

Г. А. ДЕБОРИН, А. Д. СОРОКИНА, А. М. ТОНГУР, И. И. ФИЛИПОВИЧ

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ МОНОСЛОЕВ ЛЕЦИТИНА С РИБОСОМАМИ ИЗ ПРОРОСТКОВ ГОРОХА

(Представлено академиком А. И. Опариным 15 XII 1971)

Изучение взаимодействий фосфолипидных монослоев на границе раздела жидкость — воздух с биологически активными веществами и влияние на него различных физических и химических факторов приобретает все большее значение в связи с исследованием биологических мембран. Такой интерес связан с исключительно важной ролью фосфолипидов в естественных мембранах как в структурном, так и в функциональном отношении, и с возможностью моделировать некоторые процессы. Фосфолипидные пленки различного состава и упаковки, подвергшиеся определенному воздействию, способны взаимодействовать с белками и нуклеопротеидами. Так, в работах Тиффани и Блоха (¹) миксо- и парамиксовирусы (инфлюэнца A_2) адсорбировались на мономолекулярной пленке фосфатидилхолина только в случае модификации ее белком. Проникновение α -токсина стафилококка в монослой яичного лецитина, по данным Букелева и Колачичко (²), происходило только в присутствии белка, концентрировавшегося в гипофазе. Нами было показано, что монослой фосфолипидов, предварительно обработанные ультразвуковыми волнами, становятся доступными для взаимодействия с палочковидным вирусом табачной мозаики (³).

Изучение свойств фосфолипидных монослоев и их способности к взаимодействиям с нуклеопротеидами имело самостоятельное значение для выяснения поведения нуклеопротеидов на границах раздела фаз. В настоящее время появляется все больше данных об участии фосфолипидов в прикреплении рибосом к внутренним мембранам клетки. Вопрос о том, каким образом полисомы связаны с мембраной, является дискуссионным. Есть представление, что рибосомы прикрепляются к мембране большой субчастицей (⁴). Наряду с этим не исключается участие в прикреплении к мембране иРНК (⁵) и насцентных белков (⁶). В работах Тата и Дальнера с сотрудниками (⁷⁻⁸) указывается на то, что через фосфолипиды рибосомы связываются с мембранами, и синтезируемые белки также способны к специфическому связыванию с фосфолипидами. В этой связи представляло интерес исследовать взаимодействие рибосом с модельной фосфолипидной мембраной.

В работе использовали лецитин, полученный разделением фосфолипидов из желтков куриных яиц (⁹). Раствор лецитина в бензоле предварительно подвергали озвучиванию на пьезокварцевом генераторе * (частота ультразвуковых волн 850 кГц, интенсивность 6—8 Вт/см²) в течение 45 мин. на холоду, в атмосфере гелия. Растворенный в бензоле лецитин (0,045 мг) наносили из микрошприца на водную поверхность кюветы Лангмюра. При этом бензол быстро испарялся, и на поверхности оставалась только пленка лецитина. Подкладкой служил 0,01 М раствор $MgCl_2$.

* Выражаем глубокую благодарность лаборатории ультразвука Института химической физики АН СССР за предоставленную возможность озвучивать наши препараты.

Цитоплазматические 80S рибосомы выделяли из 15-дневных проростков гороха сорта «Победитель», очищали в линейном градиенте плотности сахарозы (5–20%), как описано ранее (¹⁰), суспендировали 2,6 мг белка в 1 мл 5% раствора сахарозы в трис-HCl буфере при pH 7,6, содержащего 0,01 M MgCl₂ и 0,01 M KCl. Суспензию рибосом вводили с помощью пипетки в объем подкладки в отсутствие пленки и под пленку лецитина. В течение 30 мин. рибосомы свободно диффундировали, а затем снималась изотерма сжатия — растяжения пленки. Поверхностное давление измеряли на весах Вильгельми. О взаимодействии рибосом с лецитиновым монослоем судили по увеличению давления пленки и на основании электронной микроскопии.

Для электронной микроскопии лецитиновый монослой, в который из объема подкладки внедрялись рибосомы, снимали непосредственно с поверхности кюветы Лангмюра нанесением электронномикроскопиче с к и х сеточек с формваровой пленкой, укрепленных углем. Рибосомы на монослой оттеняли напылением сплавом платины с иридием под углом 8–10° и препараты просматривали в электронном микроскопе ДЖЕМ-7А при электронно-оптическом увеличении 30 000. Поскольку сеточки наносили на монослой, а снимая, их переворачивали, то снимки дают вид со стороны жидкой фазы.

На рис. 1 приведены изотермы сжатия — растяжения монослоев лецитина. Как видно на рисунке (кривые 1 и 2), изотермы сжатия-растяжения пленок незвученного лецитина и лецитиновых пленок с введенными под них рибосомами совпадают по форме и положению на графике, имеют одинаковый наклон к оси абсцисс и близкие значения максимальных давлений. На этом основании можно предположить, что рибосомы не внедряются в поверхностную пленку незвученного лецитина.

На электронномикроскопических снимках таких пленок видны одиночные рибосомы, находящиеся под монослоем со стороны жидкой фазы (рис. 2а). Очевидно, рибосомы не проникают в пленку незвученного лецитина. Аналогичные наблюдения были сделаны и другими авторами при изучении взаимодействий фосфолипидных монослоев с некоторыми белками и токсинами белковой природы. По данным Гвинна (¹¹), цитохром С не проникал в фосфолипидный монослой, и только в специально созданных условиях происходило такое взаимодействие. Авторы пред-

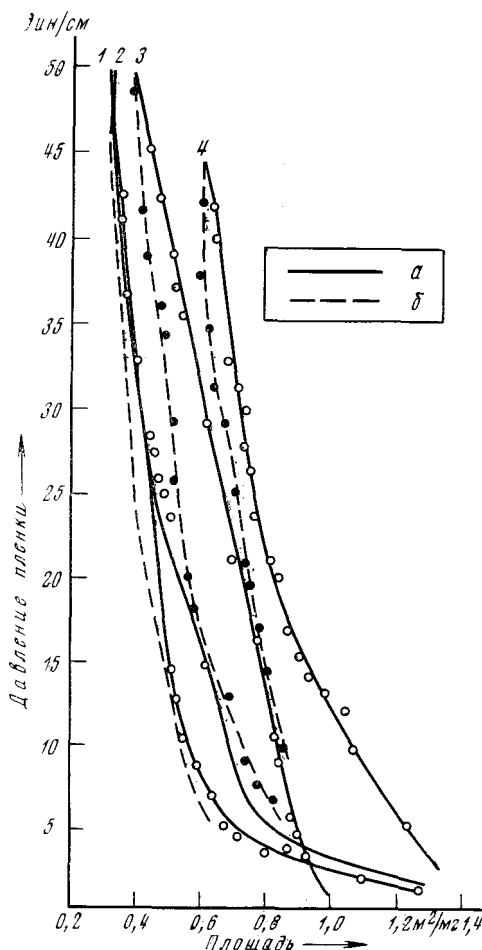


Рис. 1. Изотермы сжатия — растяжения монослоев лецитина. а — сжатие, б — растяжение. 1 — монослой незвученного лецитина, 2 — то же с рибосомами, 3 — монослой озвученного лецитина, 4 — смешанный монослой озвученного лецитина и рибосом

полагают возникновение при этом электростатических и ван-дер-ваальсовых связей, но не отрицают возможности гидрофобных взаимодействий между белком и фосфолипидными молекулами (рис. 2, см. вкл. к стр. 471).

В отсутствие лецитинового монослоя на чистой поверхности раствора 0,01 М $MgCl_2$ сами рибосомы пленки не образовывали: измерениями поверхностного давления обнаружить пленку рибосом на границе раздела фаз не удавалось. Однако при электронномикроскопических исследованиях оказалось, что рибосом на поверхности раздела фаз довольно много. Некоторые из них, по-видимому под действием поверхностных сил, соединились вместе, образовав небольшие агрегаты по 2—4 рибосомы вместе (рис. 2б). В контрольном препарате, когда суспензию рибосом наносили непосредственно на сеточку, такой картины не наблюдалось, рибосомы были одиночными, с хорошо очерченными краями. По-видимому, свободно диффундируя из объема подкладки, рибосомы не образуют пленки на границе раздела фаз, так как не претерпевают структурных изменений, приводящих к возникновению поверхностной активности. При сжатии поверхности барьером они, вероятно, вновь переходят в подкладку.

Иными свойствами обладал монослой лецитина, предварительно обработанного ультразвуковыми волнами. Измерения поверхностного давления пленок озвученного лецитина с введенными в подкладку рибосомами показали возможность образования смешанного монослоя. Соответствующая изотерма сжатия — растяжения на графике была смещена в сторону больших площадей, занимаемых смешанной пленкой лецитин-рибосомы, по сравнению с чистым озвученным лецитином. Кроме того, как видно на рис. 2б, изотерма не имела газовой фазы, что свидетельствует об увеличении количества частиц в пленке. При этом возможно, что в результате взаимодействия с пленкой озвученного лецитина сами рибосомы претерпевают определенные структурные превращения, приводящие к изменению их поверхностной активности.

По электронным микрофотографиям также можно судить о внедрении рибосом в монослой озвученного лецитина (рис. 2в). На снимке видны рибосомы, не прошедшие через пленку озвученного лецитина, но, по-видимому, закрепленные на ней. Количество таких рибосом значительно больше, чем в случае неозвученного лецитинового монослоя. Наряду с этим наблюдалось появление сильной бугристости пленки, которая может быть вызвана проникновением рибосом в монослой. При взаимодействии с монослоем рибосомы, возможно, утратили свою первоначальную структуру. Эти наблюдения согласуются с данными измерения поверхностного давления, свидетельствующими об увеличении площади, занимаемой смешанным монослоем.

Для анализа изменений лецитина, происходящих под действием ультразвука, были сделаны электронные микрофотографии монослоев неозвученного и озвученного лецитина. Монослой лецитина растягивали на солевой подкладке, содержащей 1% фосфорно-вольфрамовой кислоты при pH 5,5. Затем образцы наносили на сеточки и после высушивания при комнатной температуре их просматривали в электронном микроскопе при тех же условиях. На соответствующих снимках гидрофильные участки лецитина, окрашенные фосфорно-вольфрамовой кислотой, — черные, а гидрофобные — белые. На снимках монослоя озвученного лецитина можно видеть иное распределение окрашенных участков по сравнению с монослоем неозвученного лецитина (рис. 2г, д). По-видимому, под действием ультразвуковых волн происходит перераспределение гидрофильных и гидрофобных участков лецитина в монослое, что приводит к изменению свойств монослоя и появлению у него способности взаимодействовать с рибосомами. Аналогичное явление мы наблюдали в предыдущей работе с ВТМ⁽³⁾.

Поскольку условия озвучивания бензольного раствора лецитина

в атмосфере гелия на холоду исключали возможность ультразвуковых химических процессов (¹²), то полученные изменения, по-видимому, связаны со структурными превращениями лецитина в поле ультразвука. В результате этого в молекулах лецитина может происходить «обнажение» новых активных участков, по-видимому, в гидрофильной части молекул лецитина, обращенной к жидкой фазе и доступной для взаимодействия с нуклеопротеидами.

Институт биохимии им. А. Н. Баха
Академии наук СССР
Москва

Поступило
15 XII 1971

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ H. A. Blougen, J. M. Tiffany, FEBS. Abstract of Communications, Varna, p. 204 (1971). ² A. R. Buckelew, Jr. G. Colaccicco, Biochim. et biophys. acta, **233**, 7 (1971). ³ Г. А. Деборин, И. Е. Эльпинер и др., ДАН, **198**, № 6 (1971). ⁴ D. D. Sabatini, J. Tashiro, G. E. Palade, J. Mol. Biol., **19**, 503 (1966). ⁵ M. Rosbach, S. Peñman, J. Mol. Biol., **59**, 227 (1971). ⁶ R. R. Adelman, G. Blobel, D. Sabatini, J. Cell. Biol., **47**, 2 (1970). ⁷ J. R. Tata, Biochem. J., **105**, 783 (1967). ⁸ G. Dallner, P. Siekevitz, G. E. Palade, J. Cell. Biol., **30**, 1, 97 (1966). ⁹ D. N. Rhodes, C. H. Lea, Biochem. J., **65**, 526 (1967). ¹⁰ E. N. Svetailo, I. I. Philippovich, N. M. Sissakian, J. Mol. Biol., **24**, 405 (1967). ¹¹ P. I. Quinn, R. M. C. Dawson, Biochem. J., **113**, 791 (1969). ¹² И. Е. Эльпинер, Ультразвук. биологическое и физико-химическое действие, М., 1963.