



УДК 547.963.4.04+547.915.5.04

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ГЕМОГЛОБИНА С БИСЛОЙНЫМИ
ФОСФОЛИПИДНЫМИ МЕМБРАНАМИ*Ушакова И. П., Василенко И. А., Серебрянникова Г. А.,
Евстигнеева Р. П.**Московский институт тонкой химической технологии им. М. В. Ломоносова*

Изучено взаимодействие гемоглобина с везикулярными мембранами, построенными из фосфолипидов различных классов и холестерина. Показано, что добавление фосфатидилэтаноламина, дифосфатидилглицерина и холестерина к фосфатидилхолину увеличивает степень связывания белка. Наибольшее количество гемоглобина встраивается в везикулы, состоящие из дифосфатидилглицерина.

В настоящее время значительное внимание уделяется изучению взаимодействия хромопротеидов с искусственными фосфолипидными мембранами [1—6]. При изучении липид-белкового взаимодействия важной проблемой является исследование специфичности белка к фосфолипидной мембране определенного состава. Описано встраивание гемоглобина в везикулы, полученные из различных фосфолипидных смесей [7]. Однако в литературе вопрос о необходимости особой липидной мембраны для встраивания хромопротеидов освещен недостаточно.

Данная работа посвящена количественному изучению взаимодействия гемоглобина с везикулярными мембранами, построенными из фосфолипидов различных классов. Гемоглобин удобен для подобного рода исследований, поскольку обладает интенсивной окраской, облегчающей контроль за проведением колоночной хроматографии; гидрофильностью, обуславливающей незначительное встраивание; изоэлектрической точкой в диапазоне рН 7,2—7,6 [8] для дезоксиформы и рН 6,2 для оксигемоглобина [9].

Для образования везикулярных мембран выбраны отдельные типы фосфолипидов, характеризующиеся различными кислотно-основными свойствами: фосфатидилхолин, фосфатидилэтаноламин, дифосфатидилглицерин, а также холестерин.

После обработки ультразвуком смеси водного раствора гемоглобина с диспергированными липидами в системе могут находиться: везикулы, связанные с гемоглобином, свободные везикулы, комплексы гемоглобина с сорбированными на его поверхности молекулами липида, свободный гемоглобин. Для разделения этой смеси использовалась гель-фильтрация на сефарозе 4В (рис. 1). Интервал фракционирования белков по молекулярному весу для сефарозы 4В составляет $6 \cdot 10^4$ — $20 \cdot 10^6$. Это позволяет произвести не только отделение липосом от избытка гемоглобина, но и разделение липосом согласно их геометрическим размерам. Длительность опыта в нашем случае не превышала 1 ч. Малый свободный объем сефарозной колонки (8—10 мл) и значительный объем жидкости внутри геля, доступный малым молекулам (40—42 мл), позволяют получить полное отделение

везикул от избытка гемоглобина при использовании нагрузок порядка 200 мг в 2 мл буфера. Чтобы исключить присутствие свободных везикул и достигнуть насыщения фосфолипидного объема гемоглобином, выбрано весовое соотношение липид — белок 1 : 5.

Характеристика исследуемых белок-липидных комплексов проводилась с помощью следующих параметров: 1) отношение количества гемоглобина и липидного фосфора, присутствующих в везикулярных фракциях Нв/Р (рис. 2); 2) суммарное количество связанного с везикулами гемоглобина Σ Нв (рис. 3). Эта величина меняется в зависимости от состава везикулы, указывая своим максимумом на оптимальное соотношение отдельных типов липидов в везикуле, обеспечивающее максимальное связывание гемоглобина; 3) отношение количества фосфора, определяемого в комплексе везикула — гемоглобин, к суммарному количеству фосфора, присутствующему во фракциях везикула — гемоглобин, свободный гемоглобин и гемоглобин с сорбированными молекулами фосфолипидов, $\Sigma P_1/\Sigma P$ (рис. 4). Это отношение меняется в зависимости от состава везикулярных липидов, характеризует степень связывания везикул с гемоглобином и сорбцию липида на поверхности гемоглобина.

В качестве основного липида всех анализируемых смесей был выбран фосфатидилхолин — важный структурный компонент биологических мембран.

Сравнительное изучение связывания гемоглобина с везикулами, построенными из смесей фосфатидилхолина и фосфатидилэтаноламина, показало, что добавление последнего увеличивает степень связывания гемоглобина. Об этом свидетельствует восходящий характер зависимости Нв/Р от процентного содержания фосфатидилэтаноламина в смеси, что можно, по-видимому, объяснить уменьшением электростатического отталкивания между липидом и белком (рис. 2, 3).

Существование максимума на графике зависимости суммарного количества гемоглобина, связанного с везикулами, от количества фосфатидилэтаноламина в смеси (рис. 3, 3) объясняется, вероятно, увеличением сродства гемоглобина к фосфолипидной мембране, с одной стороны, и перераспределением фосфолипидов между везикулами и гемоглобином — с другой, т. е. уменьшением количества фосфолипидов, образующих везикулы. Об этом свидетельствуют данные элюирования при гель-фильтрации (рис. 4).

Наибольшее суммарное количество гемоглобина связывается с везикулярной мембраной, состоящей из 20—25% фосфатидилэтаноламина и 80—75% фосфатидилхолина, тогда как максимальное соотношение Нв/Р характерно для везикул, образованных из смеси тех же липидов, 1 : 1, но в этом случае значительна сорбция фосфолипидов гемоглобином (рис. 4, 1).

Кроме того, изучалось взаимодействие гемоглобина с везикулярными мембранами, содержащими дифосфатидилглицерин, находящийся в анионной форме. Следует отметить резкий подъем на графике зависимости Нв/Р от содержания дифосфатидилглицерина, соответствующий 16-кратному увеличению значения этого параметра для везикул из 100% этого липида по сравнению с везикулами из 100% фосфатидилхолина (рис. 2, 1). Такое значительное увеличение связывания гемоглобина по мере повышения концентрации дифосфатидилглицерина, по-видимому, обусловлено постепенным нарастанием при этом отрицательного заряда у везикул. Мембраны, построенные из дифосфатидилглицерина, связывают 59% гемоглобина по отношению к общему весу липид-белкового комплекса.

Этот фосфолипид образует устойчивые везикулы, однако проведенные опыты показывают, что 93% его при связывании гемоглобина с везикулами, состоящими из 100% дифосфатидилглицерина, сорбируется белком, а 7% взаимодействует с гемоглобином в везикулярной форме (рис. 4, 2). Этим можно объяснить относительно малое количество гемоглобина, свя-

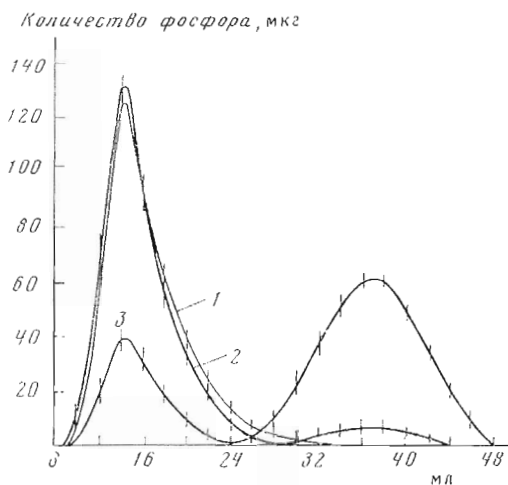


Рис. 1. Гель-фильтрация на сефарозе 4В продуктов взаимодействия гемоглобина с везикулярными мембранами, состоящими из смесей фосфатидилхолин - фосфатидилэтанолламин: 1 - 1:0; 2 - 3:1; 3 - 1:1

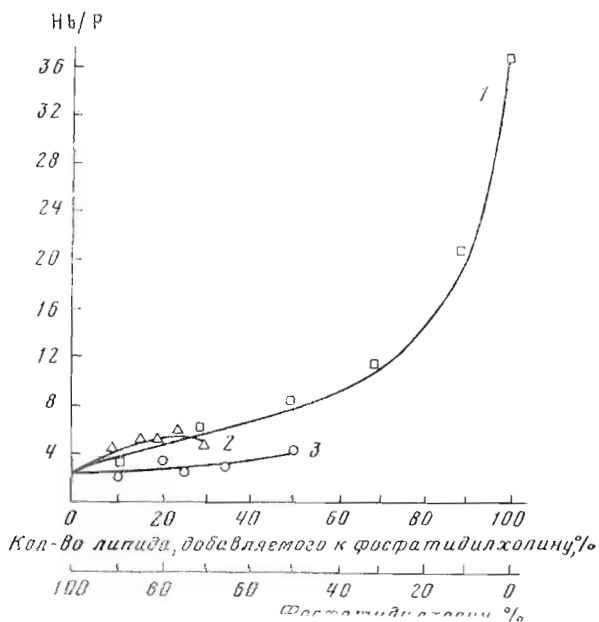


Рис. 2. Изменение отношения Hb/P в зависимости от липидного состава везикул: 1 - фосфатидилхолин - дифосфатидилглицерин; 2 - фосфатидилхолин - холестерин; 3 - фосфатидилхолин - фосфатидилэтанолламин

занного с дифосфатидилглицериновыми везикулами. График зависимости ΣHb от содержания дифосфатидилглицерина в липидной смеси имеет четкий максимум при 70% фосфолипида (рис. 3, 1).

Общий вид зависимостей Hb/P, ΣHb , $\Sigma P_L / \Sigma P$ (рис. 2-4) от содержания дифосфатидилглицерина в смеси аналогичен зависимостям, полученным для везикул, состоящих из фосфатидилхолина и фосфатидилэтанолламина, но характеризуется большей крутизной и значительно большей амплитудой.

Так как холестерин является одним из компонентов биологических мембран, нами было изучено связывание гемоглобина с везикулами, со-

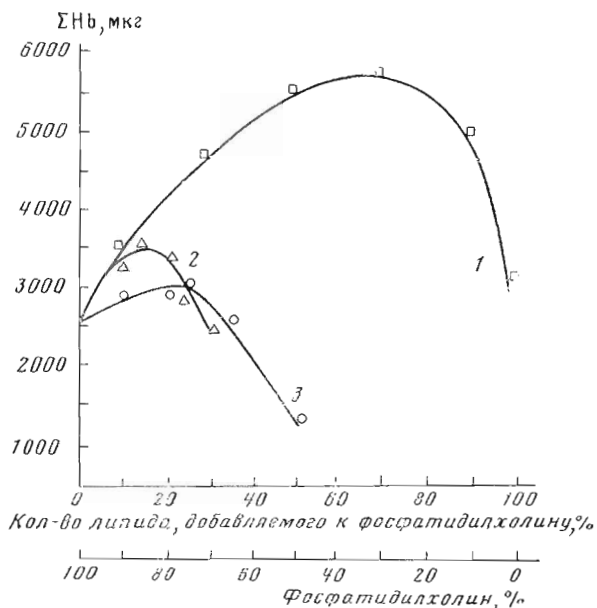


Рис. 3. Изменение количества связанного с везикулами гемоглобина в зависимости от липидного состава везикул: 1 – фосфатидилхолин – дифосфатидилглицерин; 2 – фосфатидилхолин – холестерин; 3 – фосфатидилхолин – фосфатидилэтанолламин

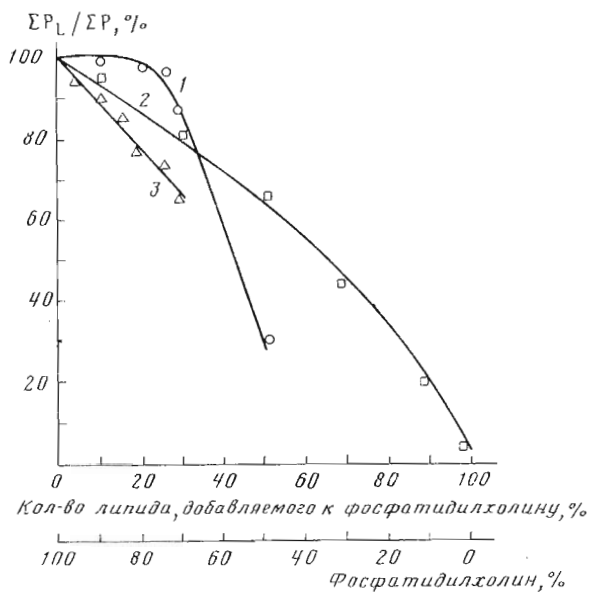


Рис. 4. Изменение $\Sigma P_L / \Sigma P$ в зависимости от липидного состава везикул: 1 – фосфатидилхолин – фосфатидилэтанолламин; 2 – фосфатидилхолин – дифосфатидилглицерин; 3 – фосфатидилхолин – холестерин

стоящими из фосфатидилхолина и холестерина. Показано, что добавление холестерина увеличивает связывание гемоглобина по сравнению с везикулами, состоящими из одного фосфатидилхолина. При этом установлено, что максимальное связывание белка наблюдается с везикулами, содержащими 15% холестерина в липидной смеси (рис. 3, 2), а график зависимости $\Sigma Hb/P$ от содержания холестерина в липидной смеси (рис. 2, 2) харак-

теризуется максимумом при добавлении 25% холестерина, что согласуется с литературными данными [7].

Кроме встраивания гемоглобина в фосфолипидную мембрану посредством ультразвука нами для получения белок-липидного комплекса использовался метод инкубации гемоглобина с предварительно приготовленными везикулами. Общий характер зависимостей ΣHb и Hb/P аналогичен ранее рассмотренным. Следует отметить, что количество связанного гемоглобина меньше приблизительно в 2 раза.

Проведены исследования по встраиванию гемоглобина в многослойные липосомы при механическом диспергировании суспензии фосфолипид — белок в водном буфере. Процесс сопровождается приблизительно 1,5-кратным увеличением значений ΣHb и Hb/P для всех проведенных опытов по сравнению с везикулярными мембранами. Этот факт можно объяснить большими геометрическими размерами и многослойностью липосом [10].

Экспериментальная часть

Для создания бислошной везикулярной мембраны использовали фосфатидилхолин и фосфатидилэтаноламин, выделенные из желтков яиц и очищенные колоночной хроматографией на окиси алюминия и силикагеле [11], дифосфатидилглицерин, выделенный из бычьих сердец [12], продажный холестерин очищали перекристаллизацией из этанола. Гемоглобин человека, выделенный по методу [13], содержал 5–10% метгемоглобина, его использовали в оксигенированной форме.

Бислошные везикулярные мембраны со связанным гемоглобином готовили путем смешения липидов, полученных упариванием их растворов в бензоле в вакууме досуха, и раствора гемоглобина в воде (весовое отношение липид — гемоглобин 1 : 5). Образец встряхивали 10 мин и полученную грубую дисперсию обрабатывали ультразвуком на приборе УЗДН-1 (частота 44 кГц) в течение 6 мин при 0° С.

Инкубация с бислошными фосфолипидными мембранами, приготовленными как описано ранее [10], проводилась при 20° С в течение 2 ч.

Для встраивания гемоглобина в многослойные липосомы смесь фосфолипидов с раствором белка механически встряхивали в течение 1 ч при 20° С.

Полученные смеси затем центрифугировали 10 мин при 10 000 g и разделяли гель-фильтрацией на сефарозе 4В (Pharmacia, Швеция) в колонке размером 15×500 мм. Элюирование при гель-фильтрации осуществляли буфером, pH 7,4, содержащим 5 мМ трис-HCl и 1 мМ EDTA.

Концентрацию гемоглобина, связанного с везикулами, определяли по методу Лоури [14]. При добавлении реактива Фолина вследствие осмотического шока везикулы лопались, и перед измерением образцы центрифугировали в течение 10 мин при 10 000 g.

Содержание фосфора в образцах и весовую концентрацию фосфолипидов определяли с помощью модифицированного метода Барглетта [15].

Спектрофотометрические измерения по определению количеств белка и фосфора проводили на спектрофотометре Hitachi EPS-3T (Япония).

ЛИТЕРАТУРА

1. Broun L. R., Wüthrich K. (1977) *Biochim. et biophys. acta*, 468, 389–410.
2. Falk K.-E., Karlsson B. (1979) *FEBS Lett.*, 98, 25–28.
3. Blok M. C., Hellingwerf K. J., Kaptein R., Kruijff B. (1978) *Biochim. et biophys. acta*, 514, 178–184.
4. Cannon J. B., Erman J. E. (1978) *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, 84, 254–260.
5. Roseman M. A., Holloway P. W., Calabro M. A. (1978) *Biochim. et biophys. acta*, 507, 552–556.
6. Bossi L., Alema S., Calissano P., Marra E. (1975) *Biochim. et biophys. acta*, 375, 477–482.

7. Miller I., Djordjevich L. (1977) Пат. № 2725696 (ФРГ), МКИ А 61 К 37/14, заявл. 7.6.77, опубл. 22.12.77.
8. Розенберг Г. Я., Хачатурьян А. А., Шлимак В. М. (1979) Пробл. гематол. и перелив. крови, 24, 3-10.
9. Шаронов Ю. А., Шаронова Н. А. (1975) Молекулярн. биология, 9, 145-172.
10. Huang C. (1969) Biochemistry, 8, 341-351.
11. Dawson R. M. S. (1963) Biochem. J., 88, 414-420.
12. Rose H. C. (1964) Biochim. et biophys. acta, 84, 109-115.
13. Розенберг Г. Я., Поляшина Т. В., Федоров Н. А., Козинер В. Б., Гроздов Д. М. (1976) в кн.: Проблемы гематологии и трансфузиологии, т. 1, с. 129-141, юбил. сб. научн. работ ЦНИИГПК, М.
14. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. (1951) J. Biol. Chem., 95, 416-423.
15. Bartlett C. R. (1959) J. Biol. Chem., 234, 466.

Поступила в редакцию
28.XI.1979

INTERACTION OF HAEMOGLOBIN WITH BILAYER PHOSPHOLIPID MEMBRANES

USHAKOVA I. P., VASILENKO I. A., SEREBRENNIKOVA G. A.,
EVSTIGNEEVA R. P.

M. V. Lomonosov Institute of Fine Chemical Technology, Moscow

The interaction of haemoglobin with artificial membranes, prepared from mixtures of different phospholipids and cholesterol was studied. Addition of phosphatidylethanolamine, diphosphatidylglycerol and cholesterol to phosphatidylcholine was shown to increase the degree of haemoglobin binding. The largest quantity of haemoglobin was incorporated into diphosphatidylglycerol vesicles.