

## 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 плазматических 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.

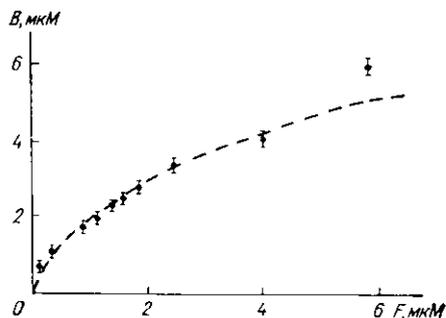
Цель настоящей работы заключалась в изучении связывания метгемоглобина с фосфатидилхолиновыми липосомами методом равновесной адсорбции и анализе экспериментальных данных в рамках решеточной модели внедрения белка в фосфолипидный бислой.

**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;  $\lambda$  — параметр, зависящий от формы лиганда;  $\alpha$  — 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  $\alpha$ -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	$n$	$K_{inc}, M^{-1}$
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  $\sim 37$  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  $\sim 40$  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  $\sim -4$  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 <sup>31</sup>P-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