

УДК 577.3

БИОФИЗИКА

Е. А. ЧЕРНИЦКИЙ, С. В. КОНЕВ, Е. И. ЛИН, Т. И. ЛЫСКОВА, Н. М. КОЗЛОВА

ОСОБЕННОСТИ СТРУКТУРНОГО СОСТОЯНИЯ БЕЛКОВ В ЭРИТРОЦИТАРНЫХ МЕМБРАНАХ

(Представлено академиком Г. М. Франком 14 II 1972)

Одной из особенностей структурного состояния белков в составе мембранных систем интактной клетки является их способность совершать генерализированные кооперативные структурные переходы под воздействием физиологически умеренных температур (^{1, 2}); при этом предполагается, что такого типа переходы могут выступать в роли эффективного механизма регуляции метаболических процессов в клетке (³). Существование межмолекулярной (мембранной) кооперативности в интактных клетках следует из того факта, что для них изменение конформационно чувствительного параметра — спектров белковой флуоресценции происходит в более узком температурном интервале ($\Delta t = 5-8^\circ$), чем это наблюдается для целого ряда белков в растворе ($\Delta t = 15-20^\circ$) или для тех же клеток с нарушенной надмолекулярной структурой (¹⁻⁴). Поскольку в состав клетки входят различные белки, а для каждого белка в растворе характерен свой температурный интервал перехода, то для клетки следовало ожидать не сужения этого интервала, а, наоборот, его расширения вследствие суперпозиции составляющих кривых. Однако сужение температурного интервала перехода для интактных клеток может быть объяснено и другой причиной. Возможно, что с изменением температуры меняется конформация одного «высококооперативного» белка, управляющего проницаемостью цитоплазматической мембраны по отношению к катионам, что приводит к изменению солевого состава внутриклеточной среды (возможность изменения флуоресценции белков в растворе под влиянием различных ионов показана в работе (⁵)), т. е. генерализация структурных перестроек большинства белков клетки может возникнуть под влиянием вторичных факторов — ионных эффектов.

Поэтому в настоящей работе были проведены исследования на телях эритроцитов — объектах, на которых в значительной степени можно исключить влияние солевых эффектов, поскольку уже в процессе гемолиза происходит выравнивание ионного состава внутри клетки и в окружающей среде.

Эритроцитарные мембраны выделяли из бычьей крови по методу Доджа и других (⁶). Сдвиги полосы флуоресценции определяли методом разностной спектрофлуориметрии (^{5, 7}), об изменении светорассеяния судили по оптической плотности, измеренной на колориметре-нефелометре ФЭК-56 при $\lambda > 630$ мμ.

Спектры ультрафиолетовой флуоресценции эритроцитарных мембран при $\lambda_{возб} = 280$ мμ обусловлены практически полностью излучением триптофановых остатков белка и имеют максимумы при 332 мμ, т. е. более «гидрофобны», чем в работе (⁸) ($\lambda_{max} = 338$ мμ). Для другого вида мембран — митохондриальных Клебановым и Владимировым получены почти такие же значения λ_{max} , как и у нас 331 мμ (⁹).

В соответствии с данными (⁸), «тирозиновая» компонента в спектрах флуоресценции эритроцитарных мембран не выявляется. Однако спектры

слегка зависят от длины волны возбуждающего света: для $\lambda_{\text{возб}}$ 255 и 313 мμ в некоторых образцах удавалось наблюдать в области 330—380 мμ резко структурированные компоненты люминесценции, которые близки к спектрам витаминов К и Е соответственно. Поэтому во всех опытах контролировалась возможность влияния центров свечения нетриптофановой природы.

При изменении температуры в области 5—35° для препаратов эритроцитарных мембран некоторых выделений наблюдались скачкообразные

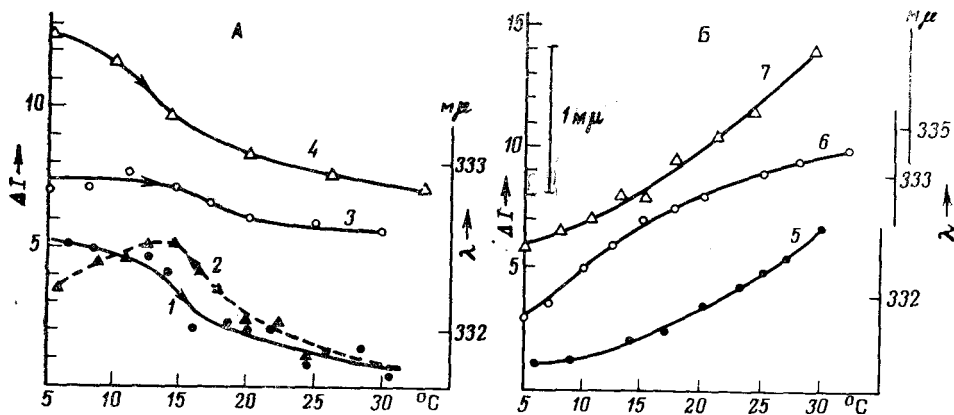


Рис. 1. Температурные зависимости положения максимума спектров флуоресценции эритроцитарных мембран в 0,155 M NaCl (А) и в фосфатном буфере рН 7, 4 (Б). 1, 2 — сразу после выделения при повышении и понижении температуры соответственно, 3 — на вторые сутки после выделения, 4 — в присутствии 8 M мочевины, 5 — после обработки 50 mM ЭДТА, 6 — 0,4% додецилсульфатом натрия, 7 — 33 mM дезоксихолатом натрия. Кривая 4 смещена вниз на 37 делений, кривые 6 и 7 на 5 и 13 делений соответственно

изменения спектров флуоресценции в довольно узком температурном интервале 12—20° (рис. 1А), что свидетельствует о структурных переходах белков в составе мембран (повышение температуры выше 40° приводило к плавным длинноволновым необратимым смещениям спектров, обусловленным, по-видимому, тепловой денатурацией белков). Такие переходы исчезают по мере хранения мембран (рис. 1А, 3) и после денатурации их кипячением. Это может говорить о том, что способность мембран претерпевать температурно-индуцируемые структурные перестройки зависит от интактных свойств системы.

Для большинства выделенных препаратов в области температур 5—35° не происходило никаких изменений спектров белковой флуоресценции, но они появлялись при «распатывании» структуры мембран мочевиной. При этом температурные кривые имели S-образную форму (рис. 1А, 4), что свидетельствовало о частичном сохранении кооперативных свойств мембраны. Известно, что 8 M мочевины не вызывает сильных изменений структуры эритроцитарных мембран (¹⁰). Растворение же мембран в присутствии ЭДТА, натрий-додецилсульфата или дезоксихолата (различная степень фрагментации мембран) приводило к полной потере кооперативных свойств и появлению не коротковолнового, а, наоборот, длинноволнового и плавного сдвига спектров флуоресценции с повышением температуры (рис. 1Б).

Отсутствие температурных изменений в спектрах флуоресценции для большинства выделенных препаратов, по-видимому, еще не доказывает постоянства структуры мембран. Ряд данных говорит о том, что белки мембран находятся в особом состоянии, при котором небольшие изменения свойств микроокружения триптофановых остатков могут не проявиться в параметрах люминесценции. Это, прежде всего, коротковолновое, почти предельное для белков положение максимума флуоресценции, ко-

торое ограничивает возможность дальнейших сдвигов в «синюю» область, а также небольшое изменение спектров при ряде заведомо сильных денагурирующих воздействиях на белки мембраны (например, кипячение). Мочевина как бы лабилизирует структуру и проявляет в люминесценции ее температурно-индуцированные переходы; при этом кооперативность

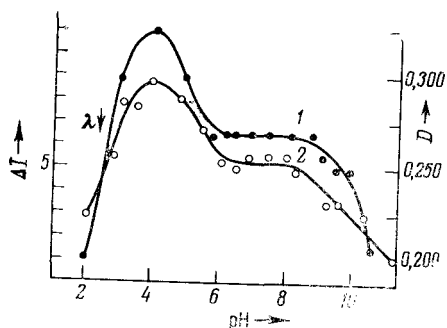


Рис. 2. Зависимость положения максимума спектров флуоресценции (1) и светорассеяния (2) мембран эритроцитов от pH среды. Фосфатный буфер pH 7,4

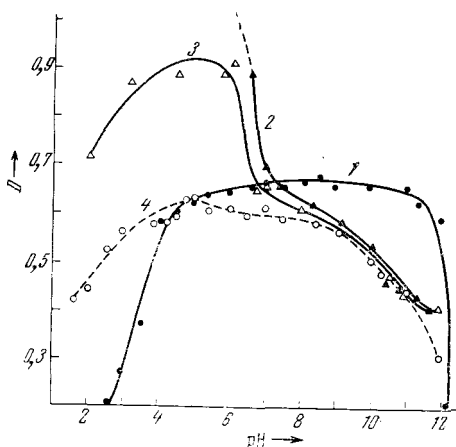


Рис. 3. Зависимость светорассеяния от pH среды для эритроцитов (1) и эритроцитарных мембран после первой (2), второй (3) и третьей (4) отмывки их от гемоглобина. Фосфатный буфер pH 7,4

системы уменьшается и переход слегка сдвигается в область низких температур.

Для выяснения причин, почему препараты одного выделения мембран проявляют по флуоресценции температурные кооперативные переходы без добавок мочевины, а другие только в ее присутствии, мы исследовали зависимости положения максимума флуоресценции и светорассеяния от pH среды. Такие зависимости должны характеризовать устойчивость мембран к изменению «силового поля» электростатических взаимодействий и могли оказаться чувствительным параметром к их структурной организации. Действительно, препараты различных выделений проявляли некоторую вариабельность формы кривых. На рис. 2 представлены характерные кривые таких зависимостей. Для светорассеяния полученная нами зависимость (кривая 2) аналогична обнаруженному ранее для митохондриальных ⁽⁹⁾ и субмитохондриальных ⁽¹¹⁾ частиц, а также оболочек жировых шариков молока ⁽⁹⁾, что свидетельствует об общности свойств мембран различного происхождения. Кривая 1, характеризующая зависимость положения максимума флуоресценции от pH, имеет сходный вид (рис. 2, 1, 2), однако мы с уверенностью можем сказать, что ход этой кривой не обусловлен изменениями светорассеяния. В частности, специальными опытами по исследованию влияния ионной силы раствора на зависимости 1 и 2 было показано, что коротковолновый сдвиг спектров флуоресценции и увеличение светорассеяния в области pH 5—3 отражают различные процессы: сдвиг спектров остается и в присутствии больших концентраций NaCl, когда изменения светорассеяния отсутствовали. Поэтому можно считать, что коротковолновый сдвиг спектров при pH 5—3 обусловлен конформационными перестройками белков, следствием которых является агрегация мембран и увеличение светорассеяния. Отметим, что для оболочек жировых шариков молока ⁽⁹⁾ обнаружен только длинноволновый сдвиг спектров при pH больше 8 и меньше 3 (отсутствует коротковолновый сдвиг при pH 5—3).

Вариабельность кривых 1 и 2 (рис. 2) для разных выделений проявлялась как в различиях пороговых величин pH щелочного падения, так и

в амплитудах подъема в области рН 5—3. Сходная картина наблюдалась также для одного исходного материала по мере отмывки эритроцитов от гемоглобина (рис. 3). Попытки максимально стандартизировать условия выделения не привели к устранению вариабельности рН-зависимостей. Поэтому наиболее вероятно, что ее причиной является неидентичность эритроцитарных мембран у различных индивидуумов, связанная с особенностями их физиологического состояния.

Сходным образом, можно предположить, что и различия в способности эритроцитарных мембран проявлять по флуоресценции температурно-индуцируемые кооперативные переходы (только в присутствии мочевины или без нее) также обусловлены физиологической вариабельностью.

Обнаруженные температурно-индуцируемые структурные переходы в эритроцитарных мембранах могут быть непосредственно связаны с регуляцией одной из важнейших функций мембран — их проницаемостью. Так, было обнаружено, что эритроциты человека в присутствии 0,4 М буганола испытывают при 17° резкое увеличение гемолиза (¹²). В других работах (¹³, ¹⁴) указывается, что подобный эффект вызывает ретинол и родственные ему вещества: гемолиз эритроцитов наблюдается только выше 20°.

Таким образом, на основании данных, рассмотренных в статье, можно считать, что обнаруженная ранее на клетках генерализация кооперативных структурных переходов белков связана с внутренней спецификой белок-белковых и белок-липидных взаимодействий в пределах самой мембранной системы, а не обусловлена изменениями концентрации понов внутри клетки вследствие локальных нарушений проницаемости цитоплазматических мембран.

Лаборатория биофизики и изотопов
Академии наук БССР
Минск

Поступило
25 I 1972

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ С. В. Конев, Е. А. Черницкий и др., Докл. АН БССР, 14, 68 (1970).
² Е. А. Черницкий, Е. И. Лип, С. В. Конев, Биофизика, 14, 1023 (1969).
³ С. В. Конев, С. Л. Аксенцев, Е. А. Черницкий, Кооперативные переходы белков в клетке, Минск, 1970. ⁴ С. В. Конев, В. М. Мажуль, Е. А. Черницкий, Докл. АН БССР, 12, 1122 (1968). ⁵ Е. А. Черницкий, Н. М. Козлова, Вестн. АН БССР, сер. биол., 47 (1971). ⁶ G. T. Dodge, C. Mitchell, D. J. Hanahan, Arch. Biochem. and Biophys., 100, 119 (1963). ⁷ Е. А. Черницкий, В. М. Мажуль, Биофизика, 15, 408 (1970). ⁸ D. F. H. Wallach, E. Ferber et al., Biochim. et biophys. acta, 203, 67 (1970). ⁹ Г. И. Клебанов, Ю. А. Владимиров, Тр. II Московск. мед. инст. им. Н. И. Пирогова, М., 1971, стр. 5. ¹⁰ A. S. Khandowala, C. B. Kasper, Biochim. et biophys. acta, 233, 348 (1971). ¹¹ J. M. Wrigglesworth, L. Packer, Arch. Biochem. and biophys., 133, 194 (1969). ¹² D. H. Burt, J. W. Green, Biochim. et biophys. acta, 225, 46 (1971). ¹³ J. T. Dingle, J. A. Lucy, Biol. Rev., 40, 422 (1965). ¹⁴ K. Pzumo, T. Goshizawa, Biochim. et biophys. acta, 249, 135 (1971).