

В. Л. БОРОВЯГИН, Б. И. МЕДВЕДЕВ, Д. А. МОШКОВ

**УЛЬТРАСТРУКТУРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ
ЦИТОХРОМ-С-ФОСФОЛИПИДНЫХ МЕМБРАН ПОСЛЕ УДАЛЕНИЯ
ЛИПИДОВ И ОБРАБОТКИ ПРОНАЗОЙ**

(Представлено академиком Г. М. Франком 30 XII 1971)

После публикаций Флейшером и Стеккениусом^(1, 2), показавших сохранность мембран митохондрий после удаления из них более 95% липидов, во многих работах стали высказываться решительные требования полного пересмотра модели Даниэлли — Робертсона в отношении к клеточным мембранам. Появились публикации субъединично-глобулярных моделей мембран. Нами неоднократно указывалось⁽³⁻⁷⁾, что такого рода работы содержат весьма слабые аргументы в пользу дискретного принципа структурной организации мембран. В ряду публикаций⁽⁴⁻⁸⁾ обращалось внимание на то, что после обработки ацетонами трехслойная структура мембран может сохраняться благодаря неполному удалению липидов. Кроме того, сохранность мембран обеспечивается в этом случае и благодаря нелипидным компонентам, расположенным как в самих мембранах, так и в прилежащих областях цитоплазмы и матрикса. Специальные исследования внутренних мембран митохондрий⁽⁹⁾ и мембран низших растений⁽¹⁰⁾ при обработке проназой выяснили, что около 65—80% белковых компонентов этих мембран легко гидролизуются ферментом и это сопровождается уменьшением поперечного сечения мембран.

Можно предполагать, что в основе определенных клеточных и модельных мембран могут лежать сходные принципы молекулярной организации. Если это так, то реакции тех и других на одни и те же воздействия должны быть в известной мере адекватными. Цель настоящей работы — описание результатов экспериментов, в которых изучалась ультраструктура модельных мембран, подвергавшихся обработке ацетонами по Флейшер^(1, 2) с целью удаления фосфолипидов, а в отдельных опытах — подвергавшихся действию проназы с целью гидролиза их белкового компонента.

Фракции общих фосфолипидов из миеллина мозга быка и митохондрий печенки крысы⁽¹¹⁾ обрабатывали ацетонами⁽²⁾ в атмосфере аргона. Экстрагированные ацетонами фосфолипиды использовались для получения липидных, а затем и для формирования цитохром-С-фосфолипидных мультислойных («больших») и одно- и двухслойных («малых») мицелл «водного» и «изооктанового» комплексов⁽¹²⁾.

Фиксированные 2% глютаральдегидом (24 час.) мицеллы комплексов обрабатывали смесью хлороформ:метанол:HCl = 200:100:1⁽¹³⁾, обезвоживали в 96%, 100% ацетонах и заливали в смолу Эпон-812. Нефиксированные мицеллы комплексов обрабатывали ацетонами по Флейшер⁽²⁾ и раздельно фиксировали в 1% OsO₄, в 2% глютаральдегиде или в 2% параформальдегиде, обезвоживали в ацетонах и заливали в Эпон-812. Количественный контроль липидов выполнялся по методу Чен⁽¹⁴⁾, а качественный контроль фосфолипидов в экспериментах с предварительной фиксацией альдегидами — методом тонкослойной хроматографии по Гиг⁽¹⁵⁾ *.

В отдельных опытах к ультразвуковым «малым» мицеллам обоих комплек-

* Выполнен Б. И. Медведевым.

сов добавляли буферные растворы проназы (фирмы «Nagase», активность 150 тыс. ед.) с концентрацией в 50; 100; 250 $\mu\text{г}$ на 1 мг белка суспензии и инкубировали с ферментом и без него (контроль) при 37° в течение 1–20 час. в атмосфере аргона с добавлением толуола. После инкубации суспензии мицелл охлаждали, промывали, центрифугировали и фиксировали раздельно осмием и альдегидами. Количественный анализ белка в контроле и в опытах определяли по методу Лоури (16).

Экстрагирование фосфолипидов. По данным хроматографического анализа, фосфолипидный состав в исходных мицеллах (рис. 1а) * почти идентичен составу мицелл «водного» (рис. 1б) и «изооктанового» (рис. 1г) комплексов. Если предварительно фиксированные глютаральдегидом мицеллы обработать хлороформ-метанолом (13), то из мембран комплексов (рис. 1в, д) не экстрагируется почти весь фосфатидилэтаноламин (ФЭА), составляющий около 20% от всех фосфолипидов миелинового и около 40% от всех липидов митохондриального происхождения. Если же такие фиксированные альдегидами мицеллы обработать смесью хлороформ — метанол — HCl (13), то из мембран экстрагируется до 70–80% ФЭА и при этом сохраняется частично их ламеллярная структура (рис. 2а). На поперечных срезах таких модельных мембран можно видеть, что они представляют собой как бы белковые «скелеты» моделей. Сохранение видимой ламеллярности в таких моделях не только в целых мицеллах, но и во фрагментах мембран объясняется, по-видимому, полимеризацией молекул альдегидов как на их поверхности, так и в поперечном направлении их структуры. Так, например, если модели зафиксировать параформальдегидом или в течение короткого времени глютаральдегидом, то при последующей аналогичной обработке структуры мембран, как правило, не сохраняются: происходит как бы спадение (слипание) белковых слоев и исчезновение их гидрофобной области. Обработка же нефиксированных мицелл обоих комплексов в тех же условиях экстрагирует более 95% всех липидов и полностью разрушает их структуру. Если предварительно нефиксированные мицеллы комплексов обработать водными растворами ацетона по Флейшер (2), то экстрагируется до 88% фосфолипидов из мембран «водного» и 70–75% из мембран «изооктанового» комплекса. Последующая фиксация таких мицелл глютаральдегидом сохраняет их ламеллярную организацию (рис. 2б), а фиксация осмием сохраняет структуру мембран только в мицеллах «изооктанового» (рис. 2в) и полностью разрушает их в мицеллах «водного» комплекса. Факторы, сохраняющие трехслойную структуру модельных мембран, предварительно фиксированных глютаральдегидом и затем подвергнутых делипидизации, описаны выше. При этом в стабилизации структуры принимают участие неэкстрагируемые фосфолипиды — чем выше процент экстрагируемых липидов, тем хуже сохранность мембранных «скелетов». Из специальных опытов стало ясно, что стабилизация структуры мембран при альдегидных фиксациях зависит от скорости полимеризации альдегида. Предварительное удаление 70–80% фосфолипидов ускоряет полимеризацию молекул альдегида, стабилизирующих их структуру. «Сшивка» структуры модельных и клеточных мембран молекулами альдегида может быть ускорена фиксацией при 70–80°. В этих условиях удастся «зафиксировать» обратимое увеличение поперечного сечения гидрофобной (светлой) и гидрофильной (темной) областей в модельных (рис. 2г) и в клеточных мембранах (7).

Обработка ацетоном нефиксированных модельных мембран, так же как и мембран митохондрий (8), сохраняет их трехслойную организацию благодаря частичной «фиксации» белковых молекул ацетоном и их полимеризации при последующей фиксации альдегидами.

Разрушение мембран в делипидизированных ацетоном мицеллах «водного» комплекса при последующей фиксации осмием объясняется тем, что

* Рис. 1 и 2 см. на вклейке к стр. 759.

монослой молекул цитохрома С слабо защищен взаимодействием с липидами: молекулы белка окисляются осмием, денатурируют и это сопровождается разрушением их слоев. Если в ацетоне нет NH_4OH или HCl , то мембраны «водного» комплекса могут сохраняться при удалении из них 80% липидов и последующей осмиевой фиксации. Это связано, по-видимому, с тем, что NH_4OH и HCl как бы «распатывают» ассоциацию белковых молекул друг с другом и провоцируют разрушение их слоев при последующей осмиевой фиксации.

Из мембран «изооктанового» комплекса при ацетоновой обработке экстрагируется только 75% фосфолипидов в присутствии NH_4OH и около 90% при добавлении в ацетон 30 ммол. HCl . Последующие фиксации таких мицелл альдегидом и осмием хорошо сохраняют их ламеллярность. Все это может свидетельствовать о том, что ассоциация цитохрома С с фосфолипидами осуществляется при аполярном взаимодействии, препятствующем экстрагированию значительной части фосфолипидных молекул. Молекулы белка, очевидно, частично утоплены в полярные области билипидного слоя и как бы «импрегнированы» имп. Такая локализация молекул белка может препятствовать их окислению осмием. Стабилизация же структуры этих мембран после удаления 75% липидов может осуществляться за счет полимеризации неэкстрагированных фосфолипидов осмием (17).

Обработка модельных мембран проназой*. При обработке мицелл обоих комплексов проназой (250 мкг на 1 мг белка суспензии) отмечен максимальный эффект гидролиза белка: в мембранах «водного» комплекса гидролизуется более 60%, а в мембранах «изооктанового» цитохрома С. Отмечено, что процент гидролизуемого белка находится в прямой зависимости от многослойности мицелл, что можно объяснить плохой проницаемостью фермента в поперечном направлении липидных слоев. В мицеллах «водного» комплекса после их обработки проназой и последующей фиксации глутаральдегидом одиночно лежащих мембран, как правило, выявлять не удавалось, в то время как в мицеллах «изооктанового» комплекса в тех же условиях одиночные и двойные мембраны составляли значительную часть материала (рис. 2d). В мицеллах обоих комплексов после действия проназы и последующей фиксации осмием часто можно наблюдать многослойные ламеллярные структуры с параметрами чистых липидных бислоев. Анализ материала в контроле и в опыте позволяет прийти к заключению, что почти весь цитохром С, локализованный на поверхности одиночных мембран «водного» комплекса, гидролизуется ферментом. В этих мембранах могут быть защищены лишь отдельные пептидные участки белковых молекул, локализованные в области глицериновых групп липидов, а также молекулы белка, расположенные между мембранами в замкнутых многослойных мицеллах. В мембранах «изооктанового» комплекса значительная часть белковых молекул защищена от гидролиза сильным аполярным и полярным взаимодействием с фосфолипидами.

На основании изложенного можно сделать следующие выводы:

1. В мембранах «водного» комплекса частично развернутые молекулы цитохрома С локализованы в виде монослоя (в некоторых случаях может быть и два слоя) в интерфазных областях бимолекулярного фосфолипидного слоя. Такая ассоциация молекул цитохрома С с бислоем липидов способствует сохранению белковых «скелетов» мембран при их делипидизации, но не препятствует гидролизу проназой. Молекулярная организация мембран «водного» комплекса должна быть скорее аналогична организации reagрегированных клеточных мембран.

2. В мембранах «изооктанового» комплекса молекулы белка не образуют друг с другом непосредственных контактов. Структура этих мембран

* Установлено, что в наших экспериментах инкубация фосфолипидных мицелл с проназой не давала комплексования фермента с фосфолипидами миелинового и митохондриального происхождения.

представляет собой как бы полимеризованные (по бимолекулярному фосфолипидному слою) липопротенные комплексы, белковые молекулы которых «погружены» в глицериновые, а может быть и частично в жирнокислотные области фосфолипидов. Молекулярная организация этих мембран, по-видимому, наиболее близка к организации мембран фоторецепторов⁽⁶⁾.

Авторы выражают благодарность Н. И. Шутиловой и Л. А. Хабибуллиной за помощь в проведении экспериментов.

Институт биофизики
Академии наук СССР
Пушино-на-Оке

Поступило
30 XII 1971

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ S. Fleischer, B. Fleischer, W. Stoeckenius, *Federat. Proc.*, **24**, 2, 296 (1965). ² S. Fleischer, B. Fleischer, W. Stoeckenius, *J. Cell Biol.*, **32**, 1, 193 (1967). ³ В. Л. Боровягин, *ДАН*, **173**, № 3, 685 (1967). ⁴ В. Л. Боровягин, *Цитология*, **9**, 5, 505 (1967). ⁵ В. Л. Боровягин, *Биологические ультраструктуры*, М., 1969, стр. 46. ⁶ В. Л. Боровягин, М. А. Островский, И. Б. Федорович, *Биофизика*, **16**, в. 2, 350 (1971). ⁷ В. Л. Боровягин, *Биофизика*, **16**, в. 4, 746 (1971). ⁸ Д. А. Мошков, В. Л. Боровягин и др., *Сборн. Структура и функции митохондрий*, «Наука», 1972, стр. 67. ⁹ В. Л. Боровягин, Д. А. Мошков и др., *Сборн. Биология и науч.-техн. прогресс*, Пушино, 1971, стр. 7. ¹⁰ H. Morowitz, T. M. Terry, *Biochim. et biophys. acta*, **183**, 2, 276 (1969). ¹¹ P. Mueller, D. O. Rudin et al., In: *Recent Progr. in Surf. Sci.*, **1**, 1964, p. 379. ¹² V. L. Borovjagin, D. A. Moshkov, *IV Intern. confer., Chem. Nat. Prod.*, Riga, 1970, 30a. ¹³ L. Napolitano, F. Le Baron, J. Scaletti, *J. Cell Biol.*, **34**, 3, 817 (1967). ¹⁴ P. S. Chen, T. Y. Toribara, H. Warner, *Anal. Chem.*, **28**, 1756 (1956). ¹⁵ R. Gigg, S. Payne, *Chem. Phys. Lipids*, **3**, 3, 292 (1969). ¹⁶ O. H. Lowry, H. Rosebrough et al., *J. Biol. Chem.*, **193**, 1, 265 (1951). ¹⁷ E. D. Korn, *J. Cell Biol.*, **34**, 2, 624 (1967).