

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bennet L. G., Tornnabene T. G. Characterization of the antigenic subunits of the envelope protein of *Yersinia pestis* // J. Bacteriol.— 1974.— 117, N 1.— P. 48—54.
2. Вейнблат В. И., Никифоров В. В., Кормилицин А. В. Гидродинамическая характеристика капсульного антигена возбудителя чумы // Вопр. генетики, молекуляр. биологии и микробиологии чумы и холеры.— Саратов: Изд-во ин-та «Микроб», 1985.— С. 37—42.
3. Некоторые физико-химические особенности капсульного белка чумного микроба / П. И. Анисимов, Л. Н. Сердобинцев, Ю. В. Иванов и др. // Молекуляр. генетика, микробиология и вирусология.— 1987.— № 2.— С. 24—27.
4. Кантор Ч., Шиммель П. Биофизическая химия.— М.: Мир, 1984.— Т. 2.— 493 с.
5. Dynamic light scattering. Applications of photon correlation spectroscopy / Ed. R. Pecora.— New York; London: Plenum press, 1985.— 420 p.
6. Исследование полидисперсных растворов актина методами квазиупругого рассеяния / П. Д. Добычин, А. В. Ломакин, В. А. Мевх и др. // Биополимеры и клетка.— 1986.— 2, № 1.— С. 23—29.
7. Конформационные изменения липопротеннов высокой плотности в процессе насыщения холестеринном / В. А. Носкин, Г. Е. Шмелев, А. В. Ломакин и др. // Там же.— № 6.— С. 293—301.
8. Распределение плазмменных липопротеннов по размерам / В. Т. Лозовский, Г. Е. Шмелев, В. А. Носкин и др. // Биофизика.— 1987.— 32, № 2.— С. 285—291.
9. Определение параметров надмолекулярных структур в разбавленных растворах полимеров методом спектра рассеяния / В. И. Клеини, Н. Г. Хлебцов, А. В. Северинов, Л. Г. Лебедева // Высокомолекуляр. соединения.— 1987.— 20, № 9.— С. 2136—2141.
10. Bhatnagar H. L., Heller W. Theoretical investigations on the light scattering of spheres. XIV. Wavelength exponent of differential scattering spectra for an angle of observation of 90° // J. Chem. Phys.— 1964.— 40, N 2.— P. 480—483.
11. Борен К., Хафмен Д. Поглощение и рассеяние света малыми частицами.— М.: Мир, 1986.— 660 с.
12. Клеини В. И., Шесолов С. Ю., Лаврушин В. И. Характеристические функции светорассеяния дисперсных систем.— Саратов: Изд-во Саратов. ун-та, 1977.— 176 с.
13. Kerker M. The scattering of light and other electromagnetic radiations.— New York; London: Acad. press, 1969.— 660 p.
14. Эскиц В. Е. Рассеяние света растворами полимеров.— Л.: Наука, 1986.— 288 с.
15. Хлебцов Н. Г. Матрица рассеяния для анизотропных эллипсоидов, сравнимых с длиной волны света // Оптика и спектроскопия.— 1979.— 46, № 2.— С. 341—345.
16. Исследование процессов диссоциации-ассоциации капсульного антигена чумного микроба / А. Г. Дубичев, Л. Н. Сердобинцев, Е. Д. Воронцов и др. // Иммунология и специфическая профилактика особо опасных инфекций.— Саратов: Изд-во ин-та «Микроб», 1986.— С. 99—105.
17. Тенфорд Ч. Физическая химия полимеров.— М.: Химия, 1965.— 772 с.

Ин-т биохимии и физиологии растений
и микроорганизмов АН СССР, Саратов
Всесоюз. науч.-исслед. противочум. ин-т «Микроб»,
Саратов

Получено 11.11.88

УДК 577.37

Г. И. Горбенко, В. И. Древаль

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ МЕТГЕМОГЛОБИНА С ФОСФОЛИПИДНЫМИ ВЕЗИКУЛАМИ

Методом равновесной адсорбции исследовали связывание метгемоглобина с фосфатидилхолиновыми липосомами. Определение термодинамических параметров комплексообразования проводили в рамках двухмерной решеточной модели внедрения белка в фосфолипидный бислой. Показано, что эта модель может быть применена для анализа взаимодействия интегральных белков с липидным матриксом мембран.

В настоящее время для исследования основных принципов формирования надмолекулярной структуры биомембран широко используются модельные системы. Одним из важных аспектов их применения является изучение термодинамических параметров образования липид-белковых комплексов. Среди имеющихся моделей адсорбции наиболее адекватное описание комплексообразования в липид-белковых системах дают предложенные Станковски [1, 2] двухмерные решеточные модели, учи-

тывающие специфику межмолекулярных взаимодействий в биомембранах.

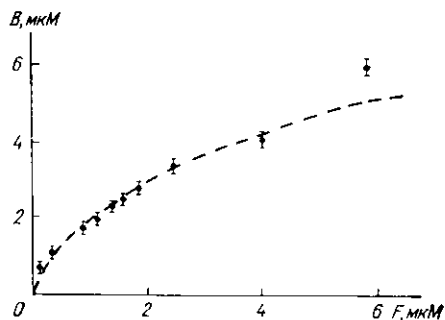
Цель настоящей работы заключалась в изучении связывания метгемоглобина с фосфатидилхолиновыми липосомами методом равновесной адсорбции и анализе экспериментальных данных в рамках решеточной модели внедрения белка в фосфолипидный бислой.

Материалы и методы. Оксигемоглобин выделяли из донорской крови по методу [3]. Метгемоглобин получали добавлением к оксигемоглобину 1,2 М избытка феррицианида калия с последующей гель-фильтрацией на молселекте G-25. Для приготовления липосом из фосфатидилхолина раствор липида в этаноле упаривали в вакууме. К липидной пленке добавляли 0,01 М трис-HCl-буфер, содержащий 0,15 М NaCl, pH 6,5. Конечная концентрация липида составляла 10 мг/мл. Суспензию механически встряхивали 10 мин, затем озвучивали 7 мин при 4 °С с помощью диспергатора УЗДН-1 при частоте 22 кГц. Озвученную суспензию центрифугировали 30 мин при 30 000 g. В работе использовали супернатант.

Реакцию комплексообразования проводили в буфере (0,01 М трис-HCl, 0,15 М NaCl, pH 6,5) при 25 °С в течение 90 мин. Молярное соотношение белок: липид варьировали в пределах $6 \cdot 10^{-4}$ — $8 \cdot 10^{-3}$. Свободный и связанный белок разделяли с помощью гель-фильтрации на колонках 1×25 см) с гелем HW-60F. Скорость элюции составляла 12 мл/ч. Концентрацию метгемоглобина определяли по поглощению при 407 нм, используя коэффициент молярной экстинкции $5,66 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Оптическую плотность растворов измеряли на спектрофотометре СФ-46.

Обработку экспериментальных данных проводили на ЭВМ БЭСМ-6 методом наименьших квадратов.

Результаты и обсуждение. На рисунке представлена изотерма связывания метгемоглобина с везикулами из фосфатидилхолина. Анализ экспериментальной кривой проводили в рамках двухмерной решеточ-



Изотерма адсорбции метгемоглобина на везикулах из фосфатидилхолина (pH 6,5). Концентрация фосфолипидов $3,9 \cdot 10^{-3}$ М. Пунктирной линией обозначена теоретическая кривая, соответствующая модели внедрения линейного лиганда в бислой

The isotherm of methemoglobin adsorption on phosphatidylcholine vesicles (pH 6.5). Phospholipid concentration $3,9 \cdot 10^{-3}$ M. Dotted line stands for the curve calculated for the model of linear ligand incorporation into bilayer

ной модели внедрения лиганда в мембрану [1]. Основанием для применения этой модели послужили полученные к настоящему времени данные, свидетельствующие о том, что основным типом взаимодействия метгемоглобина с незаряженными фосфолипидами в условиях высокой ионной силы является встраивание гидрофобного фрагмента белковой молекулы в бислой [4—8].

Фосфолипидный бислой моделировали гексагональной решеткой (координационное число решетки $z=6$) — структурными элементами, центрами которой являются головки фосфолипидов [1]. Встраивание фрагмента одной молекулы белка в бислой можно представить как появление «белковых» центров решетки, занимающих площадь, соответствующую n липидных молекул. При этом геометрическое расположение «белковых» центров определяет форму лиганда, т. е. форму контактного участка.

В общем случае, согласно Станковски [1], внедрение лиганда в фосфолипидный бислой можно описать с помощью выражений:

$$K_{\text{inc}} \cdot F = \frac{r}{1 + nr} \left(\frac{1 + nr}{1 + \lambda nr} \right)^{z\lambda/(1-\lambda)}; \quad (1)$$

$$r = \frac{B}{L_0}; \quad (2)$$

$$\gamma = \frac{\alpha}{\lambda}, \quad (3)$$

где K_{inc} — константа сродства реакции встраивания белка в бислой; F — концентрация свободного белка; n — стехиометрия связывания, характеризующаяся числом «белковых» центров решетки; B — концентрация связанного белка; L_0 — общая концентрация липида; λ — параметр, зависящий от формы лиганда; α — параметр исключенной площади. В работе [1] показано, что для линейного лиганда

$$\lambda = \frac{z-2}{z} - \frac{2}{nz}; \quad (4)$$

$$\alpha = (n-1) \cdot \lambda. \quad (5)$$

В случае дискообразной формы лиганда справедливы соотношения:

$$\lambda = \frac{2k+1}{n}; \quad (6)$$

$$\alpha = 3; \quad (7)$$

$$k = \frac{-1 + \sqrt{1+12n}}{6}. \quad (8)$$

Однозначный выбор формы контактного участка осложняется рядом факторов. Во-первых, гидрофобная контактная площадка может возникнуть вследствие диссоциации молекулы метгемоглобина на димеры, имеющей место в исследуемой области концентраций белка [4]. Во-вторых, не исключено, что изменение конформации адсорбированного белка приводит к экспонированию гидрофобного сегмента α -спирали. В первом случае более вероятно дискообразная форма контактного участка, а во втором — линейная. Как предлагается в работе [2], мы провели оценку нижних и верхних пределов величин K_{inc} и n в предположении линейной и дискообразной форм лиганда соответственно. Значения параметров комплексообразования, полученные при аппроксимации экспериментальных данных уравнениями (1) — (8), представлены в таблице.

Параметры связывания метгемоглобина с фосфатидилхолиновыми липосомами
Parameters of the methemoglobin binding to phosphatidylcholine vesicles

Форма лиганда	n	$K_{inc} \cdot M^{-1}$
Линейный	41	$8,5 \cdot 10^2$
Диск	760	$9,3 \cdot 10^2$

Поскольку площадь сечения молекулы гемоглобина составляет $\sim 2600 \text{ \AA}^2$, а средняя площадь, приходящаяся на головку фосфатидилхолина, равна $\sim 70 \text{ \AA}^2$, молекула белка при адсорбции может покрыть ~ 37 молекул липида. С учетом этой грубой оценки из таблицы можно видеть, что предположение о линейности контактного участка оказывается более разумным. Согласно полученным данным, погруженный в бислой фрагмент белка охватывает площадь, приходящуюся на ~ 40 липидных молекул. Эта величина, по-видимому, несколько завышена вследствие ограничений используемой модели, связанных, в частности, с предположениями о полном насыщении решетки и несущественности объемных стерических затруднений при комплексообразовании.

Изменение свободной энергии $|\Delta G = -RT \ln K_{inc}|$ при взаимодействии метгемоглобина с фосфатидилхолиновыми липосомами составляет ~ -4 ккал/моль и обусловлено, в основном, энтропийными эффектами. Следует также отметить, что внедрение линейного фрагмента

белка энтропийно более выгодно по сравнению с внедрением диска в фосфолипидный бислой.

Таким образом, проведенное исследование комплексообразования в модельной липид-белковой системе позволяет сделать вывод, что двухмерная решеточная модель встраивания лиганда в бислой может быть применена для анализа взаимодействия интегральных белков с липидным матриксом биомембран.

INTERACTION OF METHEMOGLOBIN WITH PHOSPHOLIPID VESICLES

G. P. Gorbenko, V. I. Dreval

State University, Kharkov

С у м м а р у

The methemoglobin binding to phosphatidylethanol liposomes has been investigated by the equilibrium adsorption technique. The experimental isotherm has been treated in terms of two-dimensional lattice model of protein incorporation into bilayer. It was shown that the model involved may be used to analyze the integral protein interaction with the membrane lipid matrix.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Stankowski S.* Large ligand adsorption to membranes. III Cooperativity and general ligand shapes // *Biochim. et biophys. acta.*—1984.— **777**, N 2.— P. 167—182.
2. *Stankowski S.* Disk-like ligands and shape dependence at low saturation // *Ibid.*—1983.— **735**, N 3.— P. 352—360.
3. *Получение очищенного препарата гемоглобина и изучение его свойств / Г. Я. Розенберг, Е. П. Вязова, Г. Н. Иванова и др. // Пробл. гематологии и переливания крови.*—1975.— **20**, № 11.— С. 25—29.
4. *Interaction of different forms of haemoglobin with artificial lipid membranes / L. Bossi, S. Alema, P. Calissano, E. Marra // Biochim. et biophys. acta.*—1975.— **375**, N 3.— P. 477—482.
5. *Kimelberg H. K.* Protein-liposome interactions and their relevance to the structure and function of cell membranes // *Mol. and Cell. Biochem.*—1976.— **10**, N 3.— P. 171—190.
6. *Изучение взаимодействия метгемоглобина с модельными мембранами методом спектроскопии ³¹P-ЯМР / В. В. Чупин, И. П. Ушакова, С. В. Бондаренко и др. // Биоорг. химия.*—1982.— **8**, № 11.— С. 1275—1281.
7. *Изучение взаимодействия метгемоглобина с фосфолипидными бислойнными мембранами методом флуоресценции / И. П. Ушакова, И. А. Василенко, Г. А. Серебрянникова, Р. П. Евстигнеева // Там же.*—1981.— **7**, № 4.— С. 613—620.
8. *Селезнев С. А., Громов Н. Г.* Образование гемоглобин-липидных комплексов как модель взаимодействия основных компонентов клеточных мембран // *Биофизика.*—1983.— **28**, № 3.— С. 521.

Харьк. гос. ун-т

Получено 05.06.89