

А. Г. АТАНАСОВ, Ю. П. КОЗЛОВ, М. ПОРТИЛЬЯ

**КОНФОРМАЦИЯ БЕЛКА И ЛИПИД-БЕЛКОВОЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ
В МИТОХОНДРИЯХ И МЕМБРАНАХ ЭНДОПЛАЗМАТИЧЕСКОГО
РЕТИКУЛУМА ПЕЧЕНИ КРЫСЫ В НОРМЕ И ПОСЛЕ
ИНДУЦИРОВАНИЯ ГЕПАТОМЫ ЗАЙДЕЛА**

(Представлено академиком А. Н. Белозерским 4 I 1971)

Функционирование митохондрий и клеточных мембран как центров биологического контроля существенно зависит от конформации белка и взаимодействия белкового и липидного компонента этих клеточных органелл. И хотя имеющаяся непосредственная информация по этому вопросу незначительна, предполагается, что дальнейшее исследование общих принципов построения белкового компонента (¹, ²) и его конформационных состояний (³⁻⁵) позволят раскрыть природу липид-белкового взаимодействия.

В настоящей работе представлены результаты по изучению структуры белка и липид-белкового взаимодействия в митохондриях и мембранах эндоплазматического ретикулума методами дисперсии оптического вращения и инфракрасной спектроскопии и сделана попытка объяснить наблюдаемые при индуцировании гепатомы Зайделя функциональные изменения с точки зрения нарушения взаимодействия между основными структурными компонентами этих клеточных органелл и деструкции белка. Митохондрии выделяли по методу Шнейдера (⁶). Мембраны эндоплазматического ретикулума получали центрифугированием материала в градиенте плотности сахарозы (2,0М : 1,5М : 0,25М) в 0,01М трис-НСl-буфере (рН 7,4) при 210 000g в течение 180 мин. Перед дальнейшим исследованием препараты дважды отмывались от сахарозы. Все операции проводились на холоду. Белок определяли по Лоури (⁷).

Для инфракрасной спектроскопии препараты предварительно высушивались, разделялись на две группы, образцы одной из которых обрабатывали по Фолчу (⁸), для удаления фосфолипидов, и суспендировали в нуйоле. Спектры получали на инфракрасном спектрометре UR-20 фирмы Цейсс. Спектры дисперсии оптического вращения снимали на спектрополяриметре ORD/UV-5 фирмы Джаско в интервале 200—270μ. Все измерения проводили в кювете длиной 0,1 дм в растворе 0,1М трис-НСl-буфере (рН 7,4). Перевиваемая опухоль, гепатома Зайделя, вызывала гибель экспериментальных животных на V сутки. О функциональном состоянии митохондрий судили по данным полярографии. Исследование интактных митохондрий на дыхательный контроль показало, что они отвечают на добавление АДФ стимуляцией дыхания. Для митохондрий из клеток печени со злокачественным ростом такой стимуляции на добавление АДФ не отмечалось.

Для изучения конформации белка в структуре митохондрий и мембран эндоплазматического ретикулума применялся метод дисперсии оптического вращения. Применение этого метода в случае пептидных хромофоров является особенно ценным для объяснения конформации белка и полипептидов, поскольку оптическая активность пептидных переходов не является простым суммирующим вкладом одиночных пептидных связей, но существенно зависит от вторичной и, возможно, третичной и четвертичной структур полипептидной цепочки. Результаты, полученные для исследуемых клеточных органелл в норме и при развитии злокачественной опухоли, приведены в табл. 1.

Таблица 1

Параметры дисперсии оптического вращения мембран эндоплазматического ретикулума и митохондрий из нормальной печени и после индуцирования гепатомы Зайдела

Объект	$\lambda_{\min}$, м μ	$\lambda_{\max}$, м μ	$\lambda_{\text{перехода}}$	$[M']_{\min}$	$[M']_{\max}$	% спира- лизации
Нативные митохондрии	236—236,5	208—209	222—223	$-6,35 \pm 0,15$	$+12,7 \pm 1,2$	$35,27 \pm 0,76$
Гепатомные митохондрии	238	195—196	227	$-5,29 \pm 0,05$	$+20,81 \pm 0,6$	$21,85 \pm 1,6$
Нативные мембраны э.р.	236—236,5	209—210	219—220	$-6,90 \pm 0,18$	$+7,12 \pm 0,28$	$39,76 \pm 1,02$
Гепатомные мембраны э.р.	238	196—197	223—224	$-5,89 \pm 0,08$	$+12,64 \pm 1,21$	$27,31 \pm 0,85$

Примечание. э. р.—эндоплазматический ретикулум.

Полученные данные позволяют сделать следующие выводы: во-первых, при развитии опухоли резко снижается процент α -спирализации белка, и, так как при этом не наблюдается заметного его перехода в β -конформацию, то, по-видимому, можно говорить о дезорганизации структуры белкового компонента и его переходе в неупорядоченную форму; во-вторых, наблюдается сдвиг $\lambda_{\min}$ с 236 до 238 м μ . Этот процесс сопровождается также сдвигом $\lambda_{\max}$ и $\lambda_{\text{перехода}}$ в коротковолновую сторону и увеличением значений удельного вращения мономерного звена $[M']_{\min}$ и $[M']_{\max}$. По-видимому, при злокачественном росте в этих органеллах наступают глубокие физико-химические и морфологические изменения, сопровождающиеся нарушением гидрофобного взаимодействия липида с белком и деструкцией не только на уровне третичной и четвертичной, но и на уровне вторичной структуры белка. В-третьих, не происходит существенных изменений в процентном содержании белка в β -форме. Как было ранее показано (⁹), β -структура стабильнее α -спирали и эта дополнительная стабильность может быть обусловлена гидрофобным взаимодействием боковых цепей, отсутствующим в α -спирали. Для определения наличия в данной белковой системе β -структуры применялась инфракрасная спектроскопия, при которой присутствие белка обнаруживается по поглощению в области 1650 см⁻¹ (полоса Амид I).

Таблица 2

Положение характеристических полос поглощения инфракрасных спектров митохондрий и мембран эндоплазматического ретикулума (э.р.), выделенных из печени нормальных крыс и крыс-опухоленосителей (см⁻¹)

Объект	Полоса Амид I			Полоса Амид II			Другие полосы
	нейтр.	кисл.	щел.	нейтр.	кисл.	щел.	
Нативные митохондрии	1662 1665*	1660 1665*	1665	1552 1543*	1540 1560*	1550	1720 (кисл. и щел.)
Гепатомные митохондрии	1660	1650	1660 1650*	1550 1545*	1555 1545*	1545—1550 1525*	1720—1730
Нативные мембраны э.р.	1660 1645* 1635*	—	—	1550 1520*	—	—	1730—1735
Гепатомные мембраны э.р.	1662 1645*	1665 1655*	1660 1650*	1555—1560	1555 1543* 1515*	1552 1540* 1520*	1730—1735

* Плечо, наблюдаемое при расщеплении основной компоненты.

и 1550 см^{-1} (полоса Амид II). Их относительная интенсивность приблизительно одинакова и не зависит от боковой цепи; они чувствительны к окружению амидных групп и характеризуют молекулярную конформацию препарата. Данные, полученные в ходе настоящей работы, суммированы в табл. 2.

Из табл. 2 видно, что как для митохондрий, так и для мембран эндоплазматического ретикулума четко выделяется полоса Амид I с частотой, соответствующей присутствию α -спирали или неупорядоченной структуры. Содержание β -формы невелико, что находится в соответствии с литературными данными. Что касается мембран, то наличие в спектре плеча при 1645 и 1635 см^{-1} может указывать на присутствие в них антипараллельной β -структуры. На это также указывает и наблюдаемое поглощение при 1520 см^{-1} . Другим существенным выводом является незначительный сдвиг полосы Амид I при изменении pH среды в кислую или щелочную сторону в случае митохондрий. Ранее было показано ⁽¹⁰⁾, что при сдвиге pH в кислую сторону выявляется полоса при 1690 см^{-1} , указывающая на переход определенной части белка в β -форму. В наших опытах эти результаты не подтвердились, что согласуется с данными, сообщенными Уоллохом ⁽⁵⁾. После обработки митохондрий по Фолчу также не было получено заметного перехода белка в β -форму, но появляется полоса при 1730 см^{-1} , отсутствующая у нормальных митохондрий. Эта полоса, вызываемая растяжением C=O-связи в эфирах жирных кислот, была отнесена за счет липид-белкового взаимодействия ⁽¹¹⁾. Согласно авторам, она исчезает при экстрагировании липидов, в нашем случае она проявляется в ходе данного экстрагирования. По-видимому, ее следует связать либо с изменением суммарного заряда митохондрий (как следствие первичных глубоких структурных изменений в конформации белка и липида), либо, что более вероятно, с частичным удалением слабосвязанного липида с поверхности белка, что сопровождается внутримолекулярными изменениями, нарушением гидрофобного взаимодействия белка с липидом и выходом на поверхность более гидрофильных участков. При этом удаление липида почти не сказывается на положении полосы Амид I, но имеет место значительные сдвиги в сторону меньших частот в положении полосы Амид II. Аналогичные изменения в инфракрасных спектрах наблюдаются и при развитии в печени злокачественных образований. Эти данные позволяют считать полосу Амид II более чувствительным индикатором, указывающим на структурные изменения или перестройки в клеточных органеллах при различных внешних воздействиях.

Таким образом, можно предположить, что при злокачественном росте имеет место нарушение липид-белкового взаимодействия в митохондриях и мембранах эндоплазматического ретикулума. Это сопровождается деструкцией белкового компонента не только на уровне третичной и четвертичной, но и на уровне вторичной структур, т. е. его переходом из упорядоченной α -спиральной конформации к неупорядоченной конформации клубка.

Московский государственный университет
им. М. В. Ломоносова

Поступило
11 XII 1970

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ M. F. Perutz, J. Mol. Biol., **13**, 646 (1965). ² M. F. Perutz, J. Mol. Biol., **13**, 669 (1965). ³ J. Lenard, S. Singer, Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., **56**, 1828 (1966). ⁴ D. W. Urry, M. Mednieks, E. Bejnarowicz, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., **57**, 1024 (1967). ⁵ D. F. H. Wallach, P. H. Zahler, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., **56**, 1552 (1966). ⁶ W. C. Schneider, G. H. Hogeboom, J. Biol. Chem., **183**, 123 (1950). ⁷ O. H. Lowry, M. J. Rosebrough et al., J. Biol. Chem., **193**, 265 (1957). ⁸ J. Folch, M. Lees, G. H. Sloane Stanley, J. Biol. Chem., **226**, 497 (1957). ⁹ B. Davidson, N. Tooney, G. D. Fasman, Biochem. Biophys. Res. Commun., **23**, 156 (1966). ¹⁰ T. Miyazawa, E. R. Blout, J. Am. Chem. Soc., **83**, 712 (1961). ¹¹ D. Chapman, V. B. Kamat, R. J. Levene, Science, **160**, 3825, 314 (1968).