

УДК 577.17

БИОФИЗИКА

С. В. КОНЕВ, И. Д. ВОЛОТОВСКИЙ, В. С. ФИНИН

СТРУКТУРНЫЕ ПЕРЕСТРОЙКИ БИОЛОГИЧЕСКИХ МЕМБРАН, ИНДУЦИРУЕМЫЕ ЦИКЛИЧЕСКИМ АМФ

(Представлено академиком Г. М. Франком 28 IV 1975)

В последние годы все большее внимание уделяется роли структурных перестроек биологических мембран в осуществлении и регуляции биохимических и физиологических реакций в клетке (¹⁻⁴).

Регуляторно-значимые перестройки инициируются под влиянием как экзогенных (физиологически-умеренные температуры, свет, электрическое поле и т. д.), так и эндогенных (метаболиты, гормоны, мембранотропные катионы) факторов (^{1, 3-7}). Постепенно становится все более очевидной роль рецепторно-кнопочного управления фундаментальными жизненными функциями (метаболизм, нервномышечная деятельность, дыхание, зрительные и другие рецепторные реакции), которые реализуются через модификацию структуры мембраны, часто протекающую по кооперативному закону.

В то же время широко известна и твердо установлена важнейшая биологическая роль циклических нуклеотидов, и в первую очередь циклического аденозин-3',5'-монофосфата (цАМФ), которые рассматриваются в качестве универсальных трансммиттеров в осуществлении разнообразных биоэффектов при действии многих гормонов и других биологических активных соединений (⁸). Однако конкретный механизм стыковки между цАМФ и последующими биохимическими и физиологическими событиями на уровнях мембран и клеток все еще далек от окончательного разрешения. Можно также отметить загадочный эффект плейотропного и полифункционального действия цАМФ.

Одним из подходов к решению этой проблемы могли бы быть представления о существенной роли структурных перестроек биологических мембран, вызываемых цАМФ.

Выяснению этого вопроса и посвящена настоящая работа.

Исследования выполнялись на изолированных эритроцитарных мембранах человека и синаптосомальных мембранах из коры головного мозга быка. Эритроцитарные мембраны выделялись по методу Доджа с сотр. (⁹), а синаптосомальные — по методу Виттекера (¹⁰). Выделенные мембраны затем суспендировались в 0,075 М растворе NaCl для того, чтобы предотвратить захлопывание пор и образование из мембран замкнутых пузырьков и тем самым исключить эффекты проницаемости, связанные с неравномерным распределением ионов по обе стороны мембраны. В работе использовались циклический аденозин-3',5'-фосфат, «Serva» (ФРГ) и аденозин-3'-фосфат фирмы «Реанал» (Венгрия).

В качестве общепринятых конформационно-чувствительных тестов применялись методы флуоресценции и кругового дихроизма. Измерения

белковой флуоресценции проводились на двухлучевом абсолютном спектрофлуориметре ФИКА-55 (Франция), а кругового дихроизма — на спектрополяриметре «Спектропол-1» со специальной приставкой (Франция). В экспериментах измерялись интенсивность триптофановой флуоресценции, которая отражает величину квантового выхода свечения белков, и полуширина дифференциального спектра, связанная с изменением полуширины и сдвигом спектров люминесценции под влиянием цАМФ. При этом в первый световой канал спектрофлуориметра помещалась контрольная кювета с исходной суспензией мембран (концентрация белка 0,1 мг/мл), а во второй — опытная: мембраны + различные концентрации цАМФ. В случае кругового дихроизма определялась молярная эллиптичность при $\lambda = 222$ нм, в основном отражающая модификацию вторичной структуры белков. Концентрация белка в исследуемых препаратах мембран оценивалась по методу Лоури (¹¹).

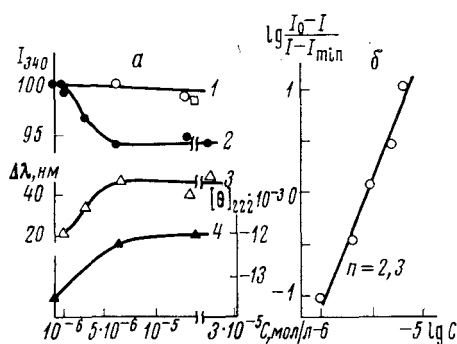


Рис. 1

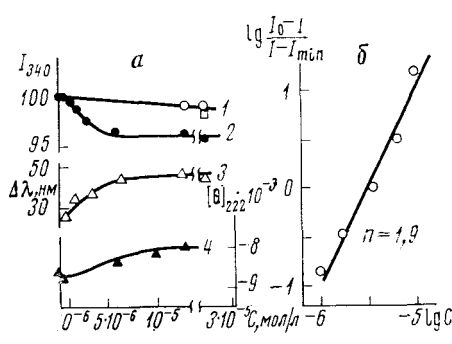


Рис. 2

Рис. 1. *a* — влияние цАМФ на интенсивность (I_{340}) флуоресценции (2), полуширину дифференциального спектра ($\Delta\lambda$) флуоресценции (3) и молярную эллиптичность ($[\theta]_{222}$) (4) эритроцитарных мембран человека; 1 — кривая для денатурированных теплом мембран, четырехугольник под кривой показывает эффективность нециклического АМФ. *б* — точки кривой 2, представленные в координатах Хилла. *с* — концентрация цАМФ, λ возбуждения 288 нм; рН суспензии 6,3; температура 20°

Рис. 2. Влияние цАМФ на параметры флуоресценции и кругового дихроизма синапсомембранных мембран коры головного мозга быка. Обозначения те же, что и на рис. 1

Переходя к изложению экспериментальных данных, прежде всего следует отметить, что как для эритроцитарных, так и синапсомембранных мембран характерны типичные белковые спектры флуоресценции с максимумом при 330–331 нм, что свидетельствует о выраженном гидрофобном характере окружения триптофановых остатков в мембранных белках. На рис. 1*a* представлены зависимости интенсивности и относительной полуширины дифференциального спектра триптофановой флуоресценции мембранных белков теней эритроцитов, а также молярной эллиптичности от концентрации цАМФ. Из рисунка видно, что цАМФ вызывает заметные изменения всех трех регистрируемых параметров. Отмечается быстрое (в течение нескольких секунд) тушение флуоресценции, увеличение полуширины ее спектра и уменьшение молярной эллиптичности. Контрольные измерения показали, что изменения флуоресцентных параметров даже при максимальных концентрациях цАМФ не были обусловлены такими тривиальными оптическими эффектами, как экранировка возбуждающего света, реабсорбция света флуоресценции, светорассеяние и эффект Дюссенса.

Сходным образом снижение молярной эллиптичности не связано с методическими артефактами, возникающими вследствие наложения собственного дихроизма цАМФ и светорассеяния: используемые концентрации

цАМФ не давали никакого «приборного» сигнала, а светорассеяние системы мембраны+цАМФ практически не менялось.

Из рис. 1а видно также, что наблюдаемые эффекты носят специфический характер, поскольку близкий по своей химической структуре нециклический аналог нуклеотида не обладал активностью, свойственной цАМФ. Необходимым условием для наблюдаемого специфического взаимодействия цАМФ — мембрана является ее интактность. Денатурированные теплом мембраны практически инертны к действию циклического мононуклеотида (рис. 1а). Важность интегративной целостности мембран вытекает также из опытов, которые показали, что ультразвуковые фрагменты мембран не чувствительны к действию цАМФ.

Данные, приведенные на рис. 1а, и сказанное выше приводят к определенному выводу о том, что цАМФ действительно вызывает структурную перестройку в интактной эритроцитарной мембране.

Совершенно очевидно, что наблюдаемая перестройка носит генерализованный характер: параметры люминесценции и кругового дихроизма сигнализируют о структурном состоянии всего пула белковых макромолекул в мембране, а не каких-либо отдельных его фракций. Так, коротковолновый сдвиг, уширение спектра, а возможно и тушение флуоресценции, указывают на уменьшение полярности микроокружения вокруг статистически распределенных в пределах всей мембраны триптофанилов, которые представляют собой естественные зонды, чувствительные к конформации белка и белок-липидным взаимодействиям.

В свою очередь, снижение молярной эллиптичности свидетельствует, прежде всего, об уменьшении процента альфа-спирализованных участков в мембранных белках. Обращают на себя внимание и другие факты. Во-первых, структурная перестройка осуществляется в сравнительно узком интервале низких концентраций цАМФ: 10^{-6} — $5 \cdot 10^{-6}$ М. Во-вторых, кривые зависимости интенсивности флуоресценции от концентрации цАМФ имеют выраженную S-образную форму. Это означает, что структурные перестройки мембран осуществляются по кооперативному закону. Дополнительным подтверждением такого вывода служат данные, представленные в координатах Хилла (рис. 1б). Из рисунка следует, что структурная перестройка характеризуется высоким и нецелочисленным значением коэффициента n , которое типично для кооперативных процессов.

Аналогичные результаты были получены и для синаптосомальных мембран (рис. 2).

Таким образом, в настоящей работе получены экспериментальные данные, указывающие на способность цАМФ инициировать генерализованные структурные перестройки в эритроцитарных и синаптосомальных мембранах, которые, как известно, содержат в своем составе цАМФ-связывающие структуры и аденилциклазную систему (¹², ¹³). Вместе с тем остаются открытыми два существенных момента.

1. С какими молекулярными рецепторами, ответственными за инициацию структурной перестройки в мембране, комплексирует цАМФ? Так, например, общепринятым рецептором цАМФ считается регулярная субъединица протеинкиназы (¹⁴). В то же время из мембран эритроцитов выделен рецепторный белок, не обладающий киназной активностью (¹⁵).

2. Каково участие в перестройках контрактильных элементов в мембране, структура которых может меняться при фосфорилировании в результате активации протеинкиназы? Заметим, что в вышеописанных опытах АТФ и ионы магния, необходимые для фосфорилирования контрактильных белков, не добавлялись и эффект воспроизводился на следующий день после выделения мембран, когда концентрация внутримембранной АТФ должна была бы истощиться. Кроме того, «ответ» мембраны на добавление цАМФ наблюдался практически мгновенно, что характерно для структурных, а не биохимических реакций.

В заключение хотелось бы еще раз акцентировать внимание на возможной роли структурных перестроек в мембране как механизме осуществления плейотропного, полифункционального действия цАМФ, в пользу чего свидетельствуют приведенные в настоящей работе экспериментальные данные.

Институт фотобиологии
Академии наук БССР
Минск

Поступило
14 IV 1975

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ С. В. Конев, С. Л. Аксенцев, Е. А. Черницкий, Кооперативные переходы белков в клетке, Минск, 1970. ² J. Raison, Bioenergetics, v. 4, 285 (1973). ³ Симп. Структурная лабильность мембран и ее роль в регуляции функциональной активности клеток, Минск, 1974. ⁴ C. Güller, Ann. Rev. Biophys. Bioeng., v. 1, 51 (1972). ⁵ С. В. Конев, И. М. Окунь и др., ДАН, т. 205, 979 (1972). ⁶ S. Eletr, J. Inesi, Biochim. et biophys. acta, v. 290, 178 (1972). ⁷ Л. Я. Гендель, И. Б. Федорович и др., ДАН, т. 205, 1469 (1972). ⁸ G. Robinson, R. Butcher, E. Sutherland, Cyclic AMP, N. Y. 1971. ⁹ J. Dodge, C. Mitchell, D. Hanahan, Arch. Biochem. Biophys., v. 100, 119 (1963). ¹⁰ V. Wittaker, I. Michaelson, R. Kirkland, Biochem. J., v. 90, 293 (1964). ¹¹ O. Lowry, N. Rosebrough et al., J. Biol. Chem., v. 193, 265 (1951). ¹² J. Kant, T. Steck, Biochem. Biophys. Res. Commun., v. 54, 115 (1973). ¹³ J. Kuo, P. Greengard, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., v. 64, 1349 (1969). ¹⁴ G. Gill, L. Garren, Biochem. Biophys. Res. Commun., v. 39, 335 (1970). ¹⁵ Khe-Ching Yuh, M. Tao, Biochem., v. 13, 5220 (1975).