



УДК 577.37

© Г. П. Горбенко, 1990

ВЛИЯНИЕ ФОСФОЛИПИДОВ НА СВЯЗЫВАНИЕ БРОМТИМОЛОВОГО СИНЕГО МЕТГЕМОГЛОБИНОМ

Исследовали связывание сульффталеинового красителя бромтимолового синего с метгемоглобином при образовании белок-липидного комплекса. Показано, что взаимодействие метгемоглобина с липосомами из смеси фосфатидилхолина с кардиолипином сопровождается существенными изменениями конформации белка.

Введение. В настоящее время в связи с развитием концепции структурной лабильности биомембран [1—3] особую актуальность приобретают исследования конформационных перестроек их основных компонентов — белков и липидов. Одним из информативных подходов к выяснению механизмов модифицирующего влияния фосфолипидов на структурное состояние белков является изучение сорбции красителей на поверхности белковой молекулы [2]. Ранее было показано, что водорастворимые белки, в частности гемоглобин, взаимодействуют с модельными и природными мембранами с образованием комплексов, стабилизируемых электростатическими и гидрофобными силами [4—7].

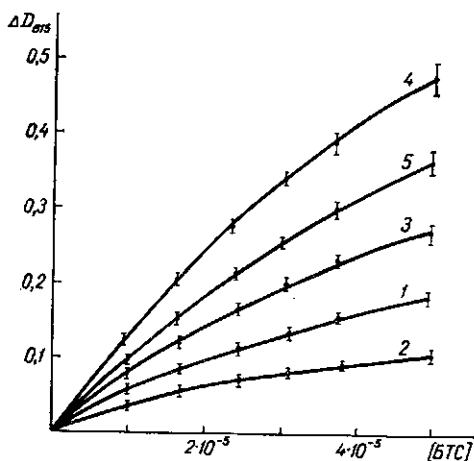
Цель настоящей работы заключалась в исследовании конформационных изменений метгемоглобина при образовании белок-липидного комплекса с помощью анионного красителя бромтимолового синего (БТС).

Материалы и методы. В работе использовали фосфатидилхолин (ФХ), кардиолипин (КЛ), фосфатидилсерин (ФС) («Бакпрепарат», Харьков), БТС («Реахим»). Метгемоглобин получали из оксигемоглобина, выделенного по методу [8], добавившем 2 М избытка феррицианида калия. Для приготовления липосом из смесей ФХ с КЛ или ФС липидную суспензию озвучивали 3 мин при 4 °С с помощью диспергатора УЗДН-1 на частоте 22 кГц. В работе использовали липосомы, полученные после осаждения многослойных везикул центрифугированием 30 мин при 30 000 *g*. Концентрацию фосфолипидов в супернатанте определяли по неорганическому фосфату [9].

Реакцию комплексообразования проводили в 0,01 М трис-НСl буфере, рН 7,4, при 25 °С в течение 60 мин. Зависимости сорбции БТС от концентрации красителя получали при молярном соотношении липид : белок (L/P) ~ 20, а влияние ионной силы на связывание БТС исследовали при L/P ~ 50. При таких соотношениях липид : белок большая часть молекул липида находится в связанном с белком состоянии, и в белок-липидной системе краситель сорбируется, в основном, на поверхности белок-липидного комплекса. Оптическую плотность растворов измеряли на спектрофотометре СФ-46.

Результаты и обсуждение. Связывание БТС с метгемоглобином и липосомами сопровождается уменьшением интенсивности спектральной полосы с максимумом при 615 нм. Как следует из таблицы, сорбция БТС на поверхности белка мало зависит от ионной силы, что согласуется с литературными данными о преимущественном вкладе гидрофобных взаимодействий в стабилизацию комплекса БТС с метгемоглобином [10]. Наряду с этим экранирование отрицательного заряда ФС и КЛ при повышении концентрации соли приводит к усилению связывания красителя с липосомами. В белок-липидной системе метге-

метгемоглобин — ФХ : КЛ увеличение ионной силы практически не влияло на связывание БТС, а в системе метгемоглобин — ФХ : ФС приводило к усилению сорбции красителя (таблица). Можно предположить, что при взаимодействии метгемоглобина с липосомами из ФХ и ФС структурное состояние белка существенно не изменяется, и при повышении ионной силы сорбция БТС в белок-липидной системе возрастает за



Зависимости изменения оптической плотности при 615 нм от концентрации БТС: 1 — метгемоглобин, $1 \cdot 10^{-5}$ М; 2 — ФХ:КЛ, $2 \cdot 10^{-4}$ М; 3 — ФХ : ФС, $2 \cdot 10^{-4}$ М; 4 — метгемоглобин — ФХ : КЛ; 5 — метгемоглобин — ФХ : ФС

Plots of the optical density change at 615 nm vs the concentration of bromthymol blue: 1 — methemoglobin, $1 \cdot 10^{-5}$ M; 2 — phosphatidylcholine: cardiolipin, $2 \cdot 10^{-4}$ M; 3 — phosphatidylcholine: phosphatidylserine, $2 \cdot 10^{-4}$ M; 4 — methemoglobin — PC : CL; 5 — methemoglobin — PC : PS

Относительное изменение оптической плотности БТС ($5 \cdot 10^{-5}$ М) при 615 нм (%)
Relative change of the bromthymol blue ($5 \cdot 10^{-5}$ M) optical density at 615 nm (%)

Система	0,01 М трис-НСl-буфер, рН 7,4	0,01 М трис-НСl-буфер, рН 7,4, 0,15 М NaCl
Метгемоглобин, $4 \cdot 10^{-6}$ М	17±3	19±4
Липосомы, ФХ : КЛ (3 : 1) $2 \cdot 10^{-4}$ М	15±2	32±3
Липосомы, ФХ : ФС (3 : 1) $2 \cdot 10^{-4}$ М	35±4	49±3
Метгемоглобин — ФХ : КЛ (3 : 1)	70±4	70±4
Метгемоглобин — ФХ : ФС (3 : 1)	53±4	63±3

счет усиления связывания красителя с липосомами. Вместе с тем взаимодействие метгемоглобина с везикулами из ФХ и КЛ, по-видимому, сопровождается изменением конформации белка

и возникновением дополнительных центров сорбции красителя, в состав которых, кроме неполярного фрагмента белковой молекулы, входят катионные группы [11]. Таким образом, в системе метгемоглобин—ФХ : КЛ в отличие от свободного белка увеличение ионной силы приведет к снижению связывания красителя с белком и к усилению связывания БТС с липосомами. Вероятно, взаимная компенсация вкладов этих двух факторов и обуславливает характер влияния ионной силы на сорбцию БТС в системе метгемоглобин — ФХ : КЛ.

Для оценки параметров связывания красителя с нативным метгемоглобином и метгемоглобином, образующим комплекс с фосфолипидами, использовали зависимости изменения оптической плотности при 615 нм (ΔD_{615}) от концентрации БТС (рисунок). При нейтральных рН раствор БТС представляет собой смесь кислой (BТС^-) и щелочной (BТС^{2-}) форм [10]. Известно, что при взаимодействии БТС с метгемоглобином и фосфолипидами rK_a красителя повышается [10, 14]. В результате уменьшается концентрация BТС^{2-} и снижается интенсивность спектральной полосы с максимумом при 615 нм, характерной для двухзарядной формы красителя [10]. Изменение поглощения ΔD_{615} связано с количеством сорбированного красителя $[\text{BТС}]_{\text{адс}}$ соотношением [13]:

$$\Delta D_{615} = \frac{[\text{BТС}]_{\text{адс}}}{1 + [\text{H}^+]/K} \cdot \varepsilon,$$

где K — константа диссоциации формы BТС^- ; $[\text{H}^+]$ — концентрация ионов водорода; $\varepsilon = 2,25 \cdot 10^4 \text{ М}^{-1} \text{ см}^{-1}$ — молярный коэффициент экстинкции щелочной формы БТС при 615 нм [10].

Зависимость ΔD_{615} (БТС) для красителя, сорбированного на поверхности метгемоглобина, входящего в состав комплекса с фосфолипидами, получали следующим образом. Из величины ΔD_{615} , характеризующей сорбцию красителя в белок-липидной системе (рисунок, кривые 4, 5) вычитали ΔD_{615} красителя, связанного с немодифицированными липосомами (кривые 2, 3). Оказалось, что взаимодействие метгемоглобина с липосомами из ФХ и ФС практически не влияет на сорбцию БТС белком. Это согласуется с высказанным ранее предположением о том, что в данном случае образование белок-липидного комплекса не вызывает существенной перестройки структуры белка. Вместе с тем при связывании метгемоглобина с липосомами из ФХ и КЛ сорбция БТС значительно возрастала. Параметры сорбции красителя — число участков связывания (n) и константу ассоциации (K_a) — оценивали по методу Скетчарда [2], определяя количество сорбированного БТС с помощью соотношения [1]. Для нативного метгемоглобина параметры связывания составляли: $n \sim 5$; $K_a \sim 6 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$ а для метгемоглобина, образующего комплекс с липосомами (ФХ:КЛ), — $n \sim 20$; $K_a \sim 6 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$. Из этих данных следует, что изменение топографии поверхности метгемоглобина при его взаимодействии с фосфолипидами приводит к увеличению числа центров связывания БТС в ~ 4 раза. Поскольку при нейтральных рН нативный гемоглобин связывается преимущественно с однозарядной формой БТС [10], весьма вероятно, что наблюдаемое усиление сорбции БТС обусловлено формированием центров, способных взаимодействовать как с однозарядной, так и с двухзарядной формами красителя [11, 12].

Таким образом, проведенное исследование сорбции БТС компонентами модельной белок-липидной системы показало, что взаимодействие метгемоглобина с липосомами из ФХ и КЛ сопровождается существенной перестройкой структуры белка, тогда как образование комплекса между метгемоглобином и липосомами из ФХ и ФС не вызывает заметных изменений конформации белковой молекулы.

INFLUENCE OF PHOSPHOLIPIDS ON BROMTHYMOL BLUE BINDING TO METHEMOGLOBIN

G. P. Gorbenko

State University, Kharkov

Summary

The binding of bromthymol blue to methemoglobin during protein-lipid complex formation has been investigated. The methemoglobin interaction with liposomes consisting of phosphatidylcholine and cardiolipin mixture is shown to be followed by considerable changes of the protein conformation.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Кожев С. В. Структурная лабильность биологических мембран и регуляторные процессы.— Минск: Наука и техника, 1987.— 240 с.
2. Левин С. В. Структурные изменения клеточных мембран.— Л.: Наука, 1976.— 224 с.
3. Benga G. Interactions between components in biological membranes and their implications for membrane function // *Progr. Biophys. Mol. Biol.*— 1984.— 43, N 3.— P. 195—237.
4. Interaction of different forms of hemoglobin with artificial lipid membranes / L. Bossi, S. Alema, P. Calissano, E. Marra // *Biochim. et biophys. acta.*— 1975.— 375, N 3.— P. 477—482.
5. Shviro I., Zilber I., Shaklai N. The interaction of hemoglobin with phosphatidylserine vesicles // *Ibid.*— 1982.— 687, N 1.— P. 63—70.
6. Shaklai H., Yguerabide J., Ranney H. Classification and localization of hemoglobin binding sites on the red blood cell membranes // *Biochemistry.*— 1977.— 16, N 25.— P. 5593—5597.

Окончание см. на 3-й с. обложки.

Окончание. Начало см. на с. 103—105.

7. Изучение взаимодействия метгемоглобина с фосфолипидными бислойнными мембранами методом флуоресценции / И. П. Ушакова, И. А. Василенко, Г. А. Серебряникова, Р. П. Евстигнеева // Биоорг. химия.— 1981.— 7, № 4.— С. 613—620.
8. 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.
9. Кейтс М. Техника липидологии.— М.: Мир, 1975.— 322 с.
10. The interaction of bromthymol blue with hemoglobin and its effect on the oxygen equilibrium / E. Antonini, J. Wyman, R. Moretti, R. A. Flanelli // Biochim. et biophys. acta.— 1963.— 71, N 1.— P. 124—138.
11. Варецкая Т. В., Рябоконь Р. М. О взаимодействии белков с аннонами бромтимолового синего // Укр. биохим. журн.— 1960.— 32, № 4.— С. 507—515.
12. Белицер В. А., Варецкая Т. В. Связывание красителей белками в нативном, денатурированном и химически модифицированном состоянии // Там же.— 1959.— 31, № 2.— С. 171—185.
13. Colonna R., Dell'Antone P., Azzone C. Binding changes and apparent pK shifts of bromthymol blue as tools for mitochondrial reactions // Arch. Biochem. and Biophys.— 1972.— 151, N 1.— P. 295—303.
14. Mashimo T., Uede I. Hydrophilic region of lecithin membranes studied by bromthymol blue and effects of an inhalation anesthetic, enflurane // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.— 1979.— 76, N 10.— P. 5114—5118.

Харьк. гос. ун-т

Получено 25.10.89