP на 1 мг белка
в 1 мин, а общая — в пмоль 3':5'-AMP в 1 мин

Тип детергента	Нативные мембраны			Солюбилизированный препарат			Осадок мембран после солюбилизации		
	Белок, мг	Активность		Белок, мг	Активность		Белок, мг	Активность	
		удельная	общая		удельная	общая		удельная	общая
Луброл WX: 0,3%	89	87	7750	23	39	900	63	87	5450
0,6%	40	204	8160	14	138	1920	26	1436	36615
Луброл RX, 0,6%	41	140	5760	6	144	864	35	111	3900

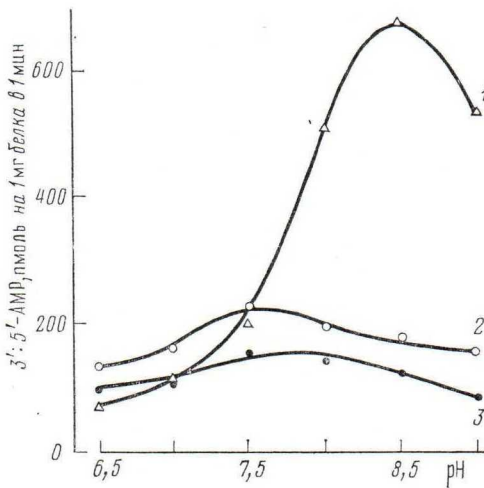


Рис. 1

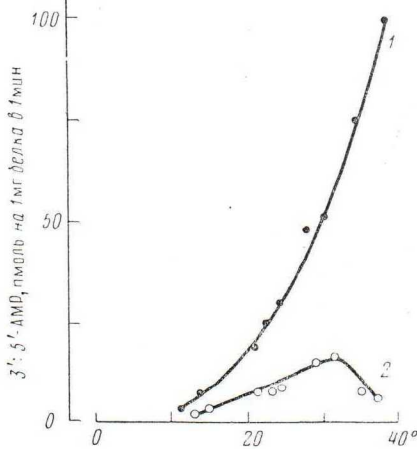


Рис. 2

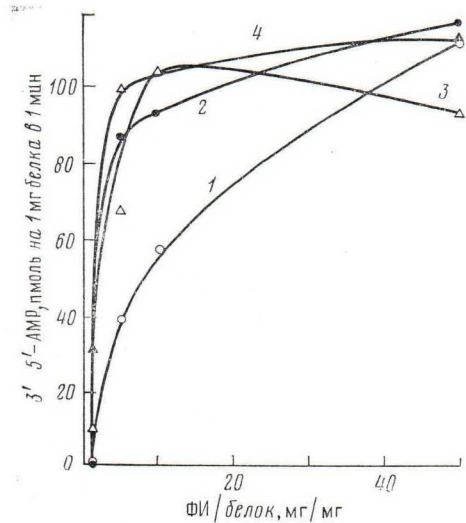


Рис. 3

Рис. 1. Зависимость активности аденилатциклазы от рН среды
1 — нативные мембраны, 2 — фермент, солюбилизованный 0,6%-ным лубролом WX, и 3 — солюбилизованный 0,6%-ным лубролом РХ

Рис. 2. Зависимость активности аденилатциклазы от температуры
1 — нативные мембраны, 2 — солюбилизованная аденилатциклаза

Рис. 3. Зависимость активности солюбилизованной аденилатциклазы от концентрации ФИ
Луброл РХ в солюбилизованном препарате замещали на холат натрия, который затем удаляли диализом в присутствии различных концентраций ФИ; 1 — базальная активность, 2 — 10^4 М изопротеренол, 3 — 10^{-4} М ГИДФ, 4 — 10^{-4} М ГИДФ + 10^{-4} М изопротеренол

При солюбилизации происходит резкое изменение термоустойчивости аденилатциклазы. Как видно из рис. 2, при увеличении температуры выше 32° удельная активность фермента снижается.

Поскольку солюбилизация мембран лубролом РХ позволяла сохранить базальную активность аденилатциклазы на исходном уровне и избежать потери чувствительности к фториду (табл. 2), во всех последующих экспериментах использовали этот детергент.

Для выяснения влияния фосфолипидов на регуляторные свойства солюбилизованной аденилатциклазы использовали липосомы, приготовленные из фосфатидилхолина, фосфатидилинозита или из фосфатидилсерина. Результаты одного из таких опытов, приведенные в табл. 3, показывают, что фосфатидилхолин не влияет на регуляторные свойства солюбилизованной аденилатциклазы. В присутствии ФИ адреналин и глюкагон приобретают способность активировать аденилатциклазу, но чувствительность фермента к гистамину не восстанавливается. Фосфатидилсерин в 4—6 раз увеличивает базальную активность аденилатциклазы, однако не восстанавливает ее чувствительность к гормонам и резко, как и ФИ, увеличивает фторидстимулируемую активность фермента.

Таблица 2

Изменение регуляторных свойств аденилатциклазы сердца при солюбилизации мембран лубролом WX и PX

Активность аденилатциклазы выражена в пмоль 3':5'-АМР на 1 мг белка в 1 мин

Тип детергента	Нативные мембраны			Солюбилизованный препарат		
	без добавок	адреналин, 10^{-4} М	NaF, 10^{-2} М	без добавок	адреналин, 10^{-4} М	NaF, 10^{-2} М
Луброл WX: 0,3%	96	395	550	32	39	36
0,6%	205	323	394	138	167	126
Луброл PX, 0,6%	140	336	560	144	146	1400

Таблица 3

Влияние фосфолипидов на регуляторные свойства солюбилизованной лубролом PX аденилатциклазы сердца кролика

Солюбилизованный препарат не был отмыт от избытка детергента. Активность выражена в %; за 100% принята базальная активность солюбилизованной аденилатциклазы

Эффекторы	Без добавленных фосфолипидов	Фосфатидилхолин	Фосфатидилинозит	Фосфатидилсерин
Без эффекторов	100	82±10	102±10	504±112
Адреналин, 10^{-4} М	—	92±20	392±82	582±173
Гистамин, 10^{-4} М	—	92±20	82±20	416±45
Глюкагон, 10^{-6} М	—	82±10	208±41	482±173
NaF, 10^{-2} М	1502±10	1220±245	3632±633	3102±612

Таблица 4

Свойства разных препаратов солюбилизованной аденилатциклазы, освобожденной от детергента на колонке с ДЭАЭ-целлюлозой

Активность выражена в пмоль 3':5'-АМР на 1 мг белка в 1 мин

Препараты	Базальная активность	Изопротеренол, 10^{-6} М	Адреналин, 10^{-4} М	ГИДФ, 10^{-4} М	ГИДФ, 10^{-4} М + изопротеренол, 10^{-6} М	NaF, 10^{-2} М
1	192±66	—	255±32	595±39	—	—
2	42±20	44±18	—	91±22	77±2	138±17
3	9,0±1,0	9,0±1,0	—	73±2	86±1	76±8
4	8,0±1,0	8,0±1,0	—	65±1	71±1	—
5	10±1	—	—	116±3	120±1	218±17
6	7,3±0,5	4,4±0,4	—	55±2	55±1	—
7	82±2	—	27±1	103±19	—	215±7

Результаты, приведенные в табл. 3, также указывают, что луброл PX солюбилизирует не только каталитическую субъединицу аденилатциклазы, но и весь аденилатциклазный комплекс: каталитический рецепторный и сопрягающий компоненты. Поскольку эти опыты проводились в присутствии детергента, который нарушает регулярную структуру бислоиных липосом и затрудняет изучение свойств реконструированной аденилатциклазы, в дальнейших опытах была предпринята попытка очистить солюбилизованный фермент от примеси луброла PX.

По данным некоторых авторов [10], применение ионообменной хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе позволяет удалить лишь избыток луброла PX. При этом с детергентом из солюбилизованного препарата обычно удаляется значительная часть фосфолипидов, которые, как видно из табл. 3, играют важную роль в функционировании аденилатциклазы. По-видимому, именно этим — разной степенью удаления детергента и фосфолипидов из ферментных препаратов — можно объяснить сущест-

Таблица 5

Восстановление под действием ФИ чувствительности к адреналину солюбилизированной и затем освобожденной от детергента аденилатциклазы
Весовое отношение белок/липид равно 2:1; активность выражена в пмоль 3':5'-АМР на 1 мг белка в 1 мин

Эффектор	Базальная активность	Адреналин, 10 ⁻⁴ М	Алпренолол, 10 ⁻⁴ М	Адреналин, 10 ⁻⁴ М, + алпренолол, 10 ⁻⁴ М
Без ФИ	215±20	207±25	252±8	181±23
ФИ	240±1	326±14	193±39	209±2

Таблица 6

Изменение активности солюбилизированной аденилатциклазы после замещения луброла РХ на холат

Активность выражена в пмоль 3':5'-АМР на 1 мг белка в 1 мин

Препарат	Без дсбавок	Изопротеренол, 10 ⁻⁴ М	ГИДФ, 10 ⁻⁴ М	ГИДФ, 10 ⁻⁴ М, + изопротеренол, 10 ⁻⁴ М
В присутствии луброла РХ После замены луброла РХ на 0,1%-ный холат	163±5 10±2	188±8 13±3	2082±60 18±4	2117±7 18±3

венные различия в базальной активности и регуляторных свойствах между разными препаратами солюбилизированной аденилатциклазы, полученными после хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе (табл. 4). Однако общим для всех этих препаратов фермента являлось отсутствие чувствительности к активирующему действию катехоламинов, при наличии чувствительности к влиянию ГИДФ (негидролизуемый аналог GTP) и фторида. В отличие от солюбилизированной аденилатциклазы, не подвергнутой хроматографии, солюбилизированная аденилатциклаза, отмывая от избытка луброла РХ, сохраняла свою активность и регуляторные свойства неизменными в течение продолжительного времени (при 4° в течение нескольких недель).

Используя эти препараты аденилатциклазы, удалось воспроизвести данные Леви [2, 3] по восстановлению с помощью ФИ чувствительности солюбилизированной и освобожденной от детергента аденилатциклазы к адреналину. При соотношении ФИ/белок, равном 1:2, фермент приобретает чувствительность к гормону (табл. 5). Эта активация аденилатциклазы адреналином осуществляется через β-адренэргические рецепторы, так как специфический β-адреноблокатор алпренолол устраняет эффект адреналина.

В ряде опытов проводили замещение луброла РХ в препарате аденилатциклазы на 0,1%-ный холат натрия. Солюбилизованную аденилатциклазу промывали холатом на колонке с ДЭАЭ-целлюлозой и затем элюировали градиентом КС1 в присутствии холата. Такой препарат аденилатциклазы обладал резко сниженной активностью и сниженной чувствительностью к изопротеренолу и ГИДФ (табл. 6). Последующий диализ препарата в течение 50 ч, проводившийся для удаления холата, вызывал полную инактивацию фермента. Добавление липосом ФИ перед диализом позволяло сохранить активность аденилатциклазы и восстановить ее чувствительность к активаторам. На рис. 3 приведена зависимость активности этого препарата аденилатциклазы от концентрации ФИ. При увеличении содержания ФИ возрастает базальная активность фермента, которая при соотношении фосфолипид/белок, равном 50:1, достигает того же уровня, что и в нативных мембранах. При соотношении фосфолипид/белок, равном 5:1, изопротеренол активирует

аденилатциклазу в 2 раза, ГИДФ в 1,8 раза, а при совместном действии этих агентов наблюдается 2,5-кратная активация аденилатциклазы. При дальнейшем увеличении содержания ФИ степень активации аденилатциклазы изопротеренолом и ГИДФ снижается. Возможно, избыток фосфолипида мешает взаимодействию белков, входящих в состав аденилатциклазного комплекса.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Исследование влияния неионных детергентов на аденилатциклазу показало [11, 12], что солюбилизация этого фермента существенно зависит от химической структуры детергента. Наиболее эффективными являются те детергенты, гидрофильно-липофильный баланс которых находится в области 11—14 [12, 13]. По-видимому, не существует детергента, обеспечивающего избирательную солюбилизацию аденилатциклазы.

Примененные в настоящей работе детергенты луброл РХ и луброл WХ принадлежат к классу детергентов со структурой $C_nH_{2n+1}O(OCH_2CH_2)_x$. Луброл РХ содержит смесь C_{12} и C_{14} алифатических углеводородных цепей, а число x у этого детергента равно в среднем 9,5; луброл WХ является смесью C_{16} и C_{18} алкильных цепей и имеет x , равный 16,4 [14]. Гидрофильно-липофильный баланс луброла РХ равен 12—13, а луброла WХ — 14,9 [12—14].

Согласно нашим данным (табл. 1 и 2), луброл РХ является более эффективным детергентом для солюбилизации аденилатциклазы, чем луброл WХ. Луброл РХ не инактивирует фермент, сохраняет его чувствительность к фториду и более избирательно, чем луброл WХ, солюбилизирует аденилатциклазу. Аналогичные данные были получены при исследовании аденилатциклазы, солюбилизированной лубролом РХ из желтого тела яичников коровы [15] и мозгового слоя надпочечников крысы [16]. Видимо потеря гормональной чувствительности в процессе солюбилизации (табл. 2) возникает ввиду того, что молекулы детергента нарушают функциональное сопряжение между рецепторами и аденилатциклазой. Гидрофобная часть молекулы луброла состоит из алифатической углеводородной цепи и мало отличается от жирнокислотных остатков мембранных фосфолипидов. Следовательно, можно ожидать, что причина потери чувствительности аденилатциклазы к гормонам обусловлена нарушением взаимодействия белков в их гидрофильных областях — областях полярных «головок» фосфолипидов. Это согласуется также со специфичностью определенных фосфолипидов в восстановлении гормональной регуляции, продемонстрированной Леви [2—4]. Мы также наблюдали специфичность в отношении фосфолипидов при восстановлении регуляторных свойств аденилатциклазы (табл. 3). Однако в отличие от данных Леви, согласно которым ФИ восстанавливает чувствительность солюбилизированной аденилатциклазы к катехоламинам, а фосфатидилсерин — к глюкагону, в наших опытах ФИ восстанавливал чувствительность аденилатциклазы к катехоламинам и к глюкагону, а фосфатидилхолин лишь увеличивал уровень базальной активности аденилатциклазы, не влияя на ее регуляторные свойства.

Удаление избытка луброла РХ на ДЭАЭ-целлюлозе либо замещение луброла РХ на холат натрия с последующим удалением холата диализом не мешало восстановлению чувствительности аденилатциклазы к катехоламинам с помощью ФИ (табл. 5, рис. 3). Характеристика процессов, происходящих при солюбилизации аденилатциклазы и при ее реконструкции на липосомах, достаточно трудна. Нет сомнений, что происходящее в процессе солюбилизации смещение оптимума рН (рис. 1) и снижение термоустойчивости фермента (рис. 2) является следствием нарушения структуры аденилатциклазного комплекса. Если в присутствии мицелл детергента аденилатциклазный комплекс сохра-

няется, то удаление детергента может приводить к распаду этого белкового комплекса на субъединицы, что будет выражаться в резком снижении активности аденилатциклазы, так как этот фермент полностью инактивировался в отсутствие ГТР-связывающего сопрягающего фактора [17]. Действительно, мы наблюдали, что при удалении детергента активность аденилатциклазы резко снижается (табл. 3, рис. 3). Добавление фосфолипидов, по-видимому, способствует самосборке белкового комплекса, о чем свидетельствует восстановление чувствительности аденилатциклазы к гормонам (табл. 5, рис. 3).

ЛИТЕРАТУРА

1. Drummond G. J., Dunham J. (1978) Arch. Biochem. and Biophys. 189, 63—75.
2. Levey G. S. (1971) J. Biol. Chem. 246, 7405—7410.
3. Levey G. S. (1973) Rec. Progr. Horm. Res. 29, 361—382.
4. Levey G. S. (1971) Biochem. and Biophys. Res. Commun. 43, 108—113.
5. Ткачук В. А., Балденков Г. Н. (1978) Биохимия 43, 1097—1110.
6. White A. A. (1974) in Methods in Enzymology (Hardman T. G., O'Malley B. W., eds), v. 38C, p. 41—46.
7. Trevelyan W. E. (1966) J. Lipid Res. 7, 445—447.
8. Rodbell M. (1975) J. Biol. Chem. 250, 5826—5834.
9. Garbers D. L., Johnson R. A. (1975) J. Biol. Chem. 250, 8449—8456.
10. Haga T., Haga K., Gilman A. G. (1977) J. Biol. Chem. 252, 5776—5782.
11. Storm D. R., Field S. O., Ryan J. (1976) J. Supramol. Struct. 4, 221—232.
12. Guillon G., Roy C., Jard S. (1978) Europ. J. Biochem. 92, 341—348.
13. Helenius A., Simons K. (1975) Biochim. et biophys. acta 415, 29—79.
14. Tanford C., Reynolds J. A. (1976) Biochim. et biophys. acta 457, 133—170.
15. Young J. L., Stansfield D. A. (1978) Biochem. J. 173, 919—924.
16. Pilaski M., Voight K. D., Walter W. (1979) Biochim. et biophys. acta 582, 380.
17. Levitzki A. (1977) Biochem and Biophys. Res. Commun. 74, 1154—1159.

Биологический факультет
Московского государственного университета
им. М. В. Ломоносова
Институт тонкой химической технологии
им. М. В. Ломоносова, Москва

Поступила в редакцию
27.III.1980

RECONSTITUTION OF SENSITIVITY OF SOLUBILIZED RABBIT HEART ADENYLATE CYCLASE TO HORMONES AND GUANYL NUCLEOTIDES

GRIGORYAN G. Yu., BALDENKOV G. N., AVDONIN P. V., PANCHENKO M. P.,
TKACHUK V. A., SHVETS V. I.

Department of Biochemistry, M. V. Lomonosov Moscow State University
Department of Chemistry and Technology of Fine Organic Substances,
M. V. Lomonosov Institute of Fine Chemical Technology, Moscow

Solubilization of adenylate cyclase by lubrol PX results in a loss of the enzyme sensitivity to hormones; however, the enzyme retains its ability to be activated by guanyl nucleotides and NaF. Lubrol WX devoids adenylate cyclase of its sensitivity to hormones and NaF. Solubilization causes a shift in the pH optimum of the enzyme towards neutral values of pH and significantly decreases the thermal stability of adenylate cyclase. The replacement of lubrol PX from the solubilized preparation by phospholipids increases the basal activity of adenylate cyclase (phosphatidyl serine) or restores its sensitivity to adrenaline and glucagon (phosphatidyl inositol). A reconstitution of the adenylate cyclase sensitivity to catecholamines by phosphatidyl inositol is also obtained after removal of the detergent excess using ion-exchange chromatography or lubrol PX replacement by cholate in the solubilized preparation. This restoration of the enzyme sensitivity to hormones is accompanied by an increase of the activating action of guanylylimidodiphosphate on the enzyme.