

УДК 577.3

БИОХИМИЯ

С. В. КОНЕВ, И. М. ОКУНЬ, С. Л. АКСЕНЦЕВ,
Г. Д. НИСЕНБАУМ, Р. Д. АДЗЕРИХО

КОНФОРМАЦИОННЫЕ ПЕРЕХОДЫ В МЕМБРАНАХ ЭРИТРОЦИТОВ ПРИ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИ УМЕРЕННЫХ ТЕМПЕРАТУРАХ

(Представлено академиком А. Н. Белозерским 9 XI 1971)

Одним из возможных механизмов авторегуляции в клетке могут быть кооперативные структурные переходы в системе цитоплазматических мембран ⁽¹⁾. Удобным приемом для выявления таких переходов служит изучение зависимости конформационного состояния мембран от температуры в физиологически умеренном интервале. В литературе имеется ограниченное число работ, в которых физическими методами зарегистрированы температурно-контролируемые кооперативные переходы как в intactных клетках ^(2, 3), так и в изолированных мембранах ⁽⁴⁻⁷⁾.

В настоящей работе исследовалась температурная зависимость конформации изолированных эритроцитарных мембран с помощью фотохемилюминесценции (ф.х.л.), параметры которой чувствительны к структурным перестройкам в белках ⁽⁸⁻¹⁰⁾ и белок-липидных комплексах ⁽¹¹⁾. Параллельно проводилось измерение температурной зависимости взаимодействия мембран с дезоксихолатом натрия и осмотической резистентности intactных эритроцитов. Использовались эритроцитарные мембраны, выделенные из бычьей крови методом Доджа и Митчела ⁽¹²⁾.

Установка и методика проведения фотохемилюминесцентных измерений описана в работе ⁽⁸⁾. Мембраны прединкубировались в течение 5 мин. при температуре у.-ф. облучения и измерения ф.х.л. Кинетика растворения мембран дезоксихолатом натрия и гемолиза эритроцитов в гипотоническом растворе регистрировалась по уменьшению оптических плотностей суспензий при λ 620 мμ на установке, состоящей из спектрофотометра VSU-2P с термостатируемой кюветой и электронного потенциометра ЭППВ-60-МЗ. Температура контролировалась непосредственно в измерительной кювете с точностью до 0,5°.

На рис. 1А представлены зависимости (в аррениусовских координатах) константы скорости экспоненциального затухания интенсивности ф.х.л. белков в составе мембран. Из рис. 1А видно, что в интервалах 5—17° и 19—40° хорошо выполняется уравнение Аррениуса. Однако при температуре около 18° происходит резкое изменение энергии активации процесса ф.х.л. Подобный излом наблюдался нами ранее ^(1, 10) у белков в растворе при температурно-контролируемых конформационных переходах, зарегистрированных рядом независимых физических и энзимологических методов, что свидетельствует в пользу конформационной природы излома кривой на рис. 1, т. е. структурного перехода в мембране при 17—18°. Можно предположить, что при той же температуре должны измениться мембранные функции и целого intactного эритроцита. В наших опытах исследовалась температурная зависимость осмотической резистентности суспензий эритроцитов, отмытых от плазмы. При всех температурах кинетика гемо-

лиза носила двухфазный характер: быстрое уменьшение оптической плотности суспензии сменялось гораздо более медленным процессом. Не касаясь природы двухфазности гемолиза, отметим, что наиболее удобным и хорошо воспроизводимым критерием степени гемолиза оказалась величина оптической плотности, которая пропорциональна количеству негемолизированных эритроцитов. (Измерения производились на том участке кинетической кривой, где падение плотности практически прекращалось. При всех

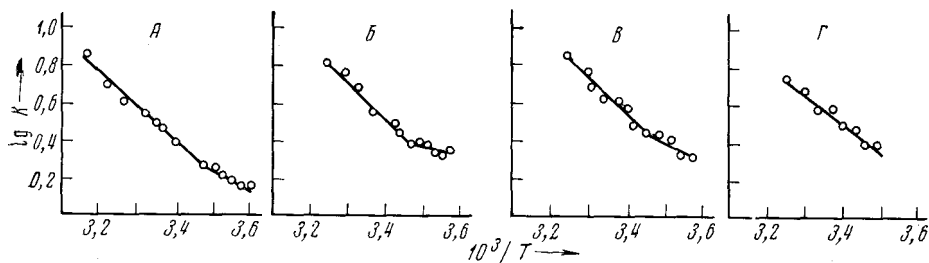


Рис. 1

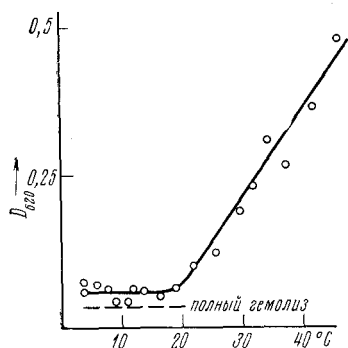


Рис. 2

Рис. 1. Зависимость от температуры константы скорости затухания ф.х.л. нативных эритроцитарных мембран (фосфатный буфер, рН 7,4 (А), после 10-минутного кипячения (Б), обработки 0,5% додецилсульфатом натрия (В) и 32 мМ дезоксихолатом натрия (Г))

Рис. 2. Влияние температуры на осмотическую резистентность эритроцитов, отмытых от плазмы. Гемолиз производился в гипотоничном растворе (201 мосм) стандартной среды для бычьих эритроцитов⁽¹⁶⁾

температурах исходная концентрация эритроцитов и оптическая плотность были одинаковыми, а гемолиз не был полным.)

Таким образом, осмотическая резистентность эритроцитов при разных температурах оценивалась по доле негемолизированных клеток при одинаковой гипотоничности среды. Как следует из рис. 2, резистентность эритроцитов, оставаясь неизменной от 3 до 17—19°, резко растет при дальнейшем повышении температуры, и на кривой $D_{520} = f(t^0)$ наблюдается отчетливый излом. При этом весьма существенно, что изломы на кривых температурной зависимости ф.х.л., отражающей структурное состояние мембран, и гемолиза, связанного с проницаемостью мембран, находятся в одном и том же температурном интервале. Недавно, исследуя действие бутадиола на эритроциты, Барт и Грин обнаружили сигмовидность температурной зависимости проницаемости для натрия и осмотической резистентности при 17—20°⁽¹³⁾. Можно предположить, что в основе резкого изменения функций эритроцитов лежит кооперативный структурный переход в их мембранах.

Еще одно подтверждение конформационной природы изломов было получено в опытах, в которых изучалась устойчивость изолированных эритроцитарных мембран к дезоксихолату натрия (DOX Na). Кинетика действия DOX Na на мембрану (рис. 3) включает в себя резкое уменьшение оптической плотности в течение нескольких секунд (быстрая компонента) и медленное падение плотности, длящееся до одного часа (медленная компонента). Быстрая стадия реакции дезоксихолата с мембранами из-за ее кратковременности при большой амплитуде (30—40% уменьшения оптической плотности) вряд ли обусловлена обычным растворением и скорее всего связана с изменением объема либо с фрагментацией теней эритроци-

тов. Медленная компонента по своим кинетическим параметрам и условиям опыта должна отражать истинное растворение, поскольку, по литературным данным, использованные нами концентрации дезоксихолата действительно растворяют мембраны приблизительно за то же время. Устойчивость мембран определяли по величине изменения оптической плотности $\Delta D / D_0$, где D_0 — исходная плотность суспензии на стадии быстрой компоненты, и по величине обратной $\tau_{1/2}$, пропорциональной средней скорости растворения. ($\tau_{1/2}$ — время, за которое плотность суспензии (D) на

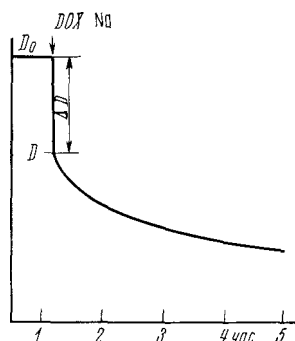


Рис. 3. Кинетика взаимодействия мембран с 10 мМ дезоксихолатом натрия

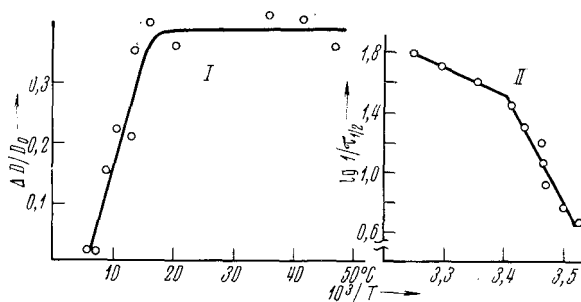


Рис. 4. Зависимость от температуры быстрой (I) и медленной (II) фаз реакции дезоксихолата натрия с мембранами

стадии медленной компоненты уменьшалась в 2 раза). На рис. 4 приведены зависимости $\Delta D / D_0 = f(t^0)$ и $\lg 1 / \tau_{1/2} = f(1 / T)$. И здесь на кривых заметны изломы при 18—20°. Тот факт, что и медленная, и быстрая компоненты скачкообразно изменяются при той же температуре, что и параметры гемолиза и ф.х.л., еще раз свидетельствует о структурной природе обнаруженных эффектов.

Следовательно, давно известное, но мало понятное явление ослабления осмотического гемолиза при повышении температуры обусловлено кооперативным конформационным переходом мембраны, а не выходом ионов калия из клетки (¹⁴) или другими причинами (¹⁵). Подобное утверждение тем более вероятно, что увеличение температуры усиливает гидрофобные взаимодействия, играющие важную роль в поддержании целостности мембран.

Перейдем теперь к обсуждению вопроса о возможной молекулярной природе структурного перехода. Кажется логичным, что за температурную перестройку мембраны ответственны ее белок-липидные комплексы (¹). Для того чтобы выяснить, как влияет на наблюдавшийся переход нарушение белок-липидных взаимодействий, мембраны подвергались тепловой денатурации и обработке детергентами. Десятиминутное кипячение суспензии мембран не устранило излома на аррениусовской кривой константы скорости затухания ф.х.л., хотя и изменило энергию активации свечения низкотемпературной ветви (рис. 1 Б). Малоэффективным оказался и додецилсульфат натрия (рис. 1 В). В противоположность этому дезоксихолат натрия полностью спрямлял аррениусовскую зависимость ф.х.л. (рис. 1 Г). Поскольку из всех применявшихся агентов лишь дезоксихолат натрия был способен практически полностью диссоциировать белок-липидные комплексы и тем самым свести к нулю взаимодействия между белками и липидами, можно думать, что именно эти партнеры и определяют способность эритроцитарных мембран к кооперативным структурным переходам. По-видимому, нагревание и додецилсульфат натрия не могли лишить мембрану конформационной подвижности как раз потому, что они не разрывали, а лишь модифицировали белок-липидные ансамбли. В самом

деле, хорошо известно, что мембрана наиболее эффективно распадается на молекулярные компоненты под влиянием неионных детергентов, в то время как ионные детергенты и нагревание значительно менее эффективны.

Характерно, что ф.х.л. мембран, высвечиваемая белком и отражающая его конформацию, скачкообразно меняется при монотонном повышении температуры только при сохранности белок-липидных комплексов. В этой же системе резкие изменения ф.х.л. исчезают после пространственного разделения компонент.

Таким образом, полученные результаты находятся в соответствии с высказанной ранее гипотезой о функциональной роли кооперативных структурных переходов в цитоплазматических мембранах (1).

Лаборатория биофизики и изотопов
Академии наук БССР
Минск

Поступило
26 X 1971

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- 1 С. В. Конев, С. Л. Аксенцев, Е. А. Черницкий, Кооперативные переходы белков в клетке, Минск, 1970. 2 Е. А. Черницкий, Е. И. Лин, С. В. Конев, Биофизика, 14, 6, 1023 (1969). 3 С. В. Конев, Е. А. Черницкий и др., Докл. АН БССР, 14, 1, 68 (1970). 4 J. C. Reinert, J. Stein, Science, 168, 1580 (1970). 5 D. Melchior, H. Morowitz et al., Biochim. et biophys. acta, 219, 114 (1970). 6 Б. Анцаев, В. К. Колтовер и др., ДАН, 196, № 4, 969 (1971). 7 D. Davis, G. Inesi, Biochim. et biophys. acta, 241, 1 (1971). 8 Г. Д. Нисенбаум, С. Л. Аксенцев, С. В. Конев, Биофизика, 13, 1, 138 (1968). 9 Г. Д. Нисенбаум, С. Л. Аксенцев, С. В. Конев, Биофизика, 14, 3, 402 (1969). 10 С. Л. Аксенцев, Г. Д. Нисенбаум и др., Молекулярная биология, 4, 2, 184 (1970). 11 С. В. Конев, Г. Д. Нисенбаум и др., Биофизика, 16, 1, 19 (1971). 12 G. Dodge, C. Mitchell, D. Hanahan, Arch. biochem. et biophys., 100, 119 (1963). 13 D. H. Burt, J. W. Green, Biochim. et biophys. acta, 225, 46 (1971). 14 R. Seeman, T. Sauks et al., Biochim. et biophys. acta, 183, 476 (1969). 15 Z. Stolzmann, J. Chmiel, H. Karon, Bull. Soc. amis sci. et letters Posnan, C, 7, 33 (1957). 16 R. Farwer, R. Macey, Biochim. et biophys. acta, 196, 53 (1970).