

А. И. АРЧАКОВ, Г. И. БАЧМАНОВА, Л. В. БОРОВЯГИН, И. В. ГАЛУЩЕНКО,
И. И. КАРУЗИНА, Г. П. КУЗНЕЦОВА

САМОСБОРКА МИКРОСОМАЛЬНЫХ МЕМБРАН

(Представлено академиком С. Е. Севериным 11 II 1975)

Ранее нами было показано, что в результате самосборки из солюбилизированных детергентом микросомальных белков и липидов формируются комплексы, обладающие гидроксилазной активностью (¹⁻³). Настоящее исследование преследовало цель повысить эффективность самосборки, используя в качестве контрольных тестов реактивацию цитохрома Р-420 в Р-450, реактивацию гидроксилазных систем и электронно-микроскопический анализ ультраструктурной организации реконструированных мембран.

Исходным материалом для самосборки служила фракция солюбилизата, получаемая из «теней» микросомальных пузырьков печени крыс при обработке их 4% холатом натрия (³). Солюбилизат диализовали при 4° против

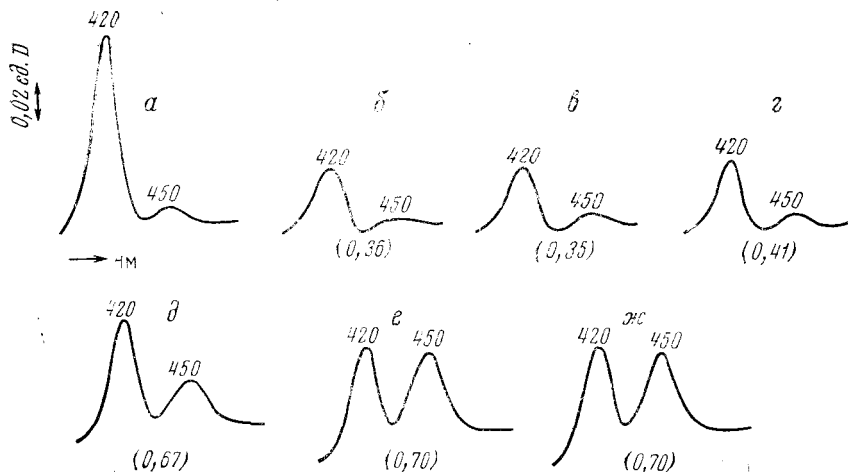


Рис. 1. Реактивация цитохрома Р-450 при диализе. а — солюбилизат, б — ж — цитохромы Р-450 и Р-420 в препаратах, полученных после диализа в течение 0, 2, 5, 12, 24 и 48 час. соответственно. Здесь и на рис. 3 в скобках указан выход мембранного белка (мг) в расчете на 1 мл солюбилизата, содержащего 3,0 мг белка в 1 мл

раствора, содержащего 20мМ трис-НСI-буфер, рН 7,4, 0,2 мМ ЭДТА, 1 мМ дитиотриетол. После диализа реконструированные мембраны пересаживались при 150 000 g в течение 90 мин. Содержание белка, фосфолипидов, цитохромов B_5 , Р-420 и Р-450, активность систем гидроксилирования диметиланилина (ДМА) и систем перекисного окисления ненасыщенных жирных кислот (НЖК) определяли как описано ранее (³). Для ультраструктурного анализа материал фиксировали в среде выделения только 3—5% глутаральдегидом в течение 24—48 час. или с дофиксацией в 1% четырехокиси осмия (1 час) с последующей дегидратацией в водных растворах ацетона и заливкой в эпон-812. Срезы контрастировали уранилацетатом и цитратом свинца (⁴).

Изучалось влияние продолжительности диализа на эффективность реконструкции (рис. 1). В качестве контрольного теста в мембранах измеря-

лось соотношение неактивной (максимум поглощения при 420 нм) и активной (максимум поглощения при 450 нм) форм цитохрома Р-450. В исходном солюбилизате почти весь цитохром находится в своей неактивной форме. Реактивация гемопротейда при удалении детергента во время самосборки наблюдается лишь в первые 24 часа диализа. В дальнейшем соотношение двух форм цитохрома остается постоянным. Реконструированные мембраны содержат значительное количество неактивной формы цитохрома Р-450. Соотношение липид/белок в них равно 1 и существенно не отличается от такового в исходных мембранах — 0,7 (табл. 1). Удаление

Таблица 1

Соотношение фосфолипид/белок, активность систем окисления ДМА и систем перекисного окисления НЖК в «тенях» микросомальных пузырьков, солюбилизате и реконструированных мембранах

Фракция	Соотношение фосфолипид белок	НАДФ-Н-зави- симое N-демети- лирование ДМА	НАДФ-Н-зависимое N-демети- лирование ДМА	НАДФ-Н-зави- симое перекисное окисление НЖК	Аскорбат-зави- симое перекисное окисление НЖК
«Тени»	0,70	12,0	2,0	4,3	4,1
Солюбилизат	0,53	0	0	0	0
Самосборка	1,0	3,5	1,2	2,5	6,0
10% альбумин	0,33	8,8	4,0	5,3	11,3
10% ПВП	0,75	8,8	2,7	5,0	14,7

Примечание. Активность систем деметилирования ДМА и перекисного окисления НЖК рассчитана в нмолях формальдегида и нмолях малонового диальдегида на 1 мг фосфолипида в 1 мин. соответственно.

детергента сопровождается образованием мембранных структур (пузырьков), обнаруживаемых после фиксации альдегидом + осмий (рис. 2в, в'), тогда как при фиксации только альдегидом мембранные структуры выявляются в виде очень коротких фрагментов, а характерные для альдегид-осмиевых фиксаций пузырьки полностью разрушаются (рис. 2г). Исходные мембраны «тепей» имели трехслойное строение при обоих способах фиксации (рис. 2а, б). Рис. 2 см. на вклейке к стр. 959.

На рис. 3 приведены результаты по изучению влияния на процесс реконструкции мембран ионов Mg^{2+} , повышенной ионной силы среды, альбумина (бычий сывороточный альбумин, фракция V, м.в. 40 000, фирма «Sigma») и поливинилпирролидона (ПВП, м.в. 44 000, фирма «BDH»). Отчетливо видно, что при экранировании отрицательного заряда белков и липидов ионами Mg^{2+} и в условиях высокой ионной силы среды резко ухудшается процесс реконструкции. В этих препаратах уменьшается доля активной формы цитохрома Р-450 и не формируются мембранные структуры. В то же время добавление 10% альбумина или ПВП улучшает процесс самосборки мембран. Почти весь цитохром Р-420 переходит в Р-450. Увеличивается валовый выход мембранного материала. Гораздо лучше реактивируются гидроксилазные системы окисления ДМА и системы ферментного и неферментного окисления НЖК (табл. 1).

Соотношение липид/белок в мембранах, реконструированных в присутствии альбумина, резко сдвинуто в пользу белка. Сравнение картин поперечных срезов таких препаратов при только альдегидных и альдегид + осмиевых фиксациях свидетельствуют о том, что альбумин включается как внутрь мембранных пузырьков, так и адсорбируется в поверхностных областях реконструированных мембран. В случае ПВП соотношение липид/белок примерно такое же, как в исходных мембранах и в мембранах, реконструированных без добавок (см. табл. 1). Ультроструктурный анализ мембран, реконструированных в присутствии альбумина и ПВП (рис. 2е, д), показал, что трехслойная организация мембранных пузырьков сохра-

зается только при фиксации препаратов альдегидом + осмией. Только альдегидная фиксация почти не выявляет мембранных пузырьков. Незамкнутые фрагменты мембран трехслойной структуры представляют всю массу материала. Сохранение структуры реконструированных мембран после фиксации глутаральдегидом и четырехокисью осмия и почти полное разрушение мембранных пузырьков после фиксации только альдегидом и последующей дегидратации органическими растворителями свидетельствуют

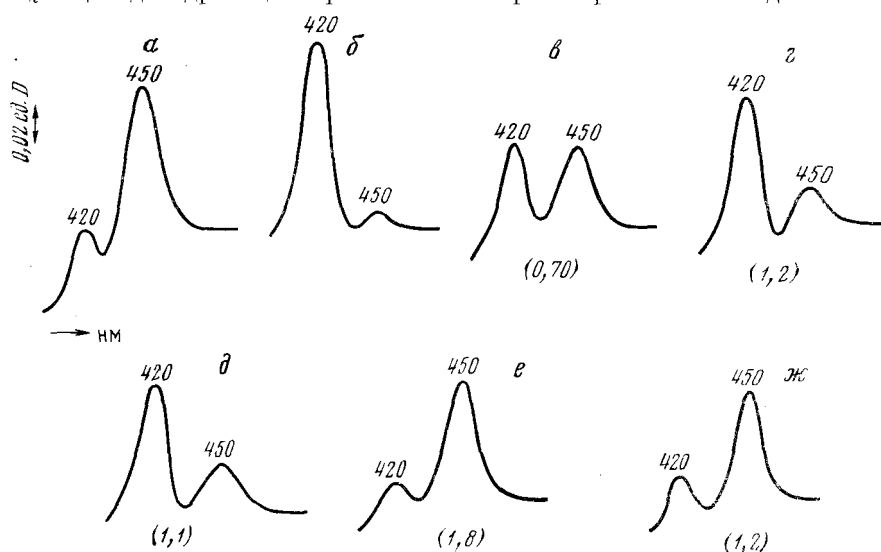


Рис. 3. Цитохромы P-450 и P-420 в «тенях», солюбилизате и реконструированных мембранах. а - «тепи», б - солюбилизат, в - самосборка, г - самосборка в присутствии 5 mM MgCl₂, д - самосборка в присутствии 500 mM KCl, е - самосборка в присутствии 10% альбумина, ж - самосборка в присутствии 10% ПВП

о том, что в основе образующихся мембран лежит бимолекулярный слой липидных молекул, в межфазных областях которого должны быть дискретно локализованы белковые компоненты (⁴). Структура мембран «тепей» сохраняется и при фиксации одним альдегидом. Это свидетельствует о различной молекулярной организации исходных и реконструированных мембран.

Полученные результаты позволяют утверждать, что введение в самособирающуюся систему высоких концентраций альбумина и ПВП увеличивает эффективность встраивания белковых компонентов мембран эндоплазматического ретикулума в липидные бислои реконструируемых мембран.

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

Поступило
10 II 1975

Институт биофизики
Академии наук СССР
Пущино-на-Оке

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ А. И. Арчаков, Г. И. Бачманова и др., ДАН, т. 214, 459 (1974). ² A. I. Archakov, G. I. Bachmanova et al., FEBS Letters, v. 37, 253 (1973). ³ A. I. Archakov, G. I. Bachmanova et al., Biochem. J., v. 144, 1 (1974). ⁴ V. L. Borovjagin, D. A. Moshkov, J. Membrane Biol., v. 13, 245 (1973).