8. *Сайкинова Н. Н., Аксенова В. М.* Сб. Общие проблемы экологической физиологии. Тез. докл. VI Всесоюзн. конф. по эколог. физиологии. *1*, 115, Сыктывкар, 1982.
9. *Сидоров Е. П., Мольнар А. А., Айдаралиев А. А., Ли В. С., Анисимов М. М., Попов А. В., Антонов В. Ф.* Сб.: I Всесоюзн. биофизич. съезд. Тез. докл. стендовых сообщений. 1, 214. М., 1982.
10. *Чаговец Р. В., Кузнецов Л. Н., Лахно Е. Б., Рыбина А. А.* Республ. межведомств. сб. МЗ УССР «Витамины и эксперименте и клинике» 2, 5, Киев, 1970.
11. *Чуприна В. П.* Сб.: Адаптация организмов к природным условиям. Тез. докл. VI Всесоюзн. конф. по эколог. физиологии *3*, 249, Сыктывкар. 1982.
12. *Шрам Р., Самкова И. Хола И.* Ж. Гигиена, эпидемиология, микроб., иммунол., *27*, 307—321, 1983.
13. *Buttersohl G.* Z. des. Hyd., 35, 1, 25—30, 1989.
14. *Bernard A., Lauwerys B.* Arch. Malad. profess. *50*, 1, 101—107, 1989.
15. *Foa V., Maroni M., Ferioli A., Fait A., Colombi A.* Am. J. Indust. Med., 10 105—109, 1986.
16. WHO Technical Report Series, *535*. Geneva, 1973.

Поступило 10.V 1990 г.

Биолог. журн. Армении, № 12 (43).1990 УДК 577.352.315

ГРАФИЧЕСКОЕ ОПИСАНИЕ ДИНАМИЧЕСКИ РАВНОВЕСНОГО СОСТОЯНИЯ МЕМБРАННЫХ БЕЛКОВ В СОСТАВЕ МАКРОСТРУКТУРЫ

*Г. А. МНАЦАКАНЯН, А. С. КАЛАЧЯН, К. А. ШАГИНЯН**, Т. Н. АКОПЯН**, А. А. АРУТЮНЯН***

Институт экспериментальной биологии АН Армении, Ереван,
**Институт ботаники АН Армении, Ереван

С помощью метода двухкоординатной экстракции составлены трехкоординатные диаграммы состояния белков мембран эритроцитов кур. По форме сечений линий полувыходов изученные белки подразделены на три группы. Обсуждается причинная связь между физико-химическими закономерностями комплексообразования белок—мембрана и графическими особенностями диаграмм. Показано, что диаграммы являются индивидуальными характеристиками конкретного белка.

Երկկոորդինատային լուծագատման մեթոդով կազմվել են հավի էրիթրոցիտների թաղանթային սպիտակուցների եռակոորդինատային վիճակային դիագրամներ. Ըստ կիսաելքի գծի հատվածների ուսումնասիրվող սպիտակուցները բաժանվել են երեք խմբի. Քննարկվում է սպիտակուց-թաղանթ կոմպլեքսագոյացման ֆիզիկաքիմիական առանձնահատկությունների և դիագրամների գրաֆիկական առանձնահատկությունների պատճառական կապը. Ցույց է տրված, որ դիագրամները հանդիսանում են ավյալ սպիտակուցի անհատական բնութագրականները.

With the help of two-coordinate extraction method the three-coordination diagrams of hen erytrocyte membrane proteins' state were constructed. According to the form of half exit line sections the examined proteins were subdivided into three groups. The causal connection between the physico-chemical peculiarities of protein-membrane complex formation and graphical regularities of the diagrams is discussed. It is shown that the diagrams are quite individual for a given protein.

Эритроциты кур—белки мембран трехкоординатная диаграмма—сечение трехмерной константы диссоциации.

Один из главных подходов при исследовании тонкой структуры мембран основывается на изучении характера взаимодействия мембранных белков между собой и с окружающими их липидами. Принципиальная роль гидрофобных взаимодействий для поддержания стабильной конформации биомембран выдвинула на первый план работы по изучению физико-химических особенностей гидрофобных белков мембран [4], определению степени их внедрения в бислой. Для этих целей в основном используются теоретические подходы [5, 7, 8], например, метод дискриминантного анализа мембранных белков [7], основанный на суммарном учете сродства аминокислот к гидрофобной среде или мембране. Метод позволяет из суммы вероятностей нахождения различных аминокислотных остатков в составе трансмембранного сегмента или вне его оперировать понятием «внедримость» в бислой уже для целого белка. Предложены также и методы прямой идентификации [6, 10], основанные на применении флюоресцентных зондов, позволяющие по характеру сигнала определить физико-химические особенности молекулярного окружения метки. В плане подобных исследований представляется важным изучение статуса белков в составе мембранной структуры. Под термином «статус» белка мы понимаем нативное структурно-функциональное состояние белка, которое достигается совокупностью физико-химических условий среды. Изучение характера взаимодействия белков с мембраной, оценка степени интегрированности белка в липидный бислой, выявление физико-химических сдвигов в самом белке и в его ближайшем молекулярном окружении при энзиматических и лиганд-рецепторных взаимодействиях и другие подобные аспекты исследований, на наш взгляд, являются важными для описания статуса белка в составе общей структуры. Предложенный нами ранее метод двухкоординатной экстракции [1], позволяющий оценивать сродство белков к мембранной структуре, является весьма чувствительным при выявлении малейших физико-химических сдвигов в структуре мембран. Суть метода заключается в том, что мембранные белки экстрагируются при комбинированном воздействии двух различных солюбилизирующих агентов, влияние которых на нативную структуру белка или мембраны неоднозначно. Детальное изучение особенностей экстракции белка показывает, что этот процесс строго индивидуален [1], способ графического описания перехода белков из состава мембраны в экстрагирующую среду является важным условием, позволяющим проводить математическую обработку данных и их систематизацию. Мы надеемся, что разработанный метод позволит выявить новые структурно-функциональные особенности комплекса белок—мембрана с оценкой соотношения вкладов различных сил, поддерживающих белок в составе мембраны.

Материал и методика. Плазматические мембраны куриных эритроцитов выделяли по методике, описанной в предыдущей статье [1]. Солюбилизацию мембранных белков в трех двухкомпонентных системах (тритон X-100—NaCl, тритон X-100—мочевина, NaCl-мочевина) проводили следующим образом. Экстракцию белков из мембранного матрикса проводили в трех разных системах, каждая из которых содержала 16 отдельных проб. В каждую пробу помещали 100 мкл суспензии мембран (400 мк.

мембранного белка) и добавляли по 100 мкл какой-либо из пар экстрагирующих компонент для получения 16 типов солюбилизирующих сред, в которых обеспечивается возрастание концентраций тритона X-100 (0, 0,05, 0,25, 1,25%), NaCl (0, 0,14, 0,35, 0,7 М) и мочевины (0, 1, 2, 4 М). Экстракцию белков из мембраны проводили при температуре 0° в течение 1 ч при непрерывном перемешивании. Солюбилизированные белки отделяли от мембранного остова центрифугированием при 30000×g в течение 1 ч. На каждые 75 мкл надосадка добавляли 25 мкл буфера для электрофореза, содержащего 500 мМ трис-HCl (pH 6,8), 10%-ный β-меркаптоэтанол, 4%-ный ДДС-Na, 20%-ный глицерин. Пробы кипятили 3 мин и наносили на ПААГ. Электрофорез в ПААГ с ДДС, денситометрирование белковых полос, измерение гелей и расчет проводили как описано ранее [1].

Результаты и обсуждение. Методический подход, описанный нами ранее [1], основывается на двухкоординатной экстракции белков из мембранного матрикса. Идея метода заключается в том, что мембрана (или какой-либо другой структурно-организованный объект) разбивается на N×n идентичных образцов, которые подвергаются воздействию растворов, содержащих возрастающие концентрации пары экстрагирующих ингредиентов A и B так, что в каждом образце экстракции имеем конкретные значения концентраций реагентов A и B. После экстракции проводятся отделение растворимых фракций, последующий их электрофорез и сканирование электрофореграмм. Для каждого конкретного белка данные выхода в экстрагирующий раствор (интенсивность пика белка на электрофореграмме), полученные с набора образцов, помещаются в определенную таблицу, названную нами «таблицей—диаграммой» или «диаграммой состояния белка», на которой по точкам 50%-ного выхода белка по отношению к абсолютному максимуму выхода проводится так называемая «линия полувыхода», описывающая особенности процесса диссоциации белка с матричной структуры. В работах по изучению белков хроматина [2, 3] результаты двухкоординатной экстракции представлены в виде «поверхностей экстракции в трехмерном пространстве», описывающих детали процесса двухкоординатной экстракции того или иного белка в конкретных условиях.

Ранее [1] с помощью описанного метода были выявлены характерные группы белков в двухкоординатной солюбилизирующей системе NaCl-pH. В настоящем сообщении для более детального изучения поведения белков при их экстракции и выявления особенностей комплексообразования белок—мембрана метод усовершенствовался таким образом, что экстракцию проводили в трех разных двухкомпонентных системах (NaCl—тритон, NaCl—мочевина, тритон—мочевина) и полученные результаты суммировали на единой диаграмме. На рис. 1 в качестве примера представлены профили треков № 15 электрофореграмм мембранных белков, экстрагированных в отмеченных системах. Результаты обрабатывали в следующей последовательности. Данные сканирования для каждого белка вписывали в соответствующие «таблицы-диаграммы», прочерчивали линии полувыходов на каждой диаграмме и последние помещали на плоскости трехкоординатного пространства. В результате были получены так называемые «трехкоординатные диаграммы» (рис. 2). Из рисунка видно, что на «трехкоординатной диаграмме» линии полувыходов являются как бы сечением некой поверхности на плоскостях трехмерного пространства с

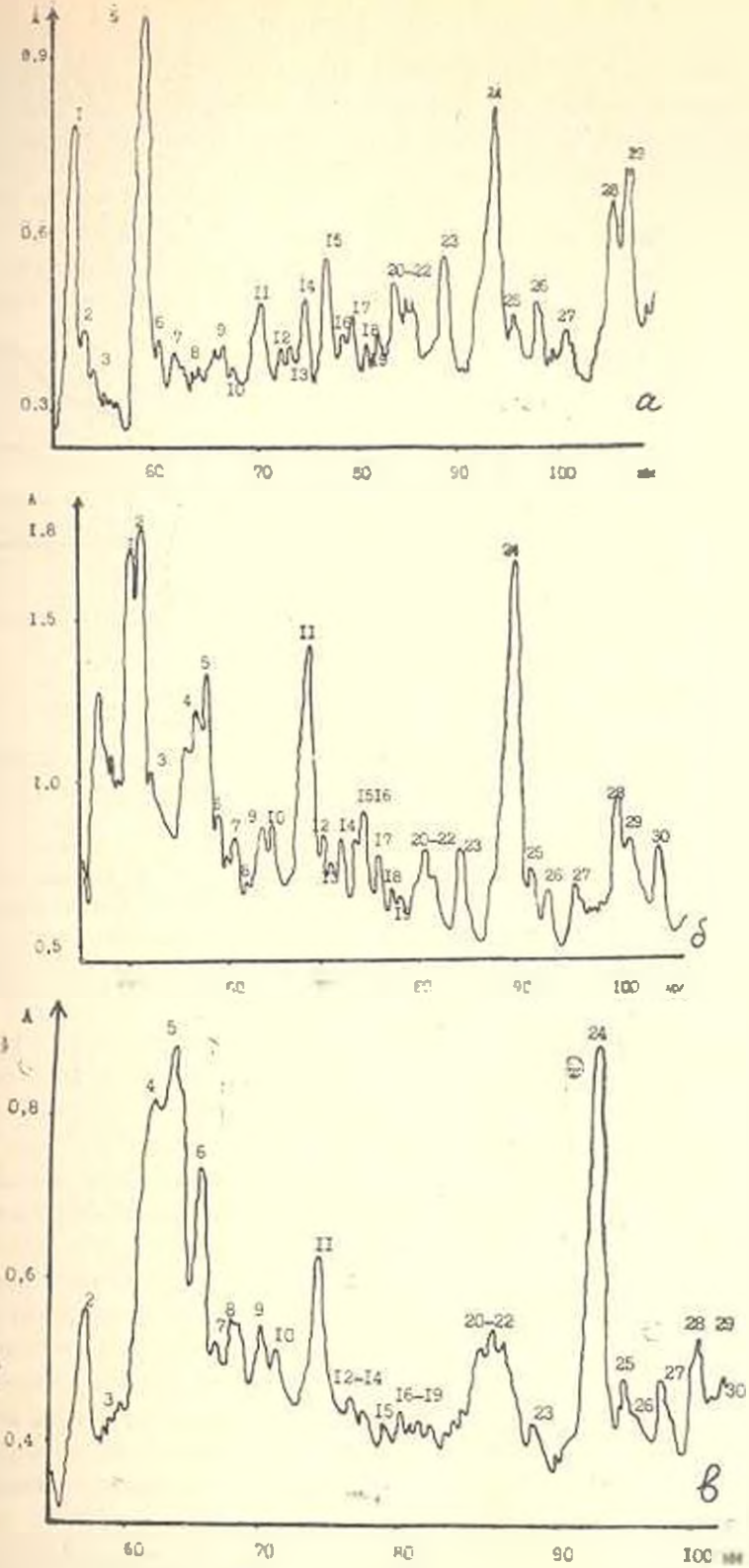

Рис. 1. Профили треков, измеренные на Ultrascan XL (αKB). а) трек № 15 двухкомпонентной системы NaCl-тритон, б) трек № 15 двухкомпонентной системы NaCl—мочевина, в) трек № 15 двухкомпонентной системы тритон—мочевина. Пронумерованные пики белковых полос идентифицированы на остальных треках.

координатами X, Y, Z. Эта поверхность несет в себе определенный физико-химический смысл (представляет собой графическое изображение трехмерной константы диссоциации) и является специфической характеристикой для данного белка.

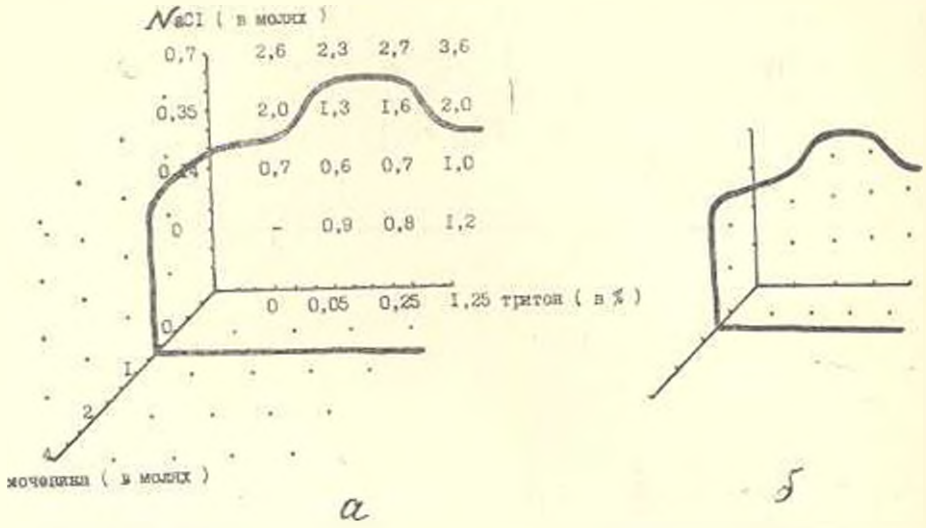

Рис. 2. Способ составления трехкоординатных диаграмм. а) В качестве примера на двухкоординатной плоскости тритон– NaCl представлены числовые значения высот пиков белка полосы № 11 и проведена линия полувыхода [1]. Аналогичным образом линии полувыходов для систем NaCl–мочевина и тритон–мочевина проведены на двух других плоскостях. Линии полувыходов соединены последовательно для графической целостности рисунка. б) Схематическая форма представления рисунка а).

Использование в работе возрастающих концентраций таких реагентов, как мочевина, NaCl, тритон, преследовало цель перевести белок из связанного состояния в растворимое за счет разнородных эффектов, а именно разворачивания структур белков высшего порядка (α-спиралей, β-структур) в результате ослабления водородных связей, вызванных мочевиной, уменьшения вклада электростатических взаимодействий экранированием ионогенных групп, обусловленных повышением ионной силы, разрушения липидного бислоя в результате мицеллообразования под воздействием тритона X-100.

В предыдущей работе пики белков в системе NaCl-pH были пронумерованы согласно профилю одного из треков. Однако в изучаемых в настоящей работе двухкоординатных экстрагирующих системах при электрофорезе были выявлены новые белковые полосы и пришлось ввести иную нумерацию. На треках № 15 рис. 1 пронумерованы все белки, их аналоги найдены на всех остальных треках трех электрофореграмм. Мы считаем, что выявленные для белковых полос закономерности отражают поведение индивидуального белка.

На рис. 3 представлены «трехкоординатные диаграммы» белков, идентифицированных на треках № 15 рис. 1. Обработка данных выхода для каждого белка и анализ формы сечений трехмерных констант диссоциации позволил сгруппировать белки в три класса.

1. *Белки, сечения трехмерных констант диссоциации которых имеют замкнутую форму.*

Представители этого класса—белки №№ 8, 9, 12—14, 19, 20, 22—24, 27. Их высвобождение имеет выраженную зависимость от концентраций тритона, NaCl и мочевины. Можно сказать, что эти белки стабилизируются в общей структуре как гидрофобными и электростатическими взаимодействиями, так и водородными связями. Зависимость выхода от мочевины достаточно сильная, уже при концентрации 1 М в среде происходит диссоциация этих белков. Выход, зависящий от концентрации соли, почти у всех белков этого класса наблюдается при пе-

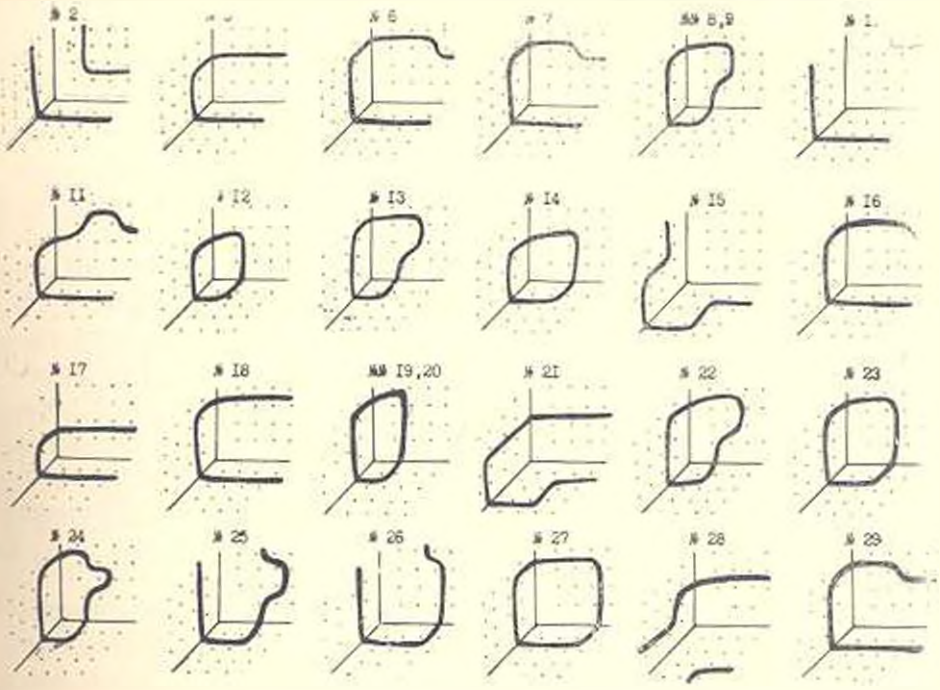

Рис. 3. Трехкоординатные диаграммы и сечения трехмерных констант диссоциаций белков согласно нумерации на треках рисунка 1. Для наглядности и схематизации данных числовые значения и другие описательные детали опущены. Для белков 1, 3, 4 диаграммы не составлены из-за перекрывания их полос.

реходе от 0,35 М к 0,7 М солевой среде, и лишь у двух белков (№№ 12, 14) имеет место снижение порога концентрации NaCl, требуемой для 50%-ной солюбилизации. Практически все белки одинаково реагируют на повышение концентрации тритона. 50%-ный выход в среду обнаруживается уже при достаточно низкой концентрации тритона—0,05%, лишь для двух белков (№№ 14, 23) требуется повышение концентрации тритона до 0,25%, а белок № 27—единственный в этом классе, который высвобождается при переходе концентраций тритона от 0,25 к 1,25%.

Комбинированное воздействие на мембрану пар экстрагирующих агентов существенно не влияет на вид диаграмм 50%-ного выхода для белков №№ 12, 14, 19, 20, 23, 27, и лишь внутри каждой двухкоординатной диаграммы заметны тенденции к некоторому усилению или уменьшению выхода при сочетании двух неоднотипных воздействий.

«Трехкоординатные диаграммы» для белков №№ 8, 9, 13, 22, 24 в системе NaCl-тритон имеют характерное «ушко». Это указывает на то, что физиологические концентрации NaCl являются стабилизирую-

щими и даже наличие в среде «эффективной» или «диссоциирующей» концентрации детергента не способно нарушить связей белка со структурой. Следует отметить, что в отношении остальных белков, в случае которыми комбинированное воздействие соли и тритона не меняет вида диаграммы ,обнаруживается некоторое снижение выхода при 0,14 М и реже при 0,35 М NaCl.

В целом об этих белках можно сказать, что они являются мембрано ассоциированными. Ассоциация осуществляется за счет взаимодействия с липидами, в котором в той или иной степени участвуют как гидрофобные и ионные, так и водородные связи.

2. *Белки ,сечения трехмерных констант диссоциации которых имеют односторонне-открытую форму.*

В этот класс входят белки №№ 5—7, 11, 16—18, 21, 25, 26, 29. Характерным для них является то, что одна из трех экстрагирующих координат «неэффективна» в извлечении белка из мембранного матрикса. Для белков №№ 5—7, 11, 16—18, 21, 29 таковой является тритон, т. е. нарушение гидрофобных взаимодействий на уровне бислоя не воздействует на стабильность связей этих белков с мембранным остовом. В первом приближении можно сказать, что мы имеем дело с периферическими белками, которые сохраняют стабильность связей с мембраной при удалении интегральных белков [9]. Для белков №№ 25, 26 «неэффективной» координатой является соль. Скорее всего эти белки достаточно глубоко проникают липидный бислой и нарушением одних лишь электростатических взаимодействий невозможно извлечь их из структуры.

Белки этого класса можно разделить на два типа:

1. Белки, для которых комбинированное воздействие «эффективной» координаты с «неэффективной» не меняет формы линии полувыхода (белки №№ 5, 17, 18).

2. Белки, для которых комбинированное воздействие «неэффективной» координаты с «эффективной» или пары «неэффективных» координат дает качественный эффект, выраженный в наличии заметного изгиба на сечении трехмерной константы диссоциации (№№ 6, 7, 11, 16, 21, 25, 26, 29). Например, для белков №№ 6, 11, 16, 1,25% тритон сам по себе не является экстрагирующим параметром, 0,35 М NaCl в среде также недостаточен для высвобождения указанных белков, но наложение этих ингредиентов вносит определенные структурные изменения либо в самом белке, либо в его окружении, в результате чего белок переходит в раствор.

3. *Белки, сечения трехмерных констант диссоциации которых имеют двусторонне открытую форму.*

Представители этого класса—белки №№ 2, 10, 15, 28. Они являются однокомпонентно-зависимыми. Для белков №№ 2, 10, 15 мочевина является единственным параметром, изменением которого можно перевести их из связанного состояния в свободное, для белка № 2 она является фактором высвобождения уже при концентрации 1 М в среде, для № 10—2 М, а для № 15—3 М. Для полосы № 28 экстрагирующей координатой является соль.

С другой стороны, для полос №№ 2, 10, 18 сочетание двух других координат, которые сами по себе являются «неэффективными», в относительно высоких концентрациях обеспечивает структурный переход из связанного состояния в свободное.

Таким образом, двумерные и трехмерные константы диссоциации являются особыми физико-химическими характеристиками белков в интервале конкретных значений двух или трех параметров экстрагирующих сред. Анализ «трехмерных диаграмм» свидетельствует также о том, что кроме пар белковых полос 8, 9 и 19, 20 (которые, по-видимому, являются субъединицами двух исходных белков) остальные полосы на диаграммах обнаруживают весьма специфичные линии полувыходов. В принципе с помощью настоящего метода белки могут быть, с одной стороны, классифицированы по типу взаимодействия с матриксной структурой (отмеченные выше типы диаграмм), а с другой—охарактеризованы вплоть до индивидуальных отличий с помощью конкретных диаграмм. Причем графический способ описания в этом случае может быть более упрощен, а именно внешние от линий полувыходов точки могут быть опущены как на рис. 2б.

Введенные в настоящей работе понятия, такие как «диаграммы состояния белка», «линия полувыхода», «поверхность экстракции», «двумерная и трехмерная константа диссоциации», «сечение линий полувыходов» представляют новые возможности для более углубленной и детальной характеристики сродства мембранных белков по оценке совокупности сил, стабилизирующих белок в составе мембраны.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Мнацаканян Г. А., Калачян А. С., Шагинян К. А., Акопян Т. Н., Арутюнян А. А.* Биолог. ж. Армении, *42*, 6, 538—546, 1989.
2. *Саркисян Н. А., Абрамян А. Ш., Шагинян К. А., Акопян Т. Н., Арутюнян А. А.* Биолог. ж. Армении, *43*, 8, 613, 1990.
3. *Саркисян Н. А., Абрамян А. Ш., Шагинян К. А., Акопян Т. Н., Арутюнян А. А.* Биолог. ж. Армении, *43*, 8, 679, 1990.
4. *Bigelow H. F.* J. Theoret. Biol., *16*, 187—211, 1967.
5. *Eisenberg D.* Ann. Rev. Biochem. *53*, 595—623, 1984.
6. *Kato A., Nakai S.* Biochim. Biophys. Acta *624*, 13—20, 1980.
7. *Klein P., Kanehisa M., DeLisi C.* Biochim. Biophys. Acta. *815*, 468—476, 1985.
8. *Kuhn L. A., Leigh J. S.* Biochim. Biophys. Acta, *828*, 351—361, 1985.
9. *Lux S. E.* Nature, *281*, 426—429, 1979.
10. *Shoshana B., Inbar A., Ginsburg H., Cabantchic J.* Biochim. Biophys. Acta, *778*, 612—614, 1984.

Поступило 12.II.1990 г.