

С. В. КОНЕВ, Е. И. СЛОБОЖАНИНА, Е. А. ЧЕРНИЦКИЙ

КООПЕРАТИВНЫЕ СТРУКТУРНЫЕ ПЕРЕСТРОЙКИ ЭРИТРОЦИТАРНЫХ МЕМБРАН ПРИ ВЗАИМОДЕЙСТВИИ ИХ С ГОРМОНАМИ

(Представлено академиком А. Н. Белозерским 17 V 1972)

Одним из эффективных механизмов регуляции биохимико-физиологической активности клеток могут быть обратимые структурные переходы в мембранных системах клеток, осуществляющиеся по кооперативному закону (¹⁻³). С помощью ряда конформационно-чувствительных тестов (флуоресценция триптофанилов и меток, дисперсия оптического вращения, круговой дихроизм, электронная микроскопия, спиновый зонд, и.к. спектроскопия, я.м.р., устойчивость к протеолитическим ферментам и так далее) подобные переходы зарегистрированы у мембран различного происхождения при воздействии физиологически-умеренных температур (^{4, 5}), мембранотропных катионов (^{6, 7}), субстратов, активирующих энергообмен (⁸⁻¹⁰).

В ряде работ описано скачкообразное изменение функциональной активности клеток, вызванное структурным переходом (³). Представляется также вероятным, что по крайней мере некоторые гормоны реализуют свое первичное биологическое действие на уровне мембран, комплексируясь с ее рецепторами и вызывая локальные конформационные изменения в рецепторных белках. Возможно, что после присоединения критического числа молекул гормона локальные конформационные изменения в рецепторах инициируют генерализованную структурную перестройку всей мембраны, определяющую физиологические эффекты. Косвенные доказательства в пользу мембрано-конформационного механизма действия гормонов систематизированы в работе (³). И лишь совсем недавно в работах Зоненберга с помощью кругового дихроизма и люминесценции были зарегистрированы конформационные перестройки в изолированных мембранах под действием гормона роста человека (^{11, 12}).

В настоящей работе с помощью конформационно-чувствительного люминесцентного метода (измерение положения максимума спектра белковой флуоресценции) проведено исследование влияния различных концентраций стероидных гормонов (гидрокортизонсукцинат и гидрокортизонацетат) на структурное состояние изолированных эритроцитарных мембран. Эритроцитарные мембраны выделялись из бычьей крови по методу Доджа и Митчела. В опытах использовалась суспензия мембран в изотоническом солевом растворе. Незначительные по величине сдвиги спектров флуоресценции регистрировались методом разностной спектрофлуориметрии (¹³).

На рис. 1 приведены зависимости положения максимума спектров белковой (триптофанильной) флуоресценции эритроцитарных мембран ($\lambda_{\max}$) от концентрации сукцинат-гидрокортизона (С) при возбуждении $\lambda = 296$ мμ. Из рисунка видно, что вплоть до концентраций $3 \cdot 10^{-4}$ М гормон не оказывает никакого влияния на спектры флуоресценции нативных мембран при $t = 20^\circ$ (кривая 1). В концентрационном интервале $3-6 \cdot 10^{-4}$ М наблюдается длинноволновый сдвиг спектров флуоресценции, прекращающийся в области более высоких концентраций ($6 \div 7 \cdot 10^{-4}$ М). В целом

кривая зависимости $\lambda_{\max} = f(C)$ имеет S-образный переходный участок, характерный для кооперативных структурных переходов. Поскольку в флуоресценцию вносят вклад различные белки мембран, можно думать, что структурная перестройка охватывает большинство белков, т. е. носит генерализованный характер. Растворение мембран в детергенте додецилсульфате натрия, а также денатурация их белков 8 М мочевиной или кипячением (рис. 2) приводит к исчезновению кооперативного характера ответа: наблюдается лишь плавный длинноволновый сдвиг спектров флуоресценции по мере возрастания концентрации гормона.

Исчезновение S-образных участков на кривых $\lambda_{\max} = f(C)$ у мембран, подвергнутых воздействию 8 М мочевины или кипячению, косвенно сви-

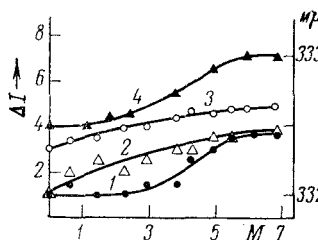


Рис. 1

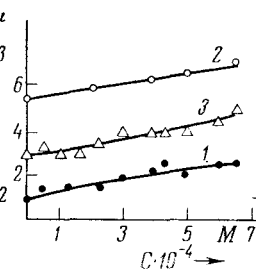


Рис. 2

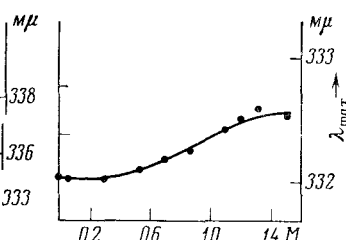


Рис. 3

Рис. 1. Зависимости $\lambda_{\max}$ спектров флуоресценции эритроцитарных мембран от концентрации гидрокортизонсукцината (фосфатный буфер pH 7,4), $\lambda_{\text{возб}}$ 296 мμ при $t = 20^\circ$ (1), $3-5^\circ$ (2), при 20° , обработанные ультразвуком (22 кгц, 50 вт/см², 30 сек) (3) и при 20° , но после 5-кратного замораживания и оттаивания, кривая смещена на 3 деления (4)

Рис. 2. Зависимости $\lambda_{\max}$ спектров флуоресценции эритроцитарных мембран от концентрации гидрокортизонсукцината в 0,4% додецилсульфате натрия (1), в 8 М мочевины (2) и фосфатном буфере pH 7,4 после 15 мин. кипячения мембран (3); кривые 2 и 3 смещены вниз на 31 и 17 делений

Рис. 3. Зависимость $\lambda_{\max}$ спектров флуоресценции эритроцитарных мембран от концентрации гидрокортизонацетата (фосфатный буфер pH 7,4; 20° C), $\lambda_{\text{возб}}$ 296 мμ

детельствует против того, что кооперативность перестройки мембран определяется липидной фазой, поскольку в таких мембранах, с одной стороны, представлены все липиды, а с другой — сохраняется чувствительность белков к гормону, проявляющаяся в градуальных сдвигах спектров флуоресценции. По-видимому, для обеспечения кооперативного характера реакции мембраны на действие гормона необходима строго специфическая сеть межмолекулярных (белок-белковых и белок-липидных) взаимодействий. Это отчетливо проявляется при сравнении характера действия гормона на мембрану при двух температурах 20 и 3° . На основании данных конформационно-чувствительных методов (флуоресценция, фотохемилюминесценция, скорость растворения мембран в дезоксихолате натрия) ранее нами было показано, что при температурах 15– 20° в эритроцитарных мембранах происходит переход из одного структурного состояния в другое, сопровождающийся скачкообразными изменениями функциональной активности (¹⁴, ¹⁵). Поэтому зависимость $\lambda_{\max} = f(C)$, снятая при температуре 3° , должна отражать чувствительность к гормону низкотемпературного мембранного конформера (НМК), в то время как при 20° — высокотемпературного (ВМК). Из рис. 1А видно, что в противоположность высокотемпературному конформеру, для НМК характерны плавные перестройки, хотя максимальные значения изменения $\lambda_{\max}$ в обоих случаях одни и те же.

Существенно также, что низкие концентрации гормона ($1-3 \cdot 10^{-4}$ М), неэффективные по отношению к ВМК, оказывают заметное влияние на

НМК. Это может означать, что у НМК произошло нарушение коммуникаций (слабых нековалентных физико-химических связей) между субъединицами мембраны (протомерами), в результате чего каждый из них перестраивается под действием молекулы гормона независимо друг от друга. В противоположность этому у высокотемпературного конформера такие связи настолько сильны, что они, формируя межпротомерную кооперативную систему, разрешают мембране перестраиваться только тогда, когда на рецепторах нескольких соседних протомеров сорбируется соответствующее количество молекул гормона*. В то же время одинаковые значения максимальных изменений $\lambda_{\max}$ ($C = 6-7 \cdot 10^{-5} M$) ВМК и НМК, т. е. тождественность их предельной чувствительности к гормону свидетельствует о том, что индуцируемый температурой переход между ними, по-видимому, связан в большей степени с переориентацией протомеров, чем с конформационными перестройками внутри них.

В связи со сказанным выше, позволительно думать, что в мембране реализуется принцип дальнего действия, когда состояние и устойчивость к внешним воздействиям белковых и липидных молекул или их комплексов контролируется не только близлежащими соседями, но и пространственно отдаленными компонентами. Иными словами, мембрана приобретает качества сверхполимера, перестраивающегося как единое целое⁽³⁾.

Если это так, то простое расщепление (например, ультразвуком) мембраны на фрагменты будет приводить к некоторым изменениям их молекулярной компоновки и свойств, а также к подавлению интегративной кооперативности. Кроме того, при ультразвуковой фрагментации, скорее всего, будут получаться неидентичные фрагменты, различающиеся как по размерам, так и по деталям внутреннего устройства (набор белков и липидов и их взаимное расположение). Вполне понятно, что эти фрагменты будут реагировать на гормон независимо друг от друга. Можно было ожидать поэтому, что ультразвуковая фрагментация мембран приведет к сглаживанию S-образного участка на кривых $\lambda_{\max} = f(C)$.

Действительно, как это видно из рис. 1 (кривая 3), «ультразвуковые» фрагменты мембран испытывают плавные изменения по мере увеличения концентрации гидрокортизонсукцината (наличие фрагментации контролировалось под фазово-контрастным микроскопом). К сходному, хотя и менее выраженному эффекту приводила и процедура многократного замораживания и оттаивания (+20, -196°) после которой, судя по наблюдениям под фазово-контрастным микроскопом, также происходила фрагментация телеш эритроцитов (однако в меньшей степени, чем у «ультразвуковых» препаратов). Это позволяет пренебречь и без того маловероятной ролью в эффекте «сглаживания» химических перестроек в мембранах при ультразвуковой обработке.

Действие на мембраны второго родственного гормона — гидрокортизон-ацетата, исследовавшегося в настоящей работе, принципиально ничем не отличалось от действия первого — гидрокортизонсукцината. В связи с этим мы ограничиваемся приведением лишь общей кривой: зависимостью положения максимума спектра белковой флуоресценции мембран от концентрации гидрокортизонацетата (рис. 3). Некоторые различия между гормонами в интервалах их концентраций, инициирующих структурную перестройку ($5-12 \cdot 10^{-5}$) для гидрокортизонацетата и $4-6 \cdot 10^{-5}$ для гидрокортизонсукцината), обусловлены либо влиянием кислотных групп, либо различиями в чистоте препаратов. Последнее наиболее вероятно, учитывая близость химической структуры обоих гормонов.

Таким образом, результаты, полученные в настоящей работе, с одной стороны, подтверждают существование у мембран общесистемных коопе-

* Альтернативное объяснение — межпротомерные взаимодействия препятствуют присоединению к рецептору одной молекулы гормона, разрешая сорбцию только при одновременной атаке нескольких рецепторов эффекторами.

ративных свойств, а с другой,— свидетельствуют в пользу того, что взаимодействие стероидных гормонов с мембраной инициирует структурную перестройку последних, протекающую в относительно узком критическом интервале концентраций эффектора.

Лаборатория биофизики и изотопов
Академии наук БССР
Минск

Поступило
17 IV 1972

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ С. В. Конев, Электроинно-возбужденные состояния биополимеров, Минск, 1965.
² J. P. Changeux, J. Thiery et al., Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., **57**, 335 (1967).
³ С. В. Конев, С. Л. Аксентев, Е. А. Черницкий, Кооперативные переходы белков в клетке, Минск, 1970. ⁴ J. K. Raison, J. M. Lyons et al., J. Biol. Chem., **246**, 4036 (1971). ⁵ М. Г. Гольдфельд, Д. Н. Островский, Э. Г. Розанцев, ДАН, **191**, 702 (1970). ⁶ Т. И. Лыскова, В. С. Финли, С. В. Конев, Докл. АН БССР, **15**, 273 (1971). ⁷ L. M. Reichman, V. K. Koltover et al., Stud. Biophys., **26**, 1, 65 (1971). ⁸ С. В. Конев, Т. И. Лыскова, Биофизика, **10**, 694 (1965).
⁹ Ch. H. Williams, W. J. Vail et al., J. Bioenerg., **1**, 47 (1970). ¹⁰ В. И. Сороковой, Г. И. Клебанов, Ю. А. Владимиров, ДАН, **199**, 1189 (1971). ¹¹ M. Sonenberg, Biochem. an Biophys. Res. Commun., **36**, 450 (1969). ¹² M. Sonenberg, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., **68**, 1051 (1971). ¹³ Е. А. Черницкий, Н. М. Козлова, Весті АН БССР, сер. біял., **1**, 47 (1971). ¹⁴ Е. А. Черницкий, И. М. Окунь и др., ДАН, **207**, № 1 (1972). ¹⁵ С. В. Конев, С. Л. Аксентев и др., ДАН, **205**, № 4 (1972).