

УДК 577.3:576.31

БИОХИМИЯ

М. Г. ГОЛЬДФЕЛЬД, Д. Н. ОСТРОВСКИЙ, Э. Г. РОЗАНЦЕВ
О СТРУКТУРНЫХ ПЕРЕХОДАХ В МЕМБРАНАХ
MICROCOCCLUS LYSODEIKTICUS

(Представлено академиком А. И. Опариным 16 VII 1969)

Широко распространена точка зрения, связывающая функциональные изменения биологических мембран с изменениями состояния мембранных липидов. Полагают, что подобные изменения происходят при структурных переходах, которые наблюдаются в опытах на моделях мембран, построенных из различных гетерополярных соединений (1-3).

Электронная микроскопия позволяет выявить на клеточных мембранах животных по крайней мере два состояния, одно из которых характеризуется наличием гексагональной структуры, другое — наличием неупорядоченных гранул (4). По данным Муррея, гексагональная структура наблюдается иногда и на бактериальных мембранах (*Micrococcus* sp.) (5), однако этот метод включает довольно жесткие процедуры, могущие быть источником артефактов (2).

Представляет большой интерес исследование структуры биологических мембран в условиях, более близких к условиям нормального функционирования. Такую возможность дает предложенный недавно метод парамагнитного зонда (6, 7), позволяющий оценить в относительных единицах микровязкость отдельных малых областей мембран, в которых локализованы молекулы иминоксильных радикалов (парамагнитный зонд).

В работе использованы мембраны бактерий *Micrococcus lysodeikticus*, выращенных в жидкой среде при температуре 20 или 37°. Условия роста бактерий и методика получения мембран описаны ранее (8), с той лишь разницей, что лизис клеток лизоцимом проводили минуя стадию протопластов. Препарат мембран содержал 20—40 мг белка в 1 мл.

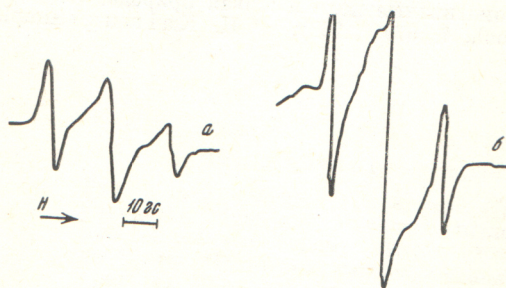


Рис. 1. Спектры э.п.р. иминоксильного радикал-зонда в мембранах *M. lysodeikticus* и в суспензии мембранных липидов (а) и в суспензии мембранных белков (б) при температуре 30°

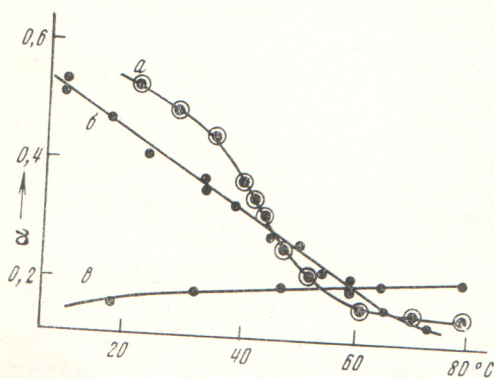


Рис. 2. Изменение величины α с температурой для целых мембран *M. lysodeikticus* (а), мембранных липидов (б) и мембранных белков (в). Концентрации веществ см. в тексте

В качестве парамагнитного зонда использовали жидкий радикал 2,2,6,6-тетраметил-4-каприлокси-пипердин-1-оксил, синтезированный по реакции без затрагивания свободной валентности (9). Этот гидрофобный радикал солибилизируется в суспензии мембран (приблизительно 10^{14} спинов в образце объемом $\sim 0,01$ мл). Активность малатдегидрогеназы не менялась при введении зонда. Спектры э.п.р. регистрировали на радиоспектрометре ЭПР-2-ИХФ с термостатирующей приставкой. Мерой микровязкости служила величина $\alpha = \sqrt{I_{+1}/I_{-1}} - 1$, пропорциональная среднему времени поворота молекулы радикала на угол $\pi/2$. Здесь $I_{\pm 1}$ — амплитуда первой и третьей компонент спектра э.п.р. (рис. 1).

Опыты проводили как с целыми мембранами, так с мембранными липидами и белками порознь. Липиды и обезжиренные мембраны получали путем трехкратной экстракции влажного или сухого осадка мембран при комнатной температуре смесью хлороформа и метанола (2:1 по объему). Экстракт упаривали на водяной бане до небольшого объема, высушивали досуха в эксикаторе под вакуумом, и липиды суспендировали в фосфатном буфере (рН 7,4; 0,01 M) с $MgSO_4$ (0,001 M) при легком озвучивании. В 1 мл суспензии находилось приблизительно 27 мг липидов, озвучивали 4 раза по 30 сек. при комнатной температуре в дезинтеграторе MSE-20 кс.

Осадок белка промывали последовательно метанолом и буфером или высушивали под вакуумом и затем суспендировали в том же фосфатном буфере с $MgSO_4$ (43 мг белка на 1 мл).

Активность дегидрогеназы яблочной кислоты измеряли по восстановлению красителя 2,6-дихлорфенолиндофенола (10), белок — по методу Лоури и др. (11).

На рис. 1 в качестве иллюстрации приведены спектры э.п.р. иминоксильного радикала-зонда в нативных мембранах, суспензии липидов и суспензии белка при температуре 30°. Результаты измерения величины α при различных температурах даны на рис. 2. Обращает на себя внимание наличие перегиба на кривой $\alpha - t$ для целых мембран и отсутствие такового для суспензии липидов. Форма спектра э.п.р. суспензии белка и ее изменение с температурой таковы, что оценка микровязкости представляется затруднительной. Наблюдаемые искажения спектра связаны, по-видимому, с изменением соотношения между солибилизированной и несолибилизированной формой радикала. Однако несомненно, что в суспензии белка перегиб на кривой $\alpha - t$ отсутствует. Таким образом, простое сложение температурных кривых для липида и белка не может дать зависимость α от t , получаемой на целой липопротеидной мембране, и, следовательно, ни один из компонентов порознь не воспроизводит свойств исходной мембраны.

Спектр э.п.р. молекулы зонда отражает степень заторможенности вращательного движения радикала. Величина α характеризует состояние очень малого молекулярного комплекса, включающего липиды, в котором локализован зонд-радикал. Изменения состояния этих структурных ком-

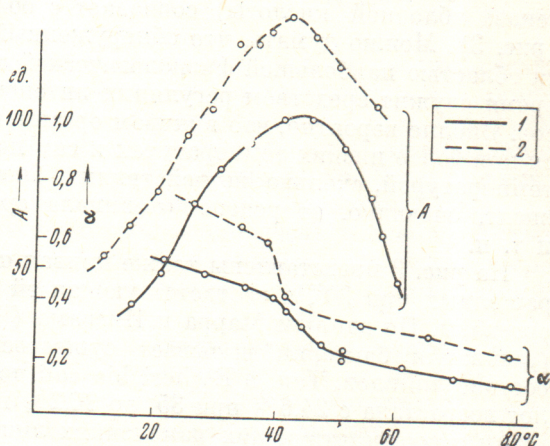


Рис. 3. Зависимость активности малатдегидрогеназы (A) и величины α для иминоксильного радикала-зонда от температуры в мембранах *M. lysodeikticus*, 1 — бактерии выращивались 37° (для определения A брали 50 μ г белка); 2 — бактерии выращивались 20° (для определения A брали 63 μ г белка)

понент биомембраны не обязательно соответствуют какому-нибудь собственному фазовому превращению, в котором происходит перестройка упаковки сравнительно крупных агрегатов (мицелл, липопротеиновых глобул и т. п.), и поэтому не всегда могут быть зафиксированы другими структурными методами.

Близость абсолютных величин α для суспензии липидов и мембран указывает на то, что радикал-зонд, видимо, находится в окружении липидов, но различия в характере кривых $\alpha - t$ целых мембран и липидной суспензии указывают на фундаментальную роль белка в поддержании внутренней структуры мембранных субъединиц. Можно предположить, что при температуре, соответствующей перегибу, имеют место конформационные изменения молекул белка, индуцирующие структурный переход в липопротеидных комплексах.

Интересно, что максимум активности мембранного фермента (дегидрогеназа яблочной кислоты) совпадает с областью перегиба кривой $\alpha - t$ (рис. 3). Можно думать, что обнаруженный структурный переход является областью наибольшей физиологической активности мембраны и в то же время служит средством регуляции интенсивности биохимических процессов. Вполне вероятно, что в живом организме область перехода наблюдается при более низких температурах и сам переход индуцируется не столько температурой, сколько воздействиями биохимических медиаторов, и зависит, очевидно, от редокс-потенциала среды, ионной силы цитоплазмы и т. п.

На рис. 3 представлены также кривая $\alpha - t$ для мембран бактерий, выращенных при 20° , и соответствующая ей кривая активности малатдегидрогеназы. По данным Марра и Инграма (¹²), понижение температуры выращивания бактерий вызывает существенные изменения в химическом составе липидов. Так, в *Escherichia coli* доля ненасыщенных жирных кислот возрастала с 24,6% при 35° до 34,2% при 20° . Мы не располагаем данными о соответствующих изменениях липидного состава *M. lysodeikticus*, но можно думать, что такие изменения происходят и направлены на поддержание мембраны в прежнем структурном и функциональном состоянии. В пользу этого предположения свидетельствует близость максимумов активности мембранных дегидрогеназ и областей температурного перехода для 20- и 37-градусной культуры.

Авторы выражают благодарность Н. С. Гельман, В. К. Кольтоверу и А. Цапину за постоянный интерес и помощь в работе.

Институт химической физики
Академии наук СССР

Институт биохимии им. А. Н. Баха
Академии наук СССР
Москва

Поступило
4 VII 1969

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ D. Chapman, Ann. N. Y. Acad. Sci., **137**, 747 (1966). ² V. Luzzati, The Interpretation of Ultrastructure, N. Y.,—London, 1962, p. 366. ³ W. Stoeckenius, p. 349. ⁴ E. Benedetti, P. Emmelot, J. Cell Biol., **26**, 299 (1965). ⁵ E. Kellenberger, A. Ryter, Modern Developments in Electron Microscopy, N. Y.,—London, 1964, p. 373. ⁶ W. Hubbell, H. MacConnell, Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., **61**, 12 (1968). ⁷ Л. Я. Гендель, М. Г. Гольдфильд и др., Биофизика, **13**, 1114 (1968). ⁸ Д. Н. Островский, Н. С. Гельман, Биохимия, **30**, 772 (1965). ⁹ Э. Г. Розанцев, Изв. АН СССР, сер. хим., **1964**, 2187 и 2248. ¹⁰ А. И. Опарин, Н. С. Гельман и др., Биохимия, **23**, 909 (1958). ¹¹ O. Lowry, N. Rosebrough et al., J. Biol. Chem., **193**, 265 (1953). ¹² A. Marr, J. Ingraham, J. Bacteriol., **84**, 1260 (1962).