

А. И. АРЧАКОВ, Г. И. БАЧМАНОВА, В. М. ДЕВИЧЕНСКИЙ,
Н. С. ЖЕРЕБКОВА, И. И. КАРУЗИНА, Г. И. АЛИМОВ

МАТРИЧНОЕ ВСТРАИВАНИЕ И САМОСБОРКА ПРИ РЕКОНСТРУКЦИИ МИКРОСОМНЫХ РЕДОКС-ЦЕПЕЙ

(Представлено академиком С. Е. Севериным 4 IX 1973)

Для реконструкции мембранных ферментных систем применяются три методических приема. Первый не предусматривает введения в реконструирующую систему какой-либо матрицы. Реконструкция происходит путем самосборки солюбилизованных мембранных белков и липидов (¹, ²). Второй — это встраивание мембранных белков в липосомы и бислойные мембраны (³). При этом используются как собственные липиды мембран, так и липиды, выделенные из других мембран, и даже синтетические. Изготовленные из них липосомы и бислойные мембраны служат как бы неспецифичной матрицей, в которую должны встраиваться белки. Третий методический прием сводится к встраиванию солюбилизованных липопротеидных комплексов и белков в мембраны, из которых они изолированы (⁴). Исходные мембраны применяются в этом случае в качестве строго специфичной матрицы.

В настоящей работе был проведен сравнительный анализ эффективности этих методических приемов для реконструкции редокс-цепей мембран эндоплазматического ретикулума печени. Реконструкция производилась из мембранных белков и липидов, солюбилизованных холатом натрия. «Тени» микросомных пузырьков, полученные в результате обработки фракции низкими концентрациями детергента, и липосомы, приготовленные из яичного лецитина, использовались в качестве специфичных и неспецифичных матриц. Работа выполнена на крысах-самцах весом 200—250 г. Микросомную фракцию получали, как описано ранее (⁵), используя в качестве среды выделения 1,15% KCl, содержащий 0,2 мМ этилендиаминотетраацетат (ЭДТА), 1 мМ дитиотриэтол. Осадок микросом суспендировали в 100 мМ трис-HCl-буфере, pH 7,4, содержавшем 0,2 мМ ЭДТА и 1 мМ дитиотриэтол (раствор ТЭД). В микросомах и реконструированных фракциях определяли содержание белка (⁶), фосфолипида (⁷), РНК (⁸), содержание цитохромов b₅ и P 450 (⁹), активность НАДФ-Н- и НАД-Н-специфичных редуктаз (¹⁰, ¹¹), НАДФ-Н- и НАД-Н-специфичных *n*-гидроксилаз анилина и *N*-диметилаз диметиланилина (ДМА) (¹², ¹³). Неозвученные липосомы из яичного лецитина получали по методу Бенгхема (¹⁴).

Концентрация холата Na 0,15%, разрывающая мембрану микросомных пузырьков, но не солюбилизирующая переносчики, была установлена при обработке микросом (фракция 1) разными концентрациями детергента. Изолированные после такой обработки центрифугированием и суспендированные в бездетергентной среде разорванные мембраны замыкаются и образуют везикулы, условно названные фракцией «теней» микросомных пузырьков. Надосадочная жидкость, полученная из фракции «теней» после обработки ее 4% холатом натрия и центрифугирования в течение 90 мин. при 150 000 *g*, содержит в растворенном виде мембранные белки и липопротеидные комплексы и условно обозначена как «солюбилизат». Для удаления из этой фракции 4% холата Na, который в такой высокой концентрации растворяет мембраны микросом, «солюбилизат» диализо-

вали в течение 22 час. при 4° против раствора, содержащего 20 мМ трис-НСl-буфер, рН 7,4, 0,2 мМ ЭДТА, 1 мМ дитиотриэтол и 0,1% холат Na. Введение в диализационную жидкость 0,1% холата Na необходимо для предотвращения самосборки. Диализованный «солюбилизиат» (фракция 2) использовали в качестве исходного материала для реконструкции редокс-цепей микросом, которую проводили следующим образом. Против раствора, содержащего 20 мМ ЭДТА, 0,2 мМ дитиотриэтол, в течение 22 час. при 4° диализовали четыре системы: а) 6 мл «теней» микросом (15 мг белка в 1 мл) и 55 мл «солюбилизиата» (2,5 мг белка в 1 мл) — матричное встраивание; б) контрольную смесь, содержащую 6 мл «теней» и 55 мл раствора ТЭД (100 мМ трис-НСl-буфер, рН 7,4, 0,2 мМ ЭДТА и 1 мМ дитиотриэтол); в) 55 мл «солюбилизиата» и 6 мл раствора ТЭД — самосборка; г) 55 мл «солюбилизиата» и 6 мл липосом (3 мг лецитина в 1 мл) — встраивание в липосомы. После диализа материал осаждали при 150 000 g в течение 90 мин. Полученные осадки: «тени»+«солюбилизиат» (фракция 3), «тени» (фракция 4), осадок «солюбилизиата» (фракция 5) и липосомы+«солюбилизиат» (фракция 6) суспендировали в растворе ТЭД и использовали для анализа.

На приведенных микрофотографиях отчетливо видно, что фракция микросом содержит замкнутые пузырьки различного размера с отчетливо выраженной мембраной и большое количество рибосом (рис. 1а). Фракция «теней» состоит из лишенных рибосом замкнутых микросомных пузырьков с плохо контрастируемой мембраной (рис. 1б). Возникающие при самосборке из компонентов «солюбилизиата» мембранные элементы формируют губчатые образования, в которых отдельные пузырьки сливаются вместе (рис. 1г). Подобные структуры не образуются, если реконструкцию проводить из «солюбилизиата» в присутствии «теней» микросом и липосом — специфичных или неспецифичных матриц. В результате встраивания компонентов «солюбилизиата» в матрицы формируются пузырьки микросомной фракции с хорошо контрастируемой бислойной мембраной (рис. 1д, е). Во фракции липосомы+«солюбилизиат» (рис. 1е) исчезают большие многослойные вакуоли, характерные для фракции липосом (рис. 1в). Пузырьки, образующиеся во фракциях «тени»+«солюбилизиат» (рис. 1д) и липосомы+«солюбилизиат» (рис. 1е), наиболее похожи на исходные вакуоли микросомной фракции (рис. 1а).

В результате самосборки и встраивания в липосомы во фракцию, осаждающуюся при 150 000 g, уходит около 35% всего исходного белка (расчет как во фракции 5, так и во фракции 6 производится от общего белка фракции 2), а при матричной реконструкции 50% (расчет во фракции 3 сделан от суммы содержания белка во фракциях 4 и 2). Реконструированные мембраны содержат больше цитохрома b_5 , чем исходные микросомы. Наибольшее содержание цитохрома b_5 в мембранах, полученных в результате встраивания переносчика в «тени» микросомных пузырьков (фракция 3) — $0,81 \text{ нмоль} \cdot \text{мг}^{-1}$. В липосомы этот переносчик встраивается менее эффективно (фракция 6) — $0,64 \text{ нмоль} \cdot \text{мг}^{-1}$. Удельное содержание его в липосомах несколько ниже, чем во фракции мембран, полученных путем самосборки (фракция 5) — $0,71 \text{ нмоль} \cdot \text{мг}^{-1}$. Цитохром Р450, в отличие от цитохрома b_5 , не встраивается в «тени» микросомных мембран. Удельное содержание его во фракции 3 ($0,74 \text{ нмоль} \cdot \text{мг}^{-1}$) ниже, чем во фракции 4 «теней» ($0,86 \text{ нмоль} \cdot \text{мг}^{-1}$). В то же время имеет место четко выраженная активация его при самосборке (фракция 5). Отношение неактивной формы цитохрома Р420 к активной Р450, равное 2,3 в «солюбилизиате» (фракция 2), снижается во фракции 5 (осадок «солюбилизиата») и во фракции 6 (липосомы+«солюбилизиат») до 1.

НАДН- и НАДФН-специфичные редуктазы обнаруживаются во фракциях 3, 5, 6 с удельной активностью гораздо большей, чем во фракциях 1 и 4. Однако расчет общей активности редуктаз, по которой судили

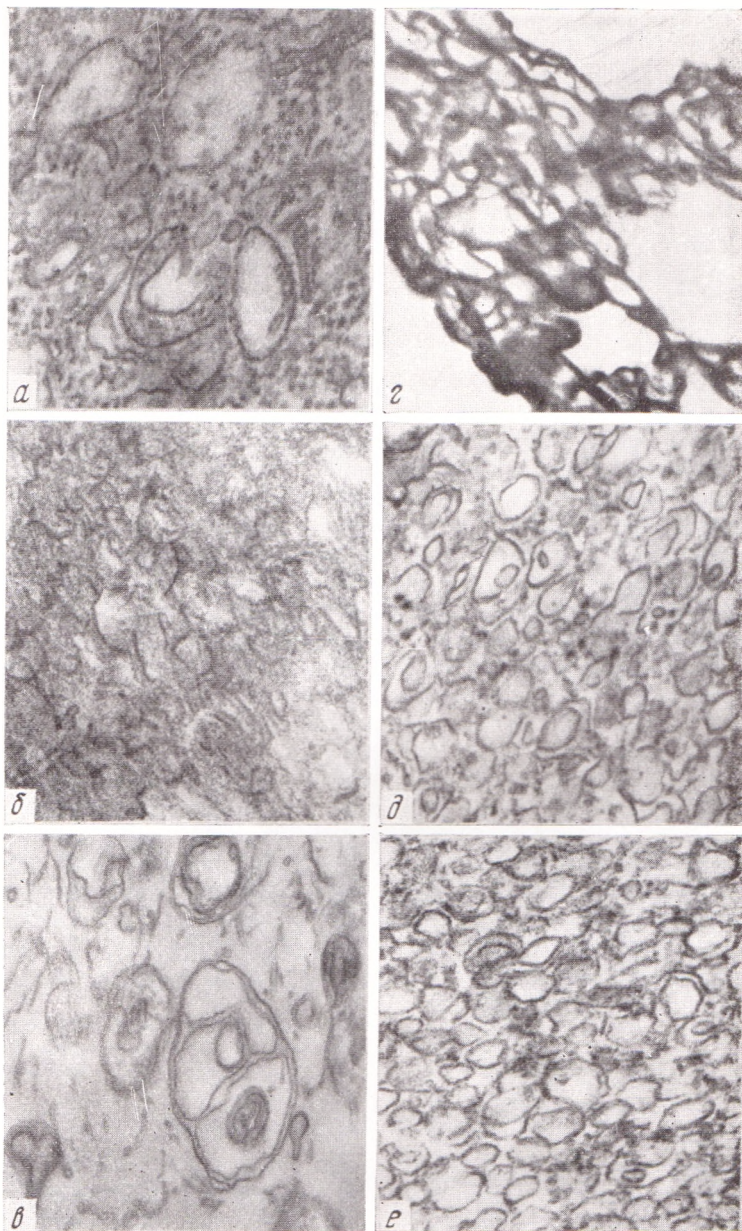


Рис. 1. Электронные микрофотографии микросомных пузырьков и реконструированных мембран. *a* — микросомная фракция, 70 000 $\times$; *b* — фракция «теней» микросомных пузырьков, 70 000 $\times$; *c* — фракция липосом, 22 000 $\times$; *г* — фракция осадок «солюбилизата» (самосборка), 70 000 $\times$; *д* — фракция «тени»+«солюбилизат» (встраивание в специфичную матрицу), 70 000 $\times$; *е* — фракция липосомы+«солюбилизат» (встраивание в неспецифичную матрицу), 70 000 $\times$

Таблица 1

Активность редуктаз и гидроксилаз во фракциях, полученных при реконструкции мембран (*a* — нмоль·мг⁻¹·мин⁻¹, *b* — валовый выход, нмоль·мин⁻¹)

Показатели		Фракция					
		1	2	3	4	5	6
НАДФ-Н-зависимое <i>n</i> -гидроксилирование анилина	<i>a</i>	0,64		0,40	0,70	0,070	0,065
	<i>b</i>			33	34	2,9	2,6
НАДФ-Н-зависимое N-деметилирование ДМА	<i>a</i>	11		6,1	9,6	2,1	1,7
	<i>b</i>			510	490	90	67
НАДФ-Н-зависимое <i>n</i> -гидроксилирование ДМА	<i>a</i>	0,060		0,076	0,10	0,030	0,029
	<i>b</i>			6,3	4,8	1,2	1,1
НАДФ-Н-зависимое N-деметилирование ДМА	<i>a</i>	0,88		0,81	0,92	0,61	0,49
	<i>b</i>			70	47	26	20

о связывании флавопротеидов с реконструированными мембранами, показал, что лишь в случае НАДФ-Н-специфичного флавопротеида имеет место добавочное встраивание. Общий выход активности этого фермента во фракции «тени» + «солюбилизат» (фракция 3) гораздо выше, чем величины, получаемые в результате суммирования общих выходов активности данного фермента во фракциях 4 («тени») и 5 (осадок «солюбилизата»). При самосборке реконструировалось от 10 до 20% исходной активности НАДФ-Н-зависимого *n*-гидроксилирования анилина и N-деметилирования ДМА (табл. 1). В случае НАДФ-Н-зависимого *n*-гидроксилирования анилина при самосборке реконструировалось около 25%, а N-деметилирующей активности — гораздо больше, до 55% от исходного уровня. Встраивание переносчиков в мембраны «теней» микросомных пузырьков не сопровождалось реконструкцией гидроксилазных систем. Это можно объяснить тем, что конечный компонент всех систем гидроксилирования, цитохром P450, не встраивается в «тени» мембран эндоплазматического ретикулула.

Таким образом, мембранные белки-ферменты обладают различным сродством к тем биологическим мембранам, из которых они получены. Одни из них, как, например, НАДФ-Н-специфичный флавопротеид и цитохром b₅, встраиваются в «тени» микросомных мембран, другие — НАДФ-Н-специфичный флавопротеид и цитохром P450 — в эти мембраны не встраиваются. И те, и другие ферменты связываются с липосомами и входят в состав комплексов, формирующихся в результате самосборки.

Второй Московский государственный
медицинский институт
им. Н. И. Пирогова

Поступило
3 IX 1973

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ P. C. Hinkle, J. J. Kim, E. Racker, J. Biol. Chem., **247**, 1338 (1972). ² A. Y. Lu, H. Kuntzman et al., J. Biol. Chem., **247**, 1727 (1972). ³ M. Rogers, P. Strittmatter, J. Biol. Chem., **248**, 800 (1973). ⁴ P. Strittmatter, J. Rogers, L. Spatz, J. Biol. Chem., **247**, 7188 (1972). ⁵ А. И. Арчаков, В. М. Девиченский и др., Биохимия, **33**, 479 (1968). ⁶ O. H. Lowry, H. J. Rosenbrough et al., J. Biol. Chem., **193**, 265 (1951). ⁷ P. S. Chen, J. Toribara, H. Warner, Anal. Chem., **28**, 1756 (1956). ⁸ А. С. Спирин, Биохимия, **23**, 656 (1958). ⁹ T. Omura, R. Sato, J. Biol. Chem., **239**, 2370 (1964). ¹⁰ G. Dallner, Acta Pathol. Microbiol. Scand. Suppl., **166** (1963). ¹¹ T. Roerig, S. Mascaro, Arch. Biochem. and Biophys., **153**, 475 (1972). ¹² J. Hilton, A. C. Sartorelli, J. Biol. Chem., **245**, 4187 (1970). ¹³ А. И. Арчаков, Л. Ф. Панченко и др., Биохимия, **34**, 604 (1969). ¹⁴ A. D. Bangham, Progr. Biophys. Mol. Biol., **18**, 29 (1968).