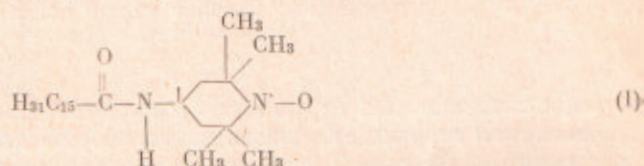


Б. АННАЕВ, В. К. КОЛЬТОВЕР, Л. М. РАЙХМАН, В. И. СУСКИНА

ИССЛЕДОВАНИЕ КОНФОРМАЦИОННЫХ ПЕРЕХОДОВ В МЕМБРАНАХ ЭНДОПЛАЗМАТИЧЕСКОГО РЕТИКУЛУМА МЕТОДОМ ПАРАМАГНИТНОГО ЗОНДА

(Представлено академиком Г. М. Франком 21 V 1970)

В изучении структуры биологических мембран, структурных переходов в мембранах и связанных с этими переходами изменений их биохимических функций полезную информацию дает метод парамагнитного зонда (спиновой метки) (1, 2). Настоящая работа посвящена исследованию мембран эндоплазматического ретикулума (микросом) при помощи стабильного радикала (I), синтезированного по методу (3). Этот радикал нерастворим в воде, но солибилизируется суспензией микросом



Микросомы выделяли из печени крысы по методу (4). К 1 мл суспензии микросом, содержащей 30—40 мг белка, добавляли 0,01 мл спиртового раствора радикала, так чтобы конечная концентрация его в суспензии составляла 10^{-4} М. Спектры э.п.р. снимали на радиоспектрометре ЭПР-2. Температуру образцов поддерживали с точностью $\pm 0,5^\circ$. Спектры э.п.р. анализировали как в работе (5), вычисляя время вращательной диффузии радикала τ , которое в данном случае является эффективным параметром, характеризующим как свободный объем, так и анизотропию сверхтонкого взаимодействия (ст. в.) и g -фактора, зависящие от характера сольватации.

Из сравнения спектров *a* и *b* на рис. 1 следует, что состояние микросомальной цепи переноса электрона (ц.п.э.) определяет способность мембран эндоплазматического ретикулума солибализировать радикал, причем восстановленные микросомы солибилизируют радикал хуже, чем окисленные (на рис. 1б заметно уширена центральная компонента триплетта вследствие наложения синглета от плохо солибализированного радикала). Окисление восстановленных микросом, например, феррицианидом калия улучшает солибализацию радикала (рис. 1в).

Эти результаты указывают на изменение конформации мембран эндоплазматического ретикулума при изменении степени окисленности ц.п.э. Подобный эффект был ранее обнаружен нами на мембранах митохондрий (6). Конформационный переход, сопровождающий восстановление, может привести непосредственно как к уменьшению эффективного свободного объема («сжатию» зонда в мембране), так и к изменению распределения зонда между областями с различным характером сольватации радикала, что через анизотропию с.т.в. и g -фактора сказывается на форме спектра и, следовательно, величине τ .

В наших опытах определяется перестройка липидной части мембраны, с которой непосредственно связывается зонд. Следовательно, восстановление ц.п.э. сопровождается конформационными перестройками мембран, которые «запускаются» ферментами — переносчиками электронов.

В подобных кооперативных системах следует ожидать температурных структурных изменений. Действительно, с увеличением температуры τ уменьшается не по экспоненте, как это имеет место в случае слабокооперативных систем ⁽⁵⁾, но с аномалиями в определенных, достаточно узких температурных интервалах (около 20 и около 40°, рис. 2). Это свидетельствует о структурных переходах в мембране кооперативного характера,

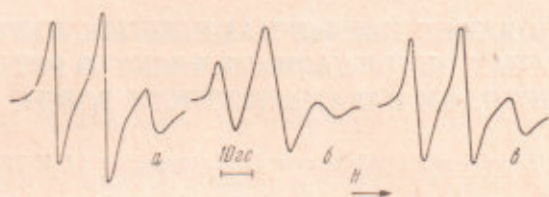


Рис. 1. Спектры э.п.р. радикала (I) в микросомах печени крысы: *a* — микросомы окисляли 20 мин. кислородом воздуха, затем инкубировали 5 мин. с радикалом при комнатной температуре; *b* — радикал добавлен к предварительно восстановленным НАДФ-Н (20 мМ) микросомам. 5 мин. инкубации с радикалом; *c* — предварительно восстановленные спин-меченые микросомы окислены феррицианидом калия (20 мМ). Спектры сняты при 25°

в результате которых изменяется сольubilизация радикала в мембране, эффективная энергия активации вращательной диффузии радикала и соответственно τ . На рис. 2 изображена также зависимость скорости реакции гидроксилирования 1-С¹⁴-октадекана микросомами от температуры. Обращает на себя внимание тот факт, что именно в области 20 и 40°, т. е. в областях структурных переходов, фиксируемых методом спинового зонда, резко изменяется ход температурной зависимости ферментативной активности микросом. Ниже 20° энергия активации реакции гидроксилирования равна 17 ккал/моль, тогда как выше этой области она составляет 10 ккал/моль. После 40° начинается резкое уменьшение активности микросом вследствие тепловой инактивации.

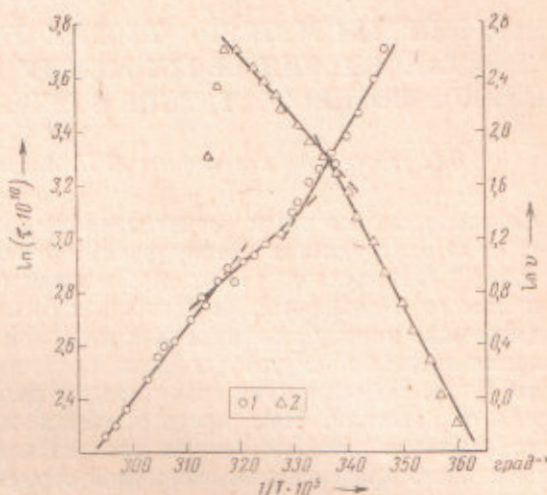
В мембранах микросом, которые перед инкубацией с радикалом были инактивированы 8-минутным прогреванием при 65°, аномалии зависимости τ зонда от температуры в значительной степени сглажены.

В соответствии с работой ⁽⁷⁾ мы представляем мембрану состоящей из липопротеиновых субъединиц — протомеров. Конформация протомера зависит от его ассоциации с эффектором (субстратом) и от взаимодействия с ближайшими соседями по ансамблю, и, наоборот, взаимодействие протомеров с эффектором и друг с другом зависит от их конформации. Наши данные говорят о том, что олигомерная модель мембраны пригодна в принципе и для описания электронпереносящих мембран, причем в данном случае, очевидно, имеются протомеры как минимум двух сортов: НАДФ-Н-цитохром Р-450-редуктаза и цитохром Р-450. Как следует из наших экспериментов, конформации протомеров в окисленном и восстановленном состояниях различны, и соответственно различна их способность сольubilизировать радикал. Структурные переходы в области 25 и 40° обусловлены изменением как конформации протомеров, так и взаимодействия между ними.

При помощи предположения о взаимодействии электронпереносящих ферментативных комплексов — протомеров можно объяснить также ряд данных других авторов. Так, кривые зависимости восстановления и окисления цитохромов и флавопротеидов от концентрации НАД-Н и феррицианида в препаратах НАД-Н-цитохром С-редуктазы имеют S-образную форму ⁽⁸⁾, т. е. типично кооперативный характер, как и следует из теории ⁽⁷⁾

применительно к электронпереносящим мембранам. В ряде работ (например ^(9, 10)), авторы которых изучали биохимию ингибирования антимицином А ц.п.э. в митохондриальных и некоторых других препаратах, приводятся кривые зависимости степени ингибирования от концентрации ингибитора, которые также имеют S-образную форму. Между тем, в работе ⁽¹¹⁾ показано, что антимицин А, ингибирующий митохондриальную ц.п.э.

Рис. 2. Зависимость анизотропии спектров э.п.р. зонда 1 в микросомах (1) и гидроксимирующей активности микросом (2) от температуры (t сек.). Скорость окисления 1- C^{14} -октадекана (в ммк М/мл на 1 мг белка в 1 мин.) определена как в ⁽⁴⁾ в инкубационной среде следующего состава: белок микросом 1 мг/мл, НАДФ-Н 3 мМ, Трис-НСI-буфер (рН 7,5) 50 мМ, KCl 50 мМ, $MgCl_2$ 5 мМ, 1- C^{14} -октадекан 1 мМ. Кривые обработаны методом наименьших квадратов; дисперсия средних значений экспериментальных точек не более 3–5% для t и 5–10% для v



по комплексу III, реагирует с изолированными препаратами комплекса III в отношении 1:1, и соответственно зависимость степени ингибирования изолированного комплекса III от концентрации ингибитора не отличается от обычной лэнгмюровской изотермы. Следовательно, отклонение формы этой зависимости от лэнгмюровской ^(9, 10) объясняется не непосредственным взаимодействием между молекулами ингибитора, а взаимодействием между электронпереносящими комплексами — протомерами. В данном случае взаимодействие осуществляется на уровне цитохромов. Аналогично, взаимодействием электронпереносящих комплексов — протомеров мы можем объяснить результаты действия и некоторых других ингибиторов ⁽¹⁰⁾.

Таким образом, есть достаточно данных о том, что электронпереносящие мембраны различных клеточных оргanelл суть кооперативные системы. Целью наших дальнейших исследований является количественное изучение этих систем, в частности временных характеристик конформационных переходов в связи с проблемами фотосинтеза, биоэнергетики и регуляции биохимических процессов.

Институт зоологии
Академии наук ТуркмССР
Ашхабад

Поступило
16 IV 1970

Институт химической физики
Академии наук СССР
Москва

Поступило
16 IV 1970

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ T. J. Stone, T. Buckman et al., Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 54, 1010 (1965).
- ² В. К. Кольтовер, Ю. А. Кутлахмедов, Б. И. Сухоруков, ДАН, 181, № 3, 730 (1968).
- ³ Э. Г. Розанцев, Изв. АН СССР, сер. хим., № 12, 2187 (1964).
- ⁴ B. Cholson, B. Baptist, M. Coon, Biochemistry, 2, 1155 (1963).
- ⁵ A. S. Waggoner, O. H. Griffith, C. R. Christensen, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 57, 1198 (1967).
- ⁶ V. K. Koltover, M. G. Goldfield et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 32, 421 (1968).
- ⁷ J. P. Changeux, J. Thiery et al., Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 57, 335 (1967).
- ⁸ R. Estabrook, J. Biol. Chem., 227, 1093 (1957).
- ⁹ B. Chance, Nature, 169, 215 (1952).
- ¹⁰ W. W. Parson, Biochim. et biophys. acta, 131, 154 (1967).
- ¹¹ J. S. Rieske, W. S. Zaugg, Biochem. Biophys. Res. Commun., 8, 421 (1962).