

УДК 557.352.2

А.Е.ЗАКАРЯН, Г.А.ПОГОСЯН, А.Р.ЦАГИКЯН

ПРОВОДИМОСТЬ БИСЛОЙНЫХ ФОСФОЛИПИДНЫХ МЕМБРАН В ПРИСУТСТВИИ МИКРОСОМ С $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -АТФазной АКТИВНОСТЬЮ

Исследована электропроводимость бислойных фосфолипидных мембран в присутствии микросом с $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -АТФазной активностью. Установлено, что эти надмолекулярные препараты в определенных условиях эксперимента могут взаимодействовать с плоскими фосфолипидными мембранами, изменяя величину их электропроводимости. Повышение электропроводимости бислоя на несколько порядков объясняется нами возможным слипанием микросомальных пузырьков с поверхностью мембраны и дальнейшим внедрением их компонентов в структуру фосфолипидной мембраны.

Некоторые электрические характеристики биологических мембран можно реконструировать на плоских искусственных бислоях, приготовленных из общих фосфолипидов [1,2]. Для такой модификации гидрофобной части клеточной мембраны были применены антибиотики [3,4], вещества белковой природы [5], пигменты и реакционные центры фотосинтезирующего аппарата [6,7], а также другие соединения биологически активной природы. Наиболее трудно осуществлялась реконструкция плоских фосфолипидных бислоев с помощью мембранных АТФаз. Однако и в этом плане были получены данные по реконструкции мембранных насосов с помощью модельных черных мембран [8-10]. Очевидно, что такие исследования дают возможность изучить различные аспекты биомембран, в том числе и механизмы мембранного транспорта.

В аспекте вышеназванного целью данной работы явилась попытка модифицировать плоские фосфолипидные бислои с помощью таких надмолекулярных комплексов клеточного происхождения, как микросомы, обладающие $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -АТФазной активностью.

Материал и методика Для формирования плоских бислоев использовали общие фосфолипиды, полученные из мозга крупного рогатого скота по методу Мюллера и др. [2]. В качестве растворителя для мембранобразующих фосфолипидов использовали перегнанный холестеринсодержащий нонан. Концентрация мембранобразующих фосфолипидов составляла 20 мг/мл. Мембраны формировали на отверстиях (диаметр приблизительно 0,7 мм) тефлоновой ячейки, погруженной в стеклянную кювету. Внутренний (тефлоновый) и внешний (стеклянный) отсеки рабочей камеры заполнялись соответственно 1 и 10 мл раствора KCl необходимой концентрации. Камера устанавливалась на магнитной мешалке, постоянное перемешивание осуществлялось с помощью

запаянных в стеклянные капилляры мешалок длиной 3-4 мм. В экспериментах использовались хлорсеребряные электроды, удлиненные с помощью агар-солевых мостиков.

Критерием качества бислоя служили появление и постепенное исчезновение радужного этапа формирования мембраны, наблюдаемого с помощью микроскопа МБС-2, минимальная толщина тора, время выживаемости (не менее 2 часов) и высокое электрическое сопротивление (10^9-10^{10} Ом). Испытуемые вещества добавлялись в камеры микропипеткой в пределах нескольких микролитров, что не приводило к заметному изменению объема растворов в рабочих отсеках и почти не повлияли на гидростатическое давление на мембрану. Все эксперименты были проведены в условиях комнатной температуры.

Ток через мембрану измерялся в режиме фиксации мембранного потенциала на собранной нами электронизмерительной установке, работающей на базе усилителя с обратной связью "Keithley-301" (США) с входным сопротивлением 10^{16} Ом. Потенциал на мембрану подавался специальным источником питания постоянного тока в пределах 0-200 мВ и контролировался с помощью цифрового вольтметра Ц-4313. Регистрация результатов осуществлялась саморегистрирующим прибором КСП-4.

Микросомальные препараты были получены методом Йоргенсена [11] из мозговой части почек свиней. Общее количество белка, определяемое по Лоури в испытуемых фракциях микросом, составляло 10 мг/мл. Активность $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{АТФазы}$ определялась по фосфору калориметрическим способом по методу Фиске и Субароу [12] и в наших препаратах составляла 0,65 ед/мл.

Результаты и обсуждение. После формирования черного фосфолипидного бислоя в малый и большой отсеки экспериментальной камеры добавлялось соответственно 0,01 и 0,1 мл свежеприготовленного препарата микросом с конечной концентрацией 2 мг/мл по белку. Через 10-15 минут была выключена магнитная мешалка во избежание побочных шумов. После такой инкубации наблюдалось постепенное увеличение электропроводности БЛМ, сопровождающееся с почти равноотстоящими по времени всплесками с амплитудой 10-15 pS (рис.1). Через

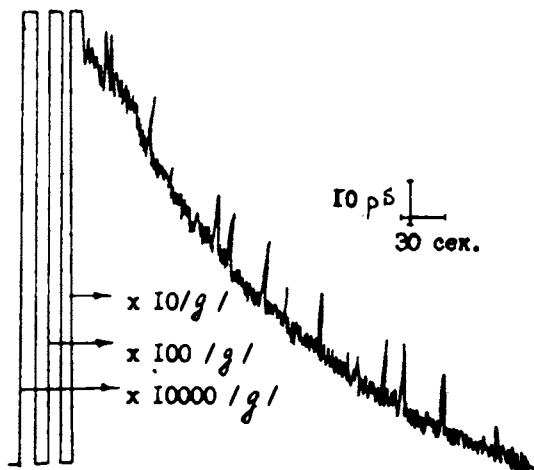


Рис. 1. Увеличение проводимости мембраны в присутствии микросом: концентрация микросом по обе стороны мембраны 2 мг/мл по белку, $E_m=100$ мВ, 2М раствор KCl, pH=6,6, $t=20^\circ\text{C}$.

30-35 минут, когда сопротивление бислоя снижалось на 3-4 порядка, происходил разрыв мембраны. Предел изменения сопротивления находился между значениями $2 \pm 3 \cdot 10^9$ и $2,5 \pm 4 \cdot 10^8$ Ом. Интересным, на наш взгляд, оказался тот факт, что денатурированные трехминутным кипячением микросомы не индуцировали электропроводимость в фосфолипидном бислое. Это дает основание считать, что модификация БЛМ в данном случае происходит за счет слипания нативных микросомальных пузырьков с бислоем, которые после кипячения, естественно, разрушаются и денатурируются.

С уменьшением в два-три раза концентрации испытуемых препаратов микросом в мембраноомывающей среде были зарегистрированы дискретные флуктуации проводимости БЛМ с амплитудой 1,5-2 pS и временем жизни 20-30 с (рис.2).

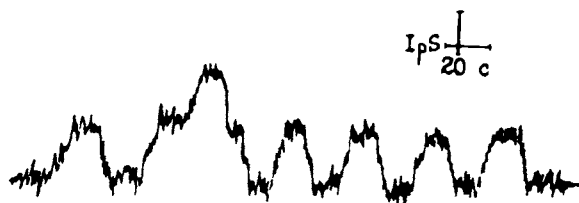


Рис. 2. Проводимость мембраны в присутствии микросом: концентрация микросом 1 мг/мл по белку.

В дальнейших опытах варьированием условий эксперимента была зарегистрирована работа мембранного канала. Так, в 2 М растворе KCl при значении мембранного потенциала 150 мВ и pH среды 7,4 после 30 минут инкубации микросом наблюдались флуктуации проводимости с характерной для мембранного канала дискретностью.

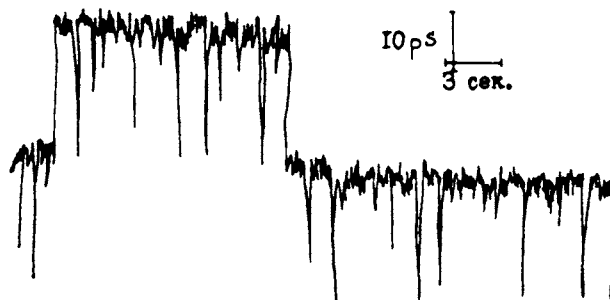


Рис. 3. Дискретные изменения проводимости мембраны, модифицированной микросомами: концентрация микросом 1 мг/мл по белку, $E_M = -100$ мВ, 2М раствор KCl, $t = 20^\circ\text{C}$.

Канал функционировал на двух уровнях проводимости (рис.3) с параметрами 20-25 pS и временем жизни от 2 до 5 с. Время перехода от состояния 1 в состояние 2 составляло 2-3 минуты. Теплом денатурированные микросомы в этом случае также не модифицировали искусственную мембрану. Не удалось выявить и ионную избирательность этих каналов. Это, по всей вероятности, объясняется тем, что в

данном случае каналы имеют достаточно большие размеры и заполнены электролитом.

Таким образом, из вышеприведенных данных следует, что микросомальная фракция с $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -АТФазной активностью в определенных условиях взаимодействует с фосфолипидным бислоем и может индуцировать электропроводимость, снижая мембранное сопротивление на несколько порядков. Такое взаимодействие нами объясняется возможностью слипания микросом с плоским бислоем с последующим внедрением микросомальных компонентов в черную мембрану.

Кафедра биофизики

Поступила 26.06.1990

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Henn G.A., Thomson T.E. Synthetic lipid bilayer membrans. - Annu.Rev.Biochem, 1969, v.38, p.241.
2. Mueller P., Rudin D.O., Tien H.T., Wescott W.C. Methods for the formation of single bimolecular lipid membranes in aqueous solution.8. - J.Phys.Chem., 1963, v.67, p.534.
3. Арчаков А.И., Боровягин В.Л., Галущенко И.В. и др. Самосборка микросомальных мембран. - Докл.АН СССР, 1974, т.219, с.731.
4. Pohl G.W., Stark G., Trissl H.W. Interaction of liposomes with black lipid membranes.8. - Biochim.et biophys.acta., 1973, v.318, p.478.
5. Либман Е.А., Ненашев В.А. Кинетика адгезии и поверхностная электропроводность бимолекулярных фосфолипидных мембран. - Биофизика, 1972, т.17, с.231.
6. Packnam N., Dutton P., Mueller P. Photoelectric currents across planar bilayer membranes containing bacterial reaction centers. - Biophysical Journal, 1982, v. 37, p.465-473.
7. Symons M., Botte P., Sybesma C. The surface and membrane potentials of chromatophores of photosynthetic bacteria as studied by carotenoid absorbance changes. - Biochim.et Biophys.Acta., 1985, v.806, p.161.
8. Аннёр Б.М. Реконструированная $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -АТФаза. - Биол.мембраны: структура и функции (Пятый сов.-швейц.симпозиум), Рига, 1988, с.11.
9. Borlighaus R., Apel H. Current transients generated by the $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -АТФаза after an ATP concentration jump dependent on sodium and ATP concentration. - BBA: Biomembrans, 1988, v.939, p.197
10. Cornelius Flemming. The sided action on Na^+ and of K^+ on reconstituted shark $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -АТФаза engaged in $\text{Na}^+ - \text{Na}^+$ exchange accompanied by ATP hydrolyses. 1.The ATP activation curve. - BBA: Biomembrans, 1987, v.904, p.353.
11. Jorgensen P.L. Purification and characterization of $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -АТФаза. - Biochim.Biophys.Acta., 1974, v.356, p.36.
12. Fiske C.H., Subarovo I.T. A new method for inorganic phosphates determination. - J.Biol.og.Chem., 1925, v.66, p.375.

ԵՐԿԵՐՏ ՏՈՍՅՈՒԳՊԻԱՏԻՆ ՄԵՄԲՐԱՆՆԵՐԻ ՀԱՂՈՐԿԱԿԱՆՈՒԹՅԱՆԸ
 Na^+-K^+ -ԱՆՇԱՊԱԿԻՆ ԱԿՏԻՎՈՒԹՅԱՐ ՄԻԿՐՈՍՈՄՆԵՐԻ ԱՌՎԱՏՈՒԹՅԱՐ

Ա մ փ ո փ ո մ

Ռաբ մնասիրված է երկշերտ ֆոսֆոլիպիդային մեմբրանների էլեկտրահաղորդականությունը Na^+-K^+ -անշապակին ակտիվությամբ օժտված միկրոսոմների առկայությամբ: Հաստատված է, որ այդ վերմոլեկուլային մասնիկները փորձի որոշակի պայմաններում կարող են փոխազդել հարթ երկշերտ ֆոսֆոլիպիդային մեմբրանների հետ՝ փոխելով նրանց էլեկտրահաղորդականության մեծությունը: Էլեկտրահաղորդականության աճը մի քանի կարգով բացատրվում է միկրոսոմային պղպջակների հնարավոր միաձուլմամբ մեմբրանի հետ և նրա բաղադրիչների հետագա ներդրմամբ ֆոսֆոլիպիդային երկշերտի կառուցվածքի մեջ:

A. E. ZAKARIAN, G. H. POGOSIAN, A. P. ZAGIKIAN

THE CONDUCTIVITY OF BILAYER PHOSPHOLIPID MEMBRANES IN
PRESENCE OF MICROSOMES WITH Na^+-K^+ -ATPHASE ACTIVITY

SUMMARY

The electroconductivity of bilayer phospholipid membranes was investigated in presence of microsomes with Na^+-K^+ -ATPhase activity. It was established that the supramolecular particles under appropriate experimental conditions can interact with planar phospholipid membranes changing the magnitude of electroconductivity. The several order magnification of membranes electroconductivity was explained by possible sticking of microsomal vesicles to the surface of membranes and further inclusion of their components into phospholipid membrane structure.