

В. Е. КАГАН, Л. А. СИБЕЛЬДИНА, В. Б. РИТОВ,
В. С. КОБЕЛЕВ, Ю. П. КОЗЛОВ, Л. П. КАЮШИН

**ИЗУЧЕНИЕ БЕЛОК-ЛИПИДНЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ
В МЕМБРАНАХ САРКОПЛАЗМАТИЧЕСКОГО РЕТИКУЛУМА
МЕТОДОМ ПРОТОННОГО МАГНИТНОГО РЕЗОНАНСА
ВЫСОКОГО РАЗРЕШЕНИЯ**

(Представлено академиком С. Е. Севериным 18 II 1975)

В последнее время метод протонного магнитного резонанса (п.м.р.) высокого разрешения успешно применяется для изучения состояния липидов в мембране саркоплазматического ретикулума (с.р.) ⁽¹⁻³⁾. Целью настоящей работы явилось изучение этим методом связи функциональных параметров и структурной организации липидного компонента мембран фрагментов с.р.

Фрагменты с.р. выделяли из белых скелетных мышц кролика по методу ⁽⁴⁾. Поглощение ионов Ca^{2+} , АТФазную активность, пассивный выход ионов Ca^{2+} определяли методом рН-метрии ⁽⁵⁾ и с помощью электрода, чувствительного к ионам Ca^{2+} . Спектры п.м.р. снимали на спектрометре НХ-90Е «Bruker — Physik» с системой фурье-преобразования. Число накоплений в среднем составляло 1000. Замену H_2O на D_2O проводили путем 3-кратного переосаждения суспензии из D_2O -малеатного буфера (10 мМ малеата, рD 7,0). Измерения проводили при температуре 30°; концентрация белка в суспензии фрагментов с.р. составляла обычно 25 мг/мл. Обработку фрагментов с.р. фосфолипазой А (фирма «Calbiochem») и бычьим сычужным альбумином (фирма «Sigma») проводили по методу ⁽⁶⁾. Белок определяли по биуретовой реакции.

На рис. 1а представлены спектры п.м.р. суспензии фрагментов с.р. Разрешенные компоненты спектра могут быть определены как сигналы протонов следующих групп: $-\text{CH}_3$ 1,2 м.д., $-(\text{CH}_2)_n-$ 1,6 м.д., $-\text{CH}_2\text{COO}-$ и $-\text{CH}_2\text{CH}=\text{}$ в области 2,1–2,6 м.д., $-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$

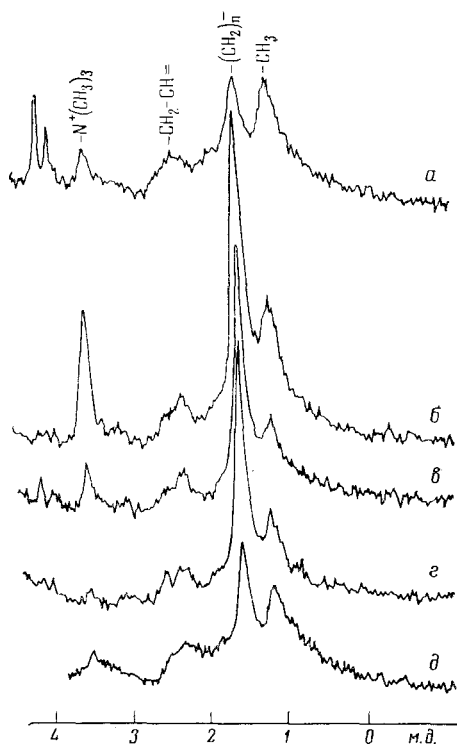


Рис. 1. Спектры п.м.р. мембран фрагментов с.р.: а — нативных, б — обработанных фосфолипазой А (2 мкг в 0,5 мл суспензии), в — обработанных БСА (0,5%) после действия фосфолипазы А; г — обработанных БСА (4,0%) после действия фосфолипазы А; д — после индукции во фрагментах с.р. перекисного окисления липидов системой Fe^{2+} + аскорбат (соответственно 6 мкМ и 0,4 мМ). Во всех случаях сделано 1000 накоплений

3,5 м.д. (относительно внешнего эталона гексаметилдисилоксана). Сигналы п.м.р. в области 3,9–4,2 м.д., вероятно, принадлежат протонам гликолипидов.

Значения полуширины резонансных сигналов протонов идентифицированных групп $-\text{CH}_3$, $-(\text{CH}_2)_n-$, $-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ составляют соответственно 20, 13 и 10 гц, что согласуется с данными работ (1, 2). В этой же области наблю-

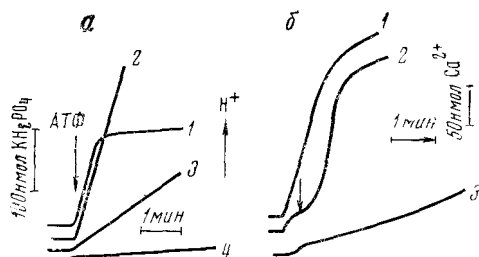


Рис. 2. а – гидролиз АТФ: 1 – нативный фрагмент с.р., 2 – после обработки фосфолипазой А, 3 – при последовательной обработке фосфолипазой А и затем БСА (0,5%), 4 – при последовательной обработке фосфолипазой А и затем БСА (4,0%); б – пассивный выход Ca^{2+} из нативных везикул фрагментов с.р. (3), подвергшихся липоперекислению фрагментов с.р. (1) и после добавления в среду инкубации фосфолипазы А (2) (отмечено стрелкой)

ность Ca^{2+} -зависимой АТФазы (рис. 2), т. е., по-видимому, не нарушает характера белок-липидных взаимодействий в Ca^{2+} -транспортирующей системе. Приближенная оценка показывает, что доля разрешенного сигнала п.м.р. в спектре, составляющая для нативных мембран около 20–30% (1–3), после гидролиза фосфолипидов возрастает приблизительно в два раза (рис. 1б). Вероятно, неразрешенная компонента сигнала п.м.р. нативных мембран обусловлена не только липидами, заторможенными непосредственно взаимодействием с Ca^{2+} -зависимой АТФазой, но и липидами, находящимися в свободных от белка жидкокристаллических областях мембраны. Сопоставление спектров п.м.р. нативных мембран и фрагментов с.р., обработанных фосфолипазой А, показывает, что эти области образованы 20–30% от общего количества липидов в мембране. Следовательно, примерно только 40–50% липидов мембраны принимают непосредственное участие в образовании липопротеидного комплекса Ca^{2+} -зависимой АТФазы, что вполне соответствует данным работы (9), согласно которым очищенная Ca^{2+} -зависимая АТФаза сохраняет активность после удаления 50% фосфолипидов, присутствующих в мембране с.р. Модификация всего 2,5% мембранных фосфолипидов, обусловленная перекисным окислением, увеличивает разрешенность спектра п.м.р. фрагментов с.р. (рис. 1б) и одновременно резко увеличивает пассивную проницаемость мембран фрагментов с.р. для ионов Ca^{2+} (рис. 2б). Как и в случае действия фосфолипазы А, это увеличение проницаемости, по-видимому, связано с дезорганизацией чисто липидных областей (10), хотя при этом нельзя исключить и ослабления белок-липидных взаимодействий в мембране (11).

Ступенчатая экстракция из мембраны с.р. продуктов гидролиза фосфолипидов специально освобожденным от жирных кислот БСА* приводит к потере активности Ca^{2+} -зависимой АТФазы (рис. 2а) и к уменьшению доли неразрешенной компоненты в спектре п.м.р., причем после полного

дается спектр п.м.р. в виде неразрешенной полосы с полушириной линии около 150 гц. Структура спектра п.м.р. фрагментов с.р. свидетельствует о значительной заторможенности движения большей части молекул липидов в мембране. Вклад протонов боковых цепей аминокислотных остатков в спектр п.м.р. нативной мембраны мал (7, 8).

Обработка суспензии фрагментов с.р. фосфолипазой А вплоть до полного гидролиза доступных фосфолипидов (90%) приводит к полному нарушению диффузионного барьера для ионов Ca^{2+} . Существенно, что инкубация фрагментов с.р. с фосфолипазой А практически не оказывает влияния на актив-

* БСА – бычий сывороточный альбумин.

ингибирования АТФазы величина неразрешенной части сигнала составляет около 20% от исходной (рис. 1в, г). При этом интегральная интенсивность разрешенных сигналов протонов $-(CH_2)_n-$ и $-CH_2CH=CH-$ групп углеводородных цепей практически не меняется. Корреляция между величиной АТФазной активности и относительной долей неразрешенной части сигнала в п.м.р. спектре свидетельствует о сильной иммобилизации жирнокислотных цепей Ca^{2+} -зависимой АТФазой. Интересно, что наряду с высокой разрешенностью сигналов п.м.р. углеводородных цепей, остающихся в мембране после экстракции, наблюдается резкое уширение сигнала п.м.р. метильных групп холина. Можно предположить, что такой анизотропный характер молекулярного движения холиновых группировок лецитина возникает при смене гидрофобных белок-липидных взаимодействий на гидрофобные белок-белковые, в результате чего основное взаимодействие белка с липидами осуществляется через полярные триметиламмониевые группировки.

Вызванное блокатором SH-групп — мерсалилом подавление Ca^{2+} -зависимой АТФазы и одновременное резкое увеличение проницаемости фрагментов с.р. для Ca^{2+} сопровождаются существенными изменениями спектра п.м.р. мембран: более чем в 2 раза увеличивается интегральная интенсивность разрешенных сигналов протонов $-(CH_2)_n-$ и $-CH_2CH=CH-$ групп; линия протонов $-N^+(CH_3)_3$ группы резко уширяется (рис. 3а).

Не вызывает сомнений, что ингибирование Ca^{2+} -зависимой АТФазы мерсалилом является результатом блокирования SH-групп в ее активном центре. Вместе с тем, увеличение проницаемости мембраны не является прямым следствием блокирования SH-групп, а связано с ослаблением белок-липидных взаимодействий в областях локализации инактивированной мерсалилом АТФазы. Это, по-видимому, и является причиной увеличения подвижности углеводородных цепей фосфолипидов, молекулярное движение которых в нативной мембране в значительной мере контролируется АТФазой.

В основе нарушения проницаемости мембраны фрагментов с.р. может лежать не только ослабление липид-липидных или белок-липидных взаимодействий, но и появление диффузионного канала исключительно белковой природы. Так, увеличение проницаемости мембраны для ионов Ca^{2+} после обработки фрагментов с.р. ЭДТА при pH 8,5 не сопровождается какими-либо изменениями подвижности полярных и гидрофобных группировок липидов в спектре п.м.р.

Кратковременный (15 мин.) протеолиз фрагментов с.р. трипсином, в результате которого также резко возрастает пассивная проницаемость мембраны (рис. 3б) практически не сказывается на подвижности углеводородных цепей, а приводит к улучшению разрешенности сигнала протонов гид-

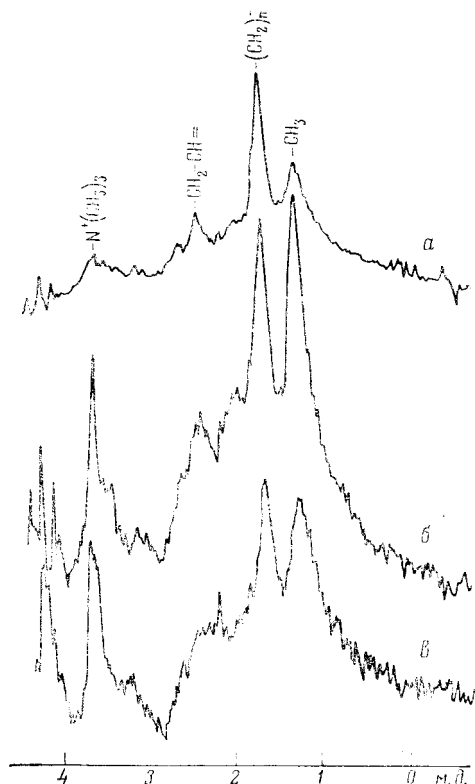


Рис. 3. Спектры п.м.р. фрагментов с.р.: а — обработанных мерсалилом, б — обработанных трипсином в течение 15 мин. (5 мкг в 0,5 мл суспензии), в — обработанных $NaClO_4$ (2 M)

рофильных областей молекул фосфолипидов ($-N^+(CH_3)_3$ и $-CH_2-COO-$) и резкому росту интенсивности сигнала протонов CH_3 -групп, обусловленному увеличением подвижности метильных групп аминокислотных остатков. Поскольку при действии мерсалила или ЭДТА увеличение пассивной проницаемости мембран не сопровождается увеличением подвижности полярных частей молекул фосфолипидов, вполне вероятно, что непосредственной причиной нарушения диффузионного барьера после действия трипсина является усиление молекулярного движения полипептидных цепей, которое объясняет также повышение разрешенности спектра п.м.р. полярных группировок фосфолипидов, связанных в мембране с доступными для трипсина полярными участками белковых молекул. Наличие такой связи подтверждается также результатами, представленными на рис. 3в. Дезорганизация полярных участков белка при разрушении его гидратной оболочки хаотропным агентом (SiO_4^{4-} , 2M) обуславливает практически полное разрешение сигнала протонов холиновой группы, что говорит об отсутствии ограничений для движения полярной головки лецитина в мембране.

Итак, представленные результаты свидетельствуют о существовании в мембране фрагментов с.р. по крайней мере трех типов организации фосфолипидов: малоупорядоченной жидкокристаллической, ответственной за разрешенную часть сигнала в спектре п.м.р. нативного ретикулума (около 25%); жидкокристаллической (безбелковой); упорядоченной в результате белок-липидных взаимодействий. В спектре п.м.р. мембран последние два типа липидных компонентов дают слабо разрешенный сигнал.

Активность Ca^{2+} -зависимой АТФазы не меняется при нарушении жидкокристаллических областей мембраны, тогда как разупорядоченность упаковки жирнокислотных цепей в областях контакта белок — липид делает ее функционирование невозможным.

Другой важный функциональный параметр мембраны фрагментов с.р. — низкая проницаемость для ионов Ca^{2+} — чувствителен к дезорганизации углеводородных цепей как в жидкокристаллических участках, так и в АТФазном комплексе. Следует отметить, что пассивная проницаемость мембраны фрагментов с.р. для Ca^{2+} определяется прежде всего гидрофобными липид-липидными и белок-липидными взаимодействиями и, вероятно, не связана прямо с подвижностью полярных группировок липидов в гидрофильной зоне мембраны. Возникновение проницаемости для ионов Ca^{2+} при воздействии на полярные участки мембраны следует, по-видимому, целиком отнести за счет диффузионных каналов белковой природы.

Московский государственный университет
им. М. В. Ломоносова

Институт биологической физики
Академии наук СССР
Пуццано-на-Оке

Поступило
14 II 1975

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ D. G. Davis, G. Inesi, *Biochim. et biophys. acta*, v. 241, 1 (1971).
- ² D. G. Davis, G. Inesi, *Biochim. et biophys. acta*, v. 282, 180 (1972).
- ³ J. D. Robinson, N. J. M. Birdsell et al., *Biochemistry*, v. 11, 2903 (1972).
- ⁴ A. Martonosi, *J. Biol. Chem.*, v. 243, 71 (1968).
- ⁵ В. Б. Путов, *Биохимия*, т. 36, 393 (1971).
- ⁶ W. Fiehn, W. Hasselbach, *Eur. J. Biochem.*, v. 13, 510 (1973).
- ⁷ D. Chapman, A. Morrison, *J. Biol. Chem.*, v. 241, 5044 (1966).
- ⁸ K. M. Keough, E. Oldfield et al., *Chem. Phys. Lipids*, v. 10, 37 (1973).
- ⁹ G. B. Warren, P. A. Toon et al., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, v. 71, 622 (1974).
- ¹⁰ А. Ф. Поглазов, Ю. А. Владимиров, В кн.: *Физико-химические основы функционирования надмолекулярных структур клетки*, Изд. МГУ, 1974, стр. 64.
- ¹¹ В. Е. Каган, В. Б. Путов и др., Там же, 1974, стр. 89.