



УДК 576.36

МЕЖМЕМБРАННЫЙ ПЕРЕНОС БЕЛКОВ МИКРОСОМ
И Na^+, K^+ -АТФ-азы ПЛАЗМАТИЧЕСКОЙ МЕМБРАНЫ*Альтерман М. А., Арчаков А. П., Девиченский В. М.**2 МОЛГМИ им. Н. И. Пирогова, Москва**Карякин А. В.**Институт химической физики Академии наук СССР, Москва**Мирсалихова Н. М.**Институт биохимии Академии наук УзССР, Ташкент*

Липосомы, приготовленные из яичного фосфатидилхолина с низким индексом окисленности, при инкубации с микросомами печени крыс превращаются в протеолипосомы в результате межмембранного переноса цитохрома b_5 , NADH- и NADPH-специфичных флавопротеидов. Окисление остатков ненасыщенных жирных кислот в липосомах приводит к ускорению переноса цитохрома b_5 и к переносу цитохрома Р-450. Инкубация липосом с фрагментами плазматической мембраны клеток из мозгового слоя почек свиньи, предварительно обогащенными до 90% Na^+, K^+ -АТФ-азой, приводит к переносу этого фермента в липосомную фракцию. Перенос Na^+, K^+ -АТФ-азы в мембраны липосом наблюдается и в случае инкубации последних с телями эритроцитов. Скорость межмембранного переноса белков зависит от фосфолипидного состава липосом.

В настоящее время известно о существовании межмембранного переноса не только электронов [1], но также липидов [2] и мембранных белков [3–7]. Межмембранный перенос липидов может протекать, в частности, с помощью специализированных белков-переносчиков, обменивающих фосфолипиды [2]. Относительно межмембранного переноса белков известно, что цитохром b_5 и NADH-специфичный флавопротеид могут переноситься между протеолипосомами [5, 6]. Позднее было показано, что перенос цитохрома b_5 между искусственными мембранами осуществляется через водную фазу [8]. В работе Боума и др. [3] показан перенос белков эритроцитарной мембраны в димиристоил- и дипальмитоилфосфатидилхолиновые липосомы. В настоящее время неизвестны ни механизм переноса мембранных белков, ни факторы, влияющие на скорость этого процесса. В данной работе исследован перенос микросомных белков и Na^+, K^+ -АТФ-азы плазматической мембраны в мембрану липосом.

При инкубации микросом с липосомами, приготовленными из фосфатидилхолина с индексом окисленности 0,1, в мембрану липосом переносится цитохром b_5 — белок, локализованный на наружной поверхности мембран микросом [9] (рис. 1, 1). Цитохром Р-450, который является трансмембранным белком [10], в липосомы в этих условиях не переносится (см. кривую 2).

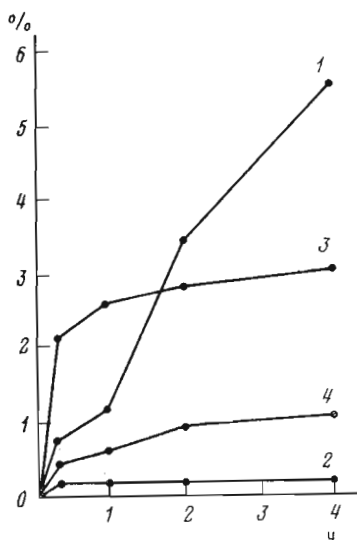


Рис. 1

Рис. 1. Перенос цитохрома b_5 (1), цитохрома P-450 (2), NADPH-специфичного флавопротеида (3), NADH-специфичного флавопротеида (4) из микросом в липосомы (37°C , 100 мМ трис-НСI-буфер, рН 7,4, микросомы — липосомы 1:1, индекс окисленности 0,1). Перенос дан в % от исходного содержания в микросомах

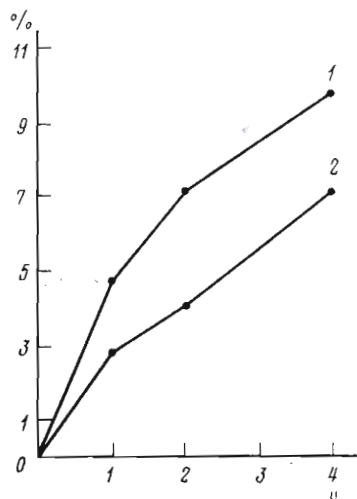


Рис. 2

Рис. 2. Перенос цитохромов b_5 (1) и P-450 (2) между мембранами микросом и липосомами. Условия инкубации как в рис. 1, индекс окисленности 0,55

Что касается NADH- и NADPH-зависимых флавопротеидов, то оценить количественно их переход с мембраны на мембрану сложнее, так как в отличие от цитохромов b_5 и P-450 приходится измерять не содержание ферментов, а их активность. Известно, что инкубация микросом при 37°C сопровождается инактивацией редуктаз [9]. В наших опытах NADPH-зависимый флавопротеид в микросомной фракции инактивировался на 20% за 4 ч. Оценить степень инактивации редуктаз, перенесенных на липосомы, гораздо сложнее.

Флавопротеиды по кинетике переноса на липосомы отличаются от гемопропротеидов. Активность NADPH-цитохром-с-редуктазы во фракции протеолипосом быстро растет и за время инкубации, равное 1 ч, достигает предельного значения, составляющего 3% от исходной активности микросом (без учета инактивации) (см. рис. 1, 3). Перенос NADH-специфичного флавопротеида в липосомы незначителен: за 2 ч он составляет не более 1% от исходного уровня активности в микросомах (см. рис. 1, 4).

Уменьшение соотношения микросомы — липосомы приводит к увеличению переноса в липосомы гемопропротеидов (табл. 1). Однако из-за того, что перенос цитохрома b_5 увеличивается примерно в 4 раза, а перенос цитохрома P-450 — только в 2,5 раза, молярное соотношение цитохром b_5 /цитохром P-450 в образующихся протеолипосомах изменяется от 0,6 до 1,5. Уменьшение рН от 7,4 до 6,4 вызывает сокращение переноса цитохрома b_5 в липосомы, а увеличение рН до 8,3, напротив, несколько активизирует этот перенос.

Введение в инкубационную среду 10 мМ Ca^{2+} приводит к полному ингибированию переноса цитохрома P-450 и к частичному ингибированию переноса цитохрома b_5 (табл. 2). Перенос зависит также от ионной силы среды: с ростом концентрации буфера от 20 до 100 мМ он увеличивается в 2,2 раза, однако при дальнейшем увеличении концентрации буфера до 200 мМ практически не изменяется (см. табл. 2).

Таблица 1

**Влияние соотношения микросом и липосом на перенос белков
в липосомы ***

Состав инкубационной среды		Содержание гемопротеидов в протеолипосомах, % от исходного содержания в микросомах		Соотношение цитохромов $b_5/P-450$, моль/моль
микросомы, мг белка	липосомы, мг фосфолипидов	цитохром b_5	цитохром P-450	
80	10	2,4±0,1	2,4±0,6	0,78
40	10	1,9±0,2	2,5±0,5	0,60
20	10	1,9±0,6	1,6±1,0	0,66
10	10	2,3±0,3	4,0±0,8	0,35
10	20	3,3±0,6	3,5±1,4	0,72
10	40	10,4±2,6	5,9±2,3	1,43
10	60	10,0±3,9	6,0±4,3	1,49

* Инкубация 240 мин, 37° С, 100 мМ трис-НСI-буфер. Результаты усреднены по 4 опытам.

Таблица 2

Зависимость межмембранного переноса белков от ионной силы инкубационной среды и присутствия ионов Ca^{2+} *

Концентрация буфера трис-НСI (рН 7,4), мМ	Содержание цитохрома b_5 в протеолипосомах, % от исходного содержания в микросомах	Содержание цитохрома P-450 в протеолипосомах, % от исходного содержания в микросомах
20	1,8±0,1	—
100	4,0±0,2	1,7±0,1
200	3,4±0,8	—
100 **	2,3±0,4	0

* Инкубация 240 мин, 37° С, соотношение микросомы — липосомы 1 : 1. Результаты усреднены по 3 опытам.

** Инкубационная среда содержала 10 мМ Ca^{2+} .

Таблица 3

Зависимость межмембранного переноса белков от состава липосом *

Состав липосом	Перенос цитохрома b_5 , % от исходного содержания в микросомах	Перенос цитохрома P-450, % от исходного содержания в микросомах
Фосфатидилхолин	19,2±5,4	8,2±1,4
Фосфатидилхолин — холестерин (40%)	11,6±0,3	0
Фосфатидилхолин — лизолецитин (10%)	4,8±0,4	0

* Инкубация 240 мин, 37° С, 100 мМ трис-НСI-буфер, рН 7,4, микросомы — липосомы 1 : 4. Результаты усреднены по 3 опытам.

Наиболее интересные результаты были получены при исследовании влияния, которое оказывает на межмембранный перенос микросомных белков индекс окисленности фосфолипидов липосом. Сравнение данных рис. 1 и 2 показывает, что при увеличении индекса окисленности фосфатидилхолина от 0,1 до 0,55 перенос цитохрома b_5 в липосомы при инкубации в течение 4 ч увеличивается почти вдвое. В этом случае наблюдается перенос и цитохрома P-450; в течение 4 ч на липосомы переносится до

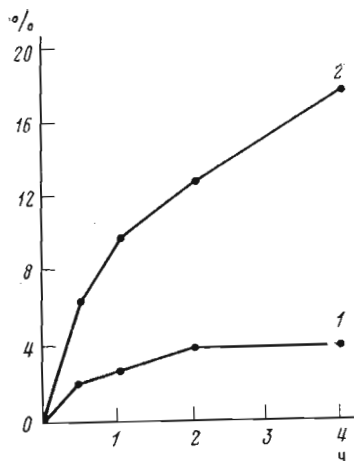


Рис. 3

Рис. 3. Перенос Na^+, K^+ -АТФ-азы (1) и мембранных белков (2) из тейей эритроцитов в фосфатидилхолиновые липосомы

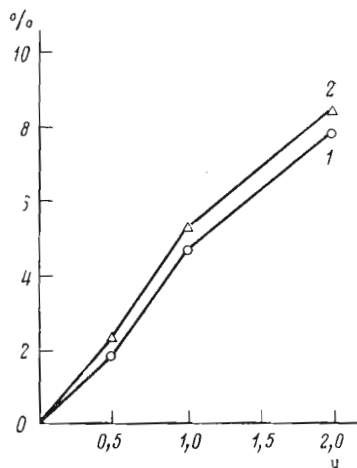


Рис. 4

Рис. 4. Перенос Na^+, K^+ -АТФ-азы, очищенной из плазматической мембраны мозгового слоя почек свиньи, на фосфолипидные липосомы: 1 — активность Na^+, K^+ -АТФ-азы, 2 — белок. Перенос дан в % от исходного содержания в мембранах

7,0% исходного количества гемопротеида в микросомах. Этот эффект, возможно, объясняется изменением вязкости липосомных мембран. Ранее Стриттматеру и др. [11] не удалось наблюдать перенос цитохрома b_5 при инкубации микросом с липосомами, приготовленными из яичного фосфатидилхолина и суммарной фракции микросомных фосфолипидов. Отрицательный результат, полученный этими авторами, можно объяснить, в частности, использованием для приготовления липосом неокисленных липидов. Интересно, что аналогичная картина наблюдается и в случае спонтанного фосфолипидного обмена между липосомами. При использовании для приготовления липосом окисленных фосфолипидов скорость фосфолипидного обмена между ними возрастает [12].

Далее при изучении влияния липидного состава липосом было найдено, что введение 40% холестерина вызывает уменьшение межмембранного переноса цитохрома b_5 почти вдвое, тогда как перенос цитохрома Р-450 при этом ингибируется полностью. Сходные результаты наблюдались при введении в состав липосом до 10% лизолецитина (табл. 3).

Влияние липидного состава липосом было изучено также при исследовании переноса другого мембранного белка — Na^+, K^+ -АТФ-азы. В предварительных опытах было показано, что при 4-часовой инкубации тейей эритроцитов с фосфатидилхолиновыми липосомами на последние переносятся около 4% активности Na^+, K^+ -АТФ-азы и около 20% белка тейей эритроцитов (рис. 3). Поскольку при этом в липосомах удавалось измерить лишь активность, а не содержание фермента, аналогичные опыты были предприняты с мембранами, значительно обогащенными Na^+, K^+ -АТФ-азой.

При инкубации обогащенного препарата Na^+, K^+ -АТФ-азы из мозгового слоя почек свиньи наблюдается одинаковый перенос ферментативной активности и белка (рис. 4). Полученные результаты говорят о том, что в данном случае по активности фермента в липосомах можно судить о его количестве. Отсюда следует, что из эритроцитов помимо Na^+, K^+ -АТФ-азы происходит перенос в липосомы и других мембранных белков. Этот вывод хорошо согласуется с литературными данными [3].

Перенос Na^+ , K^+ -АТФ-азы из обогащенного мембранного препарата
в липосомы различного состава *

Состав липосом	Перенос Na^+ , K^+ -АТФ-азы в липосомы, % от исход- ного уровня в мембранах	
	активность	белок
Фосфатидилхолин	9,5±0,7	10,2±1,0
Фосфатидилхолин – холестерин, 2 : 1 (по весу)	4,1±0,8	4,4±0,7
Фосфатидилхолин – сфингомиелин, 9 : 1 (по весу)	5,0±0,5	5,2±0,5
Фосфатидилхолин – холестерин – сфинго- миелин, 6 : 3 : 1 (по весу)	13,0±2,0	14,0±2,0

* Условия инкубации см. «Экспериментальную часть». Результаты усреднены по 3 опытам.

Перенос Na^+ , K^+ -АТФ-азы на липосомы, содержащие холестерин или сфингомиелин, снижен по сравнению с чисто лецитиновыми липосомами примерно в 2 раза (табл. 4). Ввиду того что пативные мембраны содержат и сфингомиелин и холестерин, было интересно исследовать межмембранный перенос Na^+ , K^+ -АТФ-азы в липосомы, приготовленные из смеси этих липидов. Оказалось, что в этом случае имеет место активация переноса приблизительно в 1,5 раза.

Экспериментальная часть

Микросомную фракцию из печени крыс выделяли по методу, описанному в работе [13]. Эту фракцию, суспендированную в 100 мМ растворе пирогосфата натрия (рН 8,2, содержание белка 10–15 мг/мл), наслаивали на раствор 0,5 М сахарозы и 10 мМ трис-НСI (рН 7,4; 1 : 1) и далее центрифугировали 60 мин при 105 000g на центрифуге «Beckman L5-65» (ротор 35). Отделенный от сорбированного белка препарат суспендировали в 100 мМ трис-НСI-буфере (рН 7,4, содержание белка 15–20 мг/мл).

Препарат Na^+ , K^+ -АТФ-азы получали по методу Иоргенсена [14] из микросомальной фракции мозгового слоя почек свиньи с использованием центрифугирования в зональном роторе. Препарат содержал около 90% белка Na^+ , K^+ -АТФ-азы и был практически свободен от неспецифической Mg^{2+} -АТФ-азы. Фермент хранили при 4°С в 0,25 М трис-НСI-буфере, содержащем 1 мМ EDTA (рН 7,5, содержание белка 4 мг/мл). Удельная активность препарата 1600 мкмоль неорганического фосфата на 1 мг в 1 ч. Мембраны эритроцитов получали по методу, описанному в работе [15].

Монобислойные липосомы готовили из фосфатидилхолина, выделенного из яичного желтка [16]. Суспензию фосфатидилхолина в 100 мМ трис-НСI-буфере (рН 7,4; 20 мг/мл) обрабатывали 40–50 мин ультразвуком на дезинтеграторе MSE (100 Вт) в максимальном режиме при 10°С. Озвученную суспензию центрифугировали 60 мин при 165 000g на центрифуге «Beckman L5-65» (ротор Ti-50) для осаждения многослойных липосом. При получении холестеринсодержащих липосом использовали смесь холестерина и фосфатидилхолина в соотношении 1 : 2.

Для исследования межмембранного переноса белков смешивали фракции микросом и липосом (общий объем смеси 3 мл) и инкубировали от 0 до 240 мин при 37°С в водяной бане. После инкубации смесь охлаждали до 4°С и наслаивали на 10 мл охлажденного раствора 0,5 М сахарозы, содержащего 0,5 М NaCl и 50 мМ трис-НСI (рН 7,4). Разделение фракций протеолипосом и микросом проводили центрифугированием при 280 000g

в течение 90 мин в ультрацентрифуге «Beckman L5-65» (ротор SW-40). Тени эритроцитов инкубировали от 0 до 240 мин в 100 мМ трис-НСl-буфере (рН 7,4) при 37°С. Инкубационная смесь объемом 3 мл содержала 10 мг фосфолипидов липосом и 10 мг белка теней эритроцитов. Тени эритроцитов осаждали 20 мин на центрифуге УЦП-1 при 8000 об/мин. При работе с препаратом Na^+, K^+ -АТФ-азы инкубационная смесь объемом 3 мл содержала 3,5 мг фосфолипидов липосом и 3,5 мг фермента в 100 мМ трис-НСl-буфере (рН 7,4). Условия инкубации и разделения были такими же, как и при работе с микросомами.

Содержание цитохромов b_5 и Р-450 устанавливали на спектрофотометре «Аminco DW-2» (США) по методу Омуре и Сато [17], активность NADH- и NADPH-зависимых редуктаз определяли по методу Даллнера [18], содержание фосфолипидов — по методу Бартлега [19]. Индекс окисленности фосфатидилхолина оценивали спектрофотометрически из соотношения поглощения при 215 и 233 нм [20]. Содержание холестерина определяли колориметрически по реакции с хлорным железом и серной кислотой [21]. Белок в препаратах биомембран находили по методу Лоури и др. [22] в присутствии 0,1% дезоксихолата натрия, используя в качестве стандарта кристаллический бычий сывороточный альбумин.

ЛИТЕРАТУРА

1. Archakov A. I., Karyakin A. V., Skulachev V. P. Intermembrane electron transport in the absence of added water-soluble carriers.— *Biochim. et biophys. acta*, 1975, v. 408, № 2, p. 93–98.
2. Eggens I., Valtersson C., Dallner G., Ernster B. Transfer of phospholipids between the endoplasmic reticulum and mitochondria in rat hepatocytes in vivo.— *Biochim. and Biophys. Res. Commun.*, 1979, v. 91, № 3, p. 709–715.
3. Bouma R. S., Drislaine F. W., Huestis W. H. Selective extraction of membrane-bound proteins by phospholipid vesicles.— *J. Biol. Chem.*, 1977, v. 252, № 19, p. 6759–6763.
4. Альтерман М. А., Арчаков А. И., Василенко И. А., Девиченский В. М., Карякин А. В., Евстигнеева Р. П. Перенос белков НАДН- и НАДФН-специфичных редокс-цепей между микросомальными мембранами и фосфолипидными липосомами.— Докл. АН СССР, 1979, т. 248, № 4, с. 991–993.
5. Roseman M. A., Holloway P. W., Calabro M. A., Thompson I. E. Exchange of cytochrome b_5 between phospholipid vesicles.— *J. Biol. Chem.*, 1977, v. 252, № 14, p. 4842–4849.
6. Enoch H. G., Fleming P. J., Strittmatter Ph. Cytochrome b_5 and cytochrome b_5 reductase — phospholipid vesicles.— *J. Biol. Chem.*, 1977, v. 252, № 16, p. 5656–5660.
7. Poengsen J., Ullrich V. Transfer of cytochrome b_5 and NADPH-cytochrome c reductase between membranes.— *Biochim. et biophys. acta*, 1980, v. 596, № 2, p. 248–263.
8. Leto T. L., Roseman M. A., Holloway P. W. Mechanism of exchange of cytochrome b_5 between phosphatidylcholine vesicles.— *Biochemistry*, 1980, v. 19, № 3, p. 1911–1916.
9. Арчаков А. И. Микросомальное окисление. М.: Наука, 1975.
10. Девиченский В. М., Альтерман М. А., Жижарева В. О., Арчаков А. И., Образцов В. В., Боровягин В. Л. Доступность белков микросомальной мембраны для протеазы К.— *Биохимия*, 1979, т. 44, № 4, с. 748–754.
11. Enoch H. G., Fleming P. J., Strittmatter Ph. The binding of cytochrome b_5 to phospholipid vesicles and biological membranes.— *J. Biol. Chem.*, 1979, v. 254, № 14, p. 6483–6488.
12. Викторов А. В. Изучение структурной асимметрии фосфолипидных мембран методом ЯМР. Дис. на соискание уч. ст. канд. хим. наук. М.: МНТХТ им. М. В. Ломоносова, 1979, с. 99, 101.
13. Арчаков А. И., Девиченский В. М. Перенос электронов в мембранах эндоплазматического ретикулума; участие цитохрома b_5 в реакциях окисления НАДФН.— *Биохимия*, 1974, т. 39, № 4, с. 691–695.
14. Jorgensen P. L. Purification and characterization of $(\text{Na}^+, \text{K}^+)$ -АТФазе.— *Biochim. et biophys. acta*, 1974, v. 356, № 1, p. 36–52.
15. Post R. L., Merritt C. R., Kinsolving C. R., Albright C. D. Membrane adenosine triphosphatase as a participant in the active transport of sodium and potassium in the human erythrocyte.— *J. Biol. Chem.*, 1960, v. 235, № 6, p. 1796–1799.
16. Dawson R. M. On the mechanism of action of phospholipase А.— *Biochem. J.*, 1963, v. 88, № 3, p. 414–423.
17. Omura T., Sato R. The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes.— *J. Biol. Chem.*, 1964, v. 239, № 7, p. 2370–2378.

18. *Dallner G.* Studies of the structural and enzymic organization of the membranous elements of liver microsomes.— *Acta pathol. microbiol. scand.*, 1963, v. 166.
19. *Bartlett G. R.* A rapid method of determination of phosphorus.— *J. Biol. Chem.*, 1959, v. 234, № 2, p. 466–469.
20. *Klein R. A.* The detection of oxidation in liposome preparation.— *Biochim. et biophys. acta*, 1970, v. 210, № 3, p. 486–489.
21. *Webster D.* Cholesterol measurement in serum, plasma and blood.— *Clin. chim. acta*, 1962, v. 7, № 8, p. 277–284.
22. *Lowry O. H., Rosebrough H. F., Farr A. L., Randall R. J.* Protein measurement with folin phenol reagent.— *J. Biol. Chem.*, 1951, v. 193, № 1, p. 265–275.

Поступила в редакцию
8.I.1981

После доработки
9.III.1981

INTERMEMBRANE TRANSFER OF MICROSOMAL PROTEINS AND Na^+ , K^+ -ATPase OF PLASMATIC MEMBRANE

ALTERMAN M. A., ARCHAKOV A. I., DEVICHENSKY V. M.,
KARYAKIN A. V., MIRSALIKHOVA N. M.

*N. I. Pirogov State Medical Institute, Moscow; Institute of Chemical Physics,
Academy of Sciences of the USSR, Moscow;
Institute of Biochemistry, Academy of Sciences of the Uzbek SSR, Tashkent*

The protein transfer from microsomal membranes and fragments of plasmatic membranes to liposomes has been investigated. Upon incubation of rat liver microsomes with egg phosphatidylcholine liposomes having a low oxidation index, the proteoliposomes formation is observed as the result of transfer of cytochrome b_5 , NADH- and NADPH-specific flavoproteins from microsomal membranes to liposomes. As the consequence of unsaturated fatty acid oxidation in liposomes, the acceleration of cytochrome b_5 transfer and the cytochrome P-450 transfer are observed. The incubation of liposomes with the plasmatic membrane fragments of cerebral layer of pig kidneys enriched up to 90% by Na^+ , K^+ -ATPase facilitates the enzymatic transfer into liposomal fraction. The Na^+ , K^+ -ATPase transfer into liposomal membranes takes place when phospholipid vesicles are incubated with the erythrocyte ghosts. The rate of intermembrane protein transfer depends on the phospholipid content of liposomes.