

Ca²⁺-АТРаза эритроцитов человека модифицируется под действием глицерола и низких температур

Н.Г. ЗЕМЛЯНСКИХ, О.А. КОФАНОВА

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Глицерол является криопротектором, широко используемым в процессе низкотемпературного хранения клеток крови. Наряду с физико-химической модификацией среды, глицерол вызывает в клетках различные биохимические изменения, среди которых изменение концентрации Ca²⁺ может играть одну из ключевых ролей в выживаемости клеток при экстремальных воздействиях.

Активирующее действие ряда органических растворителей, в том числе и глицерола, на изолированный фермент было показано в работе [1]. Однако стимулирующий эффект данных соединений во многом обусловлен особенностями модельной системы и связан с отсутствием гидрофобного микроокружения липидного бислоя.

Активирующее влияние глицерола на Ca²⁺-АТРаза было показано и при гидролизе псевдосубстрата – Р-нитрофенилфосфата [2]. Авторы установили, что в присутствии глицерола Ca²⁺ сильно стимулирует фосфотазную активность дозозависимым способом. Индуцированное глицеролом и Ca²⁺ увеличение активности коррелировало с модификацией спектрального центра внутренней флуоресценции фермента. Полагают, что синергический эффект глицерола и Ca²⁺ связан с эффектом дегидратации на субстратсвязывающий и Ca²⁺-связывающий домены данной ион-транспортной системы.

Следовательно, эффекты органических растворителей (криопротекторов) на Ca²⁺-АТРаза эритроцитов, в частности глицерола могут быть сложны и неоднозначны.

Целью данного исследования являлась оценка изменений активности Ca²⁺-АТРаза эритроцитов человека под влиянием глицерола, анализ роли кальмодулина в регуляции функций Ca²⁺-насоса в присутствии криопротектора в среде и под влиянием низких температур.

Материалы и методы

В работе использовали следующие реактивы: АТР- disodium, Tris, compound R24571 (Sigma), Hepes, EGTA (Serva), KCl, MgCl₂, CaCl₂ и другие реактивы производства Украины и России (х.ч. или о.с.ч.).

Адрес для корреспонденции: Землянских Н.Г., Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: +38 (057) 373-30-34, факс: +38 (057) 373-30-84, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

Эритроциты перед опытом осаждали путем центрифугирования при 3000 об/мин (центрифуга ОПН-3), плазму и лейкоцитарный слой удаляли. Эритроциты промывали трижды 3-4-кратными объемами среды, содержащей 150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 7,4. Последняя отмывка была выполнена с использованием среды А (135 mM KCl, 10 mM Tris, 10 mM Hepes (pH 7,4), 0,025 mM MgCl₂)

Определение активности Ca²⁺-АТРаза в эритроцитах проводили как описано в работе [3]. Аликвоты отмытых эритроцитов вносили в среду В (0,04% сапонина, 135 mM KCl, 10 mM Tris, 10 mM Hepes (pH 7,4), 0,025 mM MgCl₂, 1 mM АТР, 1 mM EGTA, 1,1 mM CaCl₂). Состав среды варьировали, вводя дополнительно разные концентрации глицерола (5-60%). Реакцию ферментативного гидролиза АТР отслеживали, инкубируя клетки при 37°C в течение 20 минут. После чего реакцию останавливали, добавляя холодный раствор ТХУ до конечной концентрации 5%. Об изменении активности Ca²⁺-АТРаза под влиянием соответствующих концентраций глицерола судили по разнице накопления фосфора неорганического Р_i в Ca²⁺-содержащей и Ca²⁺-несодержащей средах (среда В не содержала CaCl₂). После остановки реакции белок осаждали центрифугированием при 1000 об/мин.

Выделение мембран эритроцитов (белые тени). Эритроциты лизировали 30-ю объемами гипотонической среды (5 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, pH 7,6) и выдерживали в течение 10 минут на ледяной бане. После чего тени осаждали центрифугированием при 20000 g на рефрижераторной центрифуге (К-24, Германия) с последующим удалением надосадка. Процедуру отмывки мембран от внутриклеточных компонентов повторяли 3-4 раза в аналогичном режиме.

При оценке активности Ca²⁺-АТРаза в белых тенях аликвоты полученных изолированных мембранных фракций добавляли в среду В и отслеживали ферментативную реакцию аналогично условиям, описанным для сапонин-перфорированных эритроцитов.

При оценке роли кальмодулина в активации Ca²⁺-АТРаза эритроцитов в присутствии 10%-го глицерола в среде исходили из двух позиций. Во-первых, устранение кальмодулина путем ингибирования кальмодулин-зависимых реакций кальми-

дозолиумом R24571 на начальном этапе (до введения глицерола и субстратов ферментативной реакции) позволяет оценить возможность "структурной" модификации каталитической активности Ca^{2+} -насоса. Во-вторых, добавление ингибитора R24571 в среду, после того как сапонин-перфорированные клетки уже находились в контакте с глицеролом, дает возможность оценить роль кальмодулина в активации фермента в присутствии 10%-го глицерола. В соответствии с экспериментальными задачами анализ модификации Ca^{2+} -АТФазы кальмодулином в присутствии криопротектора проводили согласно определенной схеме. В результате, к моменту начала ферментативной реакции все компоненты среды соответствуют условиям, описанным ранее для определения Ca^{2+} -АТФазной активности в сапонин-перфорированных эритроцитах. Изменение активности Ca^{2+} -АТФазы оценивали как описано выше.

Определение P_i (фосфора неорганического) проводили по методу [4]. Концентрацию белка определяли по методу Бредфорд [5].

Результаты и обсуждение

В процессе инкубации эритроцитов с глицеролом происходит насыщение клеток криопротектором, и его концентрация в цитоплазме постепенно нарастает вплоть до достижения равновесного состояния. И хотя глицерол легко проникает через плазматическую мембрану эритроцитов человека, до наступления момента сбалансированности вне- и внутриклеточной концентрации требуется несколько минут. Это значительный диапазон времени по сравнению со скоростью оборота фермента в каталитическом цикле, который реализуется в интервале микро-/миллисекунд. Поэтому транспортные системы плазматической мембраны в начальный период и после достижения равновесного состояния могут по-разному реагировать на происходящие изменения параметров среды. Изменение активности Ca^{2+} -АТФазы в сапонин-перфорированных эритроцитах при увеличении уровня глицерола в среде носит бифазный характер. Ca^{2+} -АТФазная активность возрастает в присутствии небольших концентраций глицерола, достигая максимального значения при 10% содержании криопротектора в среде. После этого активирующие влияния глицерола на работу Ca^{2+} -АТФазы эритроцитов начинает снижаться. Но только в условиях, когда его уровень достигает 20%-й концентрации, отмечается достоверное снижение каталитической активности ниже контрольных значений. Дальнейшее повышение концентрации криопротектора сопровождается медленным снижением активности Ca^{2+} -АТФазы.

В структурном отношении Ca^{2+} -АТФазы плазматической мембраны эритроцитов представлена двумя изоформами - РМСА1b и РМСА4b. Обе изоформы Ca^{2+} -АТФазы эритроцитов обладают двумя аутоингибиторными доменами, которые позволяют осуществлять тонкую регуляцию АТФазной и Ca^{2+} -транслоцирующей активности фермента [6]. Можно предположить, что различные стимулы физико-химического характера могут активировать или ингибировать Ca^{2+} -АТФазу посредством нейтрализации или стабилизации этих аутоингибиторных доменов при изменении параметров среды.

Чтобы оценить роль эндогенных регуляторов Ca^{2+} -АТФазной активности в изменении скорости ферментативной реакции при введении в среду глицерола, мы провели серию экспериментов на белых телях. Данная модельная система предполагает удаление всех внутриклеточных компонентов, что дает возможность изучить влияние глицерола на активность Ca^{2+} -АТФазы в ее естественном липидном окружении. Полученные результаты свидетельствуют, что Ca^{2+} -АТФазная активность в препаратах белых телях монотонно убывает с увеличением концентрации глицерола в среде. Достоверное снижение показателей по сравнению с контрольными значениями отмечается при достижении 15%-й концентрации глицерола.

Таким образом, характер изменений Ca^{2+} -АТФазной активности эритроцитов в мембранных препаратах в присутствии эндогенных регуляторов и после их удаления свидетельствуют о сложном механизме действия данного криопротектора на Ca^{2+} -контролирующие системы в клетке.

Учитывая значимость СаМ для регуляции Ca^{2+} -АТФазной активности в эритроцитах человека в условиях изменения физико-химических параметров среды (гипотермия) и патологических изменениях метаболизма в клетках, вызванных рядом хронических заболеваний, а также его неоднозначный эффект на ферментативную активность в различных условиях [7], мы провели исследования, выявляющие роль СаМ в изменении скорости Ca^{2+} -зависимой АТФазной реакции в присутствии 10%-го глицерола в среде. С этой целью был использован кальмодозолиум (compounds R24571)-ингибитор СаМ-зависимых реакций. При анализе данного вопроса использовали два способа добавления R24571: в часть проб ингибитор добавляли после гемолиза клеток сапонином в присутствии 10%-го глицерола вместе с компонентами реакционной среды (Ca^{2+} и АТФ); к другой части проб ингибитор вводили в среду вместе с сапонином перед добавлением глицерола и компонентов среды, инициирующих

ферментативный гидролиз АТР Ca^{2+} -зависимой АТРазой.

Установили, что добавление ингибитора СаМ-зависимых реакций к клеткам, которые в течение 2-3 суток пребывали в условиях гипотермии ведет к стимуляции Ca^{2+} -АТРазной активности. Аналогичные результаты были продемонстрированы в работе [7] при оценке роли СаМ в изменении активности Ca^{2+} -АТРазы в условиях гипотермического хранения крови с использованием ингибитора W7. Наиболее очевидным предположением в отношении этих изменений может быть окислительная модификация СаМ. Окисление метиониновых остатков в С-доменах СаМ (одна из форм посттрансляционной модификации белка) ведет к изменению функциональных свойств данного белка [8]. Было отмечено, что окисленный СаМ [9] обнаруживает 30-кратное снижение сродства к Ca^{2+} , но при этом лишь незначительно изменяются константы связывания его карбоксил-терминального домена в Ca^{2+} -насыщенном состоянии с пептидом, соответствующим аутоингибиторному домену РМСА. Установлено, что в этих условиях происходит и 9-кратное падение сродства аминокислотного терминального домена СаМ при связывании с белками-мишенями. В этих условиях нативный СаМ не способен вытеснить окисленные молекулы белка из аутоингибиторного домена Ca^{2+} -АТРазы и активировать ее, что свидетельствует о непродуктивном связывании окислительно-модифицированного СаМ с ферментом, создавая видимость его запаривания в неактивном состоянии.

В этом аспекте интересно рассмотреть и эффекты глицерола. Было выявлено, что если блокировать СаМ введением ингибитора R24571 перед добавлением в среду 10%-го глицерола, то Ca^{2+} -АТРазная активность несколько увеличивается ($P < 0,05$) по сравнению с контролем, но оказывается значительно ниже по сравнению с активацией ферментативной реакции в присутствии криопротектора без использования ингибитора. Если же ингибитор R24571 добавляется уже после активации Ca^{2+} -АТРазы 10% глицеролом, то стимуляция активности фермента достигает такого же уровня, как и без ингибитора. Следовательно, активация ферментативной реакции 10%-м глицеролом, по-видимому, отражает аддитивный механизм действия криопротектора на Ca^{2+} -АТРазу, суммируя стимулы, источником которых является непосредственная структурная модификация молекулы Ca^{2+} -АТРазы в мембране глицеролом (поскольку устранение СаМ все же связано с небольшим, но достоверно значимым увеличением скорости) и активирующее воздействие 10% глицерола, реализуемое при участии СаМ

(поскольку только в условиях реального участия СаМ в изменении активности РМСА, вызванного глицеролом, скорость реакции достигает значений, которые соответствуют ее уровню без применения ингибитора).

Активация каталитической активности Ca^{2+} -насоса эритроцитов под влиянием глицерола при концентрациях, соответствующих начальному этапу насыщения криопротектором, может играть важную роль в стабилизации клеток. В этих условиях потенциально может увеличиваться скорость входа Ca^{2+} в клетку вследствие пертурбационных изменений в структуре плазматической мембраны, вызванных осмотическим давлением из-за присутствия во внешней среде глицерола. Если допустить, что в это же время отмечается активация Ca^{2+} -АТРазы, то увеличение скорости входа Ca^{2+} в клетку может быть скомпенсировано ростом Ca^{2+} -АТРазной активности, направленной на восстановление определенного баланса между этими встречными потоками катиона через мембрану. Дальнейшее торможение скорости работы Ca^{2+} -АТРазы примерно на 20-25% при увеличении концентрации глицерола в среде до 30-40% (концентрации, используемые при низкотемпературном хранении крови), очевидно, не может значительно повлиять на рост внутриклеточной концентрации Ca^{2+} на фоне предшествующих изменений. Таким образом, следует ожидать, что перед криоконсервированием уровень цитозольного кальция, если и повышается, то все же не выходит резко за рамки физиологических диапазонов. Умеренное увеличение внутриклеточной концентрации Ca^{2+} способствует повышению механической прочности эритроцитов [10]. Можно предположить, что биохимическая модификация метаболизма, наряду с изменениями физико-химических параметров среды под влиянием глицерола, способствует стабилизации эритроцитов в процессе замораживания-отогрева.

После замораживания-отогрева эритроцитов под защитой 30% глицерола активность Ca^{2+} -АТРазы в сапонин-перфорированных клетках незначительно, но достоверно снижается в сравнении с контрольными значениями. Отмывка эритроцитов от глицерола сопровождается повышением фосфатазной активности Ca^{2+} -насоса. С одной стороны, это может отражать компенсаторный эффект, направленный на восстановление низкого уровня Ca^{2+} в цитозоле, вероятность повышения которого достаточно велика после этапа замораживания-отогрева, когда активность Ca^{2+} -АТРазы подавляется. С другой стороны, гибель части клеток в эритроцитарной суспензии может быть связана с потерей субпопуляции старых клеток, которые имеют повышенную

хрупкость и первыми погибают при стрессовых воздействиях. В таких клетках уровень внутриклеточного Ca^{2+} выше по сравнению со средним показателем всех субпопуляций эритроцитов крови, а активность Ca^{2+} -АТФазы ниже [11]. Элиминация старых эритроцитов после замораживания и деглицеринизации клеток может быть причиной повышения активности Ca^{2+} -АТФазы после отмывки криоконсервированных клеток от глицерола.

Таким образом, криоконсервирование эритроцитов под защитой глицерола, начиная с этапа добавления криопротектора и заканчивая их деглицеринизацией, сопровождается изменениями активности Ca^{2+} -АТФазы, а следовательно, и уровень Ca^{2+} ионов в цитозоле будет колебаться. Эти изменения могут существенным образом повлиять на стабильность клеток в стрессовых условиях.

Выводы

1. Изменение активности Ca^{2+} -АТФазы эритроцитов под влиянием глицерола, исследованное на модели сапонин-перфорированных клеток и белых теней, свидетельствует, что этот процесс связан как со “структурной” модификацией, так и с участием эндогенных модуляторов в его регуляции при этих условиях.

2. Применение ингибитора кальмодулин-зависимых реакций R24571 позволило установить роль данного белка в изменении активности Ca^{2+} -АТФазы эритроцитов в присутствии 10% глицерола в среде на модели сапонин-перфорированных клеток.

3. Криоконсервирование эритроцитов под защитой глицерола и их деглицеринизация сопровождаются изменениями активности Ca^{2+} -АТФазы.

Литература

1. Benaim G., de Meis L. Activation of the purified erythrocyte plasma membrane Ca^{2+} -ATPase by organic solvents // FEBS Lett.– 1989.– Vol. 244.– P. 484-486.
2. Alves G.G, Lima L.M., Favero-Retto M.P. et al. p-Nitrophenylphosphatase activity catalyzed by plasma membrane Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase: correlation with structural changes modulated by glycerol and Ca^{2+} // Biosci. Rep.– 2001.– Vol. 21, N1.– P. 25-32.
3. Покудин Н.И., Петруняк В.В., Орлов С.Н. Участвует ли кальмодулин в регуляции активности Са-насоса в эритроцитах in vivo? // Биохимия.– 1988.– Vol. 53, N5.– С. 753-758.
4. Rathbun W., Betlark V. Estimation of enzymically produced orthophosphate in the presence of cysteine and adenosine triphosphate // Anal. Biochem.– 1969.– Vol. 28, N1-3.– P. 436-445.

5. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Anal. Biochem.– 1976.– Vol. 72, № 7.– P. 248-254.
6. Strehler E.E., Zacharias D.A. Role of alternative splicing in generating isoform diversity among plasma membrane calcium pump // Physiol. Rev.– 2001.– Vol. 81, N1.– P. 21-50.
7. Рыбина В.В., Еленская И.А., Каймачников Н.П. Регуляция активности Ca^{2+} -АТФазы ионами Ca^{2+} и кальмодулином в эритроцитах человека при различном времени хранения // Биол. мембраны.– 2001.– Vol. 18, N4.– С. 287-293.
8. Bigelow D.J., Squier T.C. Redox modulation of cellular signaling and metabolism through reversible oxidation of methionine sensors in calcium regulatory proteins // Biochem. Biophys. Acta.– 2005.– Vol. 1703.– P. 121-134.
9. Yao Y., Yin D., Jas G.S. et al. Oxidative modification of a carboxyl-terminal vicinal methionine in calmodulin by hydrogen peroxide inhibits calmodulin-dependent activation of the plasma membrane Ca-ATPase // Biochemistry.– 1996.– Vol. 35.– P. 2767-2787.
10. Liu F., Mizukami H., Sarnaik S. et al. Calcium-dependent human erythrocyte cytoskeleton stability analysis through atomic force microscopy // J. Struct. Biol.– 2005.– Vol. 150, N2.– P. 200-210.
11. Romero P.J., Romero E.A. The role of calcium metabolism in human red blood cell ageing: a proposal // Blood Cell Mol. Phys.– 1999.– Vol. 25, N1.– P. 9-19.