



УДК 547.96:541.6

**ИЗУЧЕНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ МЕТГЕМОГЛОБИНА
С МОДЕЛЬНЫМИ МЕМБРАНАМИ МЕТОДОМ
СПЕКТРОСКОПИИ ³¹P-ЯМР***Чупин В. В., Ушакова И. П., Бондаренко С. В.,
Василенко И. А., Серебренникова Г. А., Евстигнеева Р. П.**Московский институт тонкой химической технологии им. М. В. Ломоносова**Розенберг Г. Я., Кольцова Г. Н.**Центральный научно-исследовательский институт
гематологии и переливания крови, Москва*

Методом спектроскопии ³¹P-ЯМР изучено взаимодействие метгемоглобина с модельными мембранами, содержащими нейтрально заряженные фосфолипиды. Показано, что метгемоглобин дестабилизирует структуру липидного бислоя и увеличивает его проницаемость. Предложена модель взаимодействия метгемоглобина с мембраной.

Изучение липид-белкового взаимодействия является одной из центральных задач современной мембранологии. Накопленные к настоящему времени экспериментальные данные убедительно свидетельствуют о том, что функциональная активность многих мембранных белков зависит от того, находится ли фосфолипидный бислой в состоянии геля или в жидкокристаллическом состоянии (см. обзор [1]). Однако объяснение регуляторной функции липидов с позиции фазового перехода гель — жидкий кристалл не всегда правомерно, так как в подавляющем большинстве случаев липидный бислой биологических мембран при физиологических условиях находится только в жидкокристаллическом состоянии.

В последние годы появилась новая концепция, объясняющая регуляторное действие липидов на функционирование биологических мембран [2]. Суть данной концепции заключается в следующем: бислой не является единственно возможной формой организации липидов в мембранах; в биологических мембранах могут присутствовать локальные участки небислойной структуры (типа внутримембранных частиц «липидной природы» [3]), оказывающие влияние на функциональную активность мембран. Данные положения уже нашли отчасти экспериментальное подтверждение. Модельные исследования полиморфизма гидратированных липидных систем показали, что многие фосфолипиды (фосфатидилэтаноламин [4], дифосфатидилглицерин [3], сфингомиелин [5], фосфатидилхоллин [6]) могут образовывать в воде агрегаты не только ламеллярной (бислойной) структуры, но и гексагональной. Более того, показано, что присутствие в мембране локальных участков гексагональной фазы оказывает заметный эффект на такие процессы, как слияние мембран [7], трансбислойное движение фосфолипидов [8], эндо- и экзоцитоз [2]. К сожалению, работ, посвященных изучению липид-белкового взаимодействия с позиций полиморфизма, в литературе пока еще практически не представлено.

В связи с вышесказанным представлялось целесообразным исследовать влияние гемоглобина на полиморфизм липидных мембран. Изучение липид-белкового взаимодействия на примере гемоглобина интересно не только с точки зрения выяснения функциональных особенностей эритроцитарной

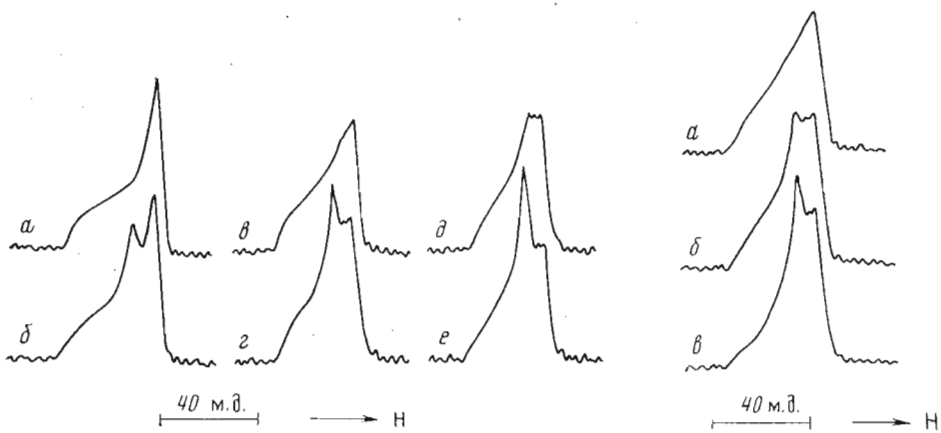


Рис. 1

Рис. 2

Рис. 1. Спектры ^{31}P -ЯМР неозвученных водных дисперсий яичного фосфатидилхолина (а, б), смеси яичных фосфатидилхолина и фосфатидилэтаноламина, 2:1 (в, г) и 1:1 (д, е). Липосомы получены в отсутствие (а, в, д) и в присутствии метгемоглобина (б, г, е). Спектры сняты при 40°C

Рис. 2. Спектры ^{31}P -ЯМР неозвученной водной дисперсии смеси фосфатидилхолин — фосфатидилэтаноламин, 2:1: без метгемоглобина (а), через 60 (б) и 120 мин (в) после добавления к дисперсии раствора метгемоглобина. Инкубацию и съемку спектров проводили при 40°C

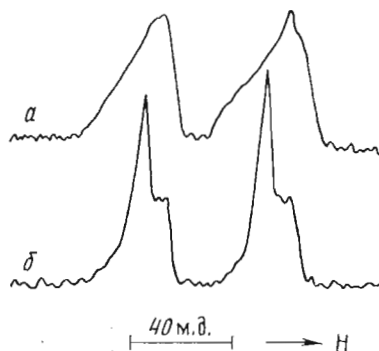
мембраны, но и в плане исследований по созданию искусственных эритроцитов. На первых этапах работы нами было изучено взаимодействие с мембранами метгемоглобина — стабильной формы белка. В дальнейшем планируется расширить данные исследования и на функционально активную форму гемоглобина — оксигемоглобин. В качестве метода исследования была выбрана спектроскопия ^{31}P -ЯМР, позволяющая надежно следить за структурными изменениями в фосфолипидном бислое, не оказывая при этом возмущающих воздействий на объект исследования [2–7].

В данной работе представлены результаты, полученные нами при изучении взаимодействия метгемоглобина с липосомными мембранами, построенными из нейтрально заряженных фосфолипидов: яичного фосфатидилхолина, смесей яичных фосфатидилхолина и фосфатидилэтаноламина, 2:1 и 1:1. Во всех случаях было обнаружено, что метгемоглобин нарушает структуру бислоя липосомных мембран.

Так, в случае липосомных мембран, сформированных из фосфатидилхолина в отсутствие метгемоглобина, в спектре ^{31}P -ЯМР наблюдается сигнал (рис. 1а), отвечающий агрегатам ламеллярной структуры: сигнал имеет плечо, направленное в сторону слабого поля; анизотропия химического сдвига составляет 48 м.д. В спектре ^{31}P -ЯМР липосом, полученных в присутствии метгемоглобина, имеется дополнительный узкий «изотропный» пик (рис. 1б). Такой узкий симметричный пик отвечает фосфолипидным молекулам, способным к быстрому (во временной шкале ^{31}P -ЯМР) изотропному движению [2], и свидетельствует о нарушении структуры липидного бислоя. Аналогичный, но еще более ярко выраженный эффект метгемоглобин оказывает на структуру липосом, полученных из смеси фосфатидилхолина и фосфатидилэтаноламина (рис. 1в–е), причем интенсивность «изотропного» сигнала возрастает при увеличении содержания фосфатидилэтаноламина. Интересно также, что интенсивность узкого симметричного пика в спектрах липосом, содержащих метгемоглобин, зависит от температуры: его интенсивность при понижении температуры уменьшается; около 5°C «изотропный» пик практически полностью исчезает.

Метгемоглобин является водорастворимым белком, поэтому в случае липосомных дисперсий, полученных в присутствии метгемоглобина, моле-

Рис. 3. Спектры ^{31}P -ЯМР неозвученной водной дисперсии эквимольной смеси фосфатидилэтаноламина и 1,2-дипальмитонил-*гас*-глицеротионфосфохолина в отсутствие (а) и в присутствии (б) метгемоглобина. Спектры сняты при 40°C



кулы белка равномерно распределены в наружном и внутреннем водном пространстве липосом. Если же метгемоглобин добавить только во внешний объем липосомной дисперсии, то молекулы белка будут отделены от внутреннего водного пространства липосом рядом концентрических липидных бислоев. Метгемоглобин будет контактировать лишь с липидами, образующими внешний монослой липосом. Учитывая, что доля таких липидов в липосомах весьма незначительна, можно ожидать в данном случае отсутствия заметных полиморфных перестроек в липосомных мембранах под действием метгемоглобина. Такой вывод нашел и экспериментальное подтверждение (рис. 2б): в спектре ^{31}P -ЯМР имеется «изотропный» сигнал, но интенсивность его невелика. С течением времени, однако, интенсивность этого сигнала возрастает и в конечном итоге спектр ^{31}P -ЯМР (рис. 2в) имеет такие же параметры, как спектр липосом, полученных в присутствии метгемоглобина (рис. 1г). Эти результаты можно легко объяснить, предположив, что структурные изменения, индуцированные метгемоглобином в мембране, делают бислои проницаемым для молекул белка и метгемоглобин мигрирует во внутренние области липосом, взаимодействуя со все большим количеством липидных молекул.

Особый интерес при изучении липид-белкового взаимодействия представляет вопрос о специфичности взаимодействия белков и липидов. Использование спектроскопии ^{31}P -ЯМР для решения этой проблемы сопряжено с целым рядом трудностей, главная из которых заключается в невозможности получения информации о поведении отдельных, химически индивидуальных липидов в составе многокомпонентных мембран. Как нами было показано ранее [9, 10], эту проблему можно решить при использовании тионфосфолипидов. Тионфосфолипиды представляют собой синтетические аналоги фосфолипидов природной структуры, у которых атом кислорода в фосфатном остатке замещен на серу. Химические сдвиги ядер ^{31}P тионфосфолипидов и фосфолипидов природной структуры различаются более чем на 50 м.д. Это позволяет дифференцировать тионфосфолипиды с помощью метода ^{31}P -ЯМР даже в составе липосомных и биологических мембран, где ширина сигналов достигает 50 м.д.

Специфичность взаимодействия метгемоглобина с липидами липосомных мембран изучалась нами на примере эквимольной смеси яичного фосфатидилэтаноламина и 1,2-дипальмитонил-*гас*-глицеротионфосфохолина. По данным ^{31}P -ЯМР, эта липидная смесь в отсутствие метгемоглобина образует в воде агрегаты ламеллярной структуры: каждый из сигналов имеет плечо, направленное в сторону слабого поля, анизотропия химического сдвига составляет величину порядка 40 м.д. (рис. 3а). Метгемоглобин вызывает появление в спектре ^{31}P -ЯМР дополнительных узких симметричных пиков (рис. 3б). Это указывает на нарушение бислоевой организации липидов в мембране и образование в бислое локальных участков изотропной фазы. При этом изменяются параметры сигналов, отвечающих как

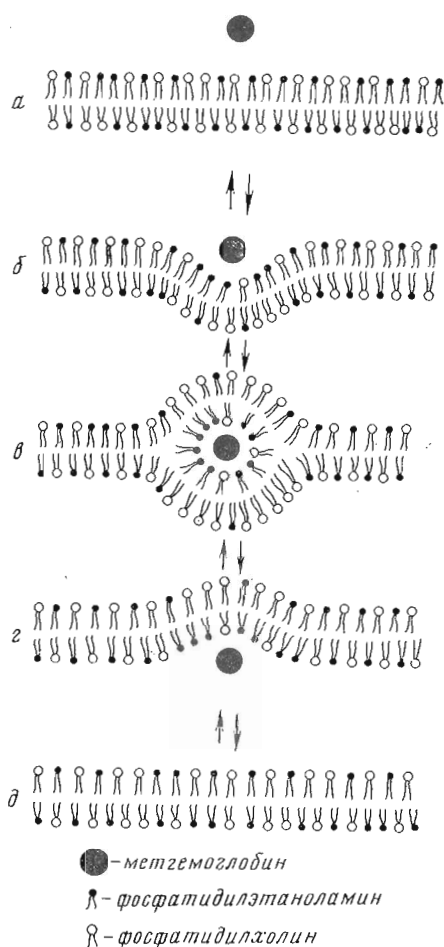


Рис. 4. Модель взаимодействия метгемоглобина с мембраной, содержащей фосфатидилхолин и фосфатидилэтаноламин

имеет значительно меньший размер полярного участка молекулы по сравнению с фосфатидилхолином. Это приводит к тому, что стерические факторы способствуют локализации молекул фосфатидилэтанолamina внутри инвертированных мицелл (рис. 4в). Молекулы же фосфатидилхолина располагаются преимущественно снаружи инвертированных мицелл. Кроме того, такой механизм взаимодействия метгемоглобина с мембраной хорошо объясняет способность молекул белка диффундировать через липидный бислой.

Очевидно, что если взаимодействие метгемоглобина с мембранами действительно происходит по схеме, изображенной на рис. 4, то проницаемость фосфолипидного бислоя для различных веществ и ионов в присутствии этого белка должна увеличиваться, что подтверждается литературными данными. Ранее было показано [12], что скорость диффузии катионов через мембрану заметно возрастает в присутствии метгемоглобина. Для подтверждения предложенной модели взаимодействия метгемоглобина с липидным бислоем (рис. 4) нами были проведены дополнительные эксперименты по изучению влияния метгемоглобина на диффузию через липосомную мембрану ионов Mn^{2+} .

Известно [13], что ионы Mn^{2+} при контакте с липидными молекулами вызывают значительное упирение сигналов в спектрах ^{31}P -ЯМР. Если ионы Mn^{2+} способны диффундировать через бислой, то они по мере проникновения во внутреннее водное пространство липосом вступают во

фосфатидилэтаноламину, так и тионфосфатидилхолину. Таким образом, в состав изотропной фазы, образованной за счет действия на бислой метгемоглобина, практически в равной степени входят и фосфатидилэтаноламин, и тионфосфатидилхолин.

Интересно, что представленные в данной работе результаты во многом аналогичны данным, полученным при изучении взаимодействия цитохрома с с модельными мембранами [11]. Голландскими исследователями было показано, что цитохром с оказывает дестабилизирующее действие на липидный бислой, которое выражается в появлении в спектрах ^{31}P -ЯМР узких, «изотропных» сигналов. Исходя из данных спектроскопии ^{31}P -ЯМР и электронной микроскопии была предложена модель взаимодействия цитохрома с с мембраной [11], которая, на наш взгляд, справедлива и в случае метгемоглобина (рис. 4).

Молекула метгемоглобина адсорбируется на поверхности фосфолипидного бислоя и индуцирует образование в мембране локальных участков, характеризующихся значительной кривизной (рис. 4б—г). Значительная кривизна таких участков обуславливает появление в спектрах ^{31}P -ЯМР узких симметричных сигналов [3]. С позиций данной модели становится понятным и тот факт, что метгемоглобин индуцирует изменения в полиморфном состоянии как фосфатидилэтанолamina, так и фосфатидилхолина. Фосфатидилэтаноламин

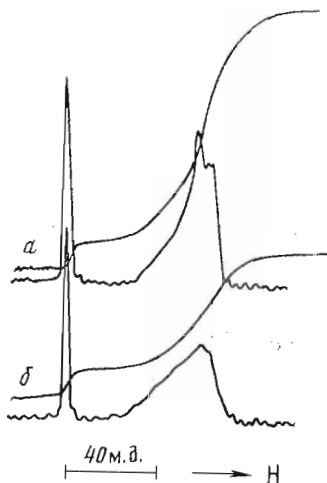


Рис. 5

Рис. 5. Спектры ^{31}P -ЯМР и интегральные интенсивности сигналов неозвученной водной дисперсии смеси фосфатидилхолин – фосфатидилэтаноламин, 2 : 1, полученной в присутствии метгемоглобина, до (а) и после (б, время инкубации 180 мин) добавления ионов Mn^{2+} (10^{-3} М). Внешний стандарт – хлороформный раствор тиофосфатидилолина. Инкубацию и съемку спектров проводили при 40°C

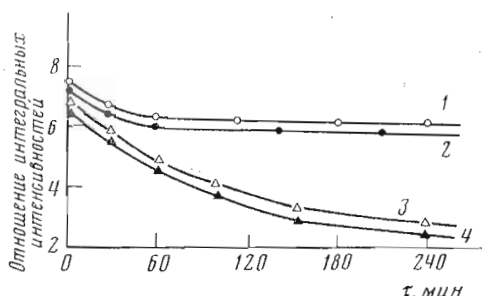


Рис. 6

Рис. 6. Зависимости изменения интегральных интенсивностей сигналов в спектрах ^{31}P -ЯМР неозвученных водных дисперсий смеси фосфатидилхолин – фосфатидилэтаноламин, 2 : 1, после добавления во внешний объем 10^{-3} М Mn^{2+} . Изменения интегральных интенсивностей регистрировали относительно сигнала хлороформного раствора тиофосфатидилолина (внешний стандарт): 1 – липосомы без метгемоглобина, инкубация при 40°C ; 2 – то же, инкубация при 60°C ; 3 – липосомы получены в отсутствие метгемоглобина, инкубация в присутствии метгемоглобина при 40°C ; 4 – липосомы получены в присутствии метгемоглобина, инкубация при 40°C

взаимодействие со все большим количеством липидных молекул, что приводит к уширению и уменьшению интенсивности сигналов в спектрах ^{31}P -ЯМР. Нами было показано, что в присутствии метгемоглобина и ионов Mn^{2+} интегральная интенсивность сигнала, отвечающего липосомной дисперсии, достаточно быстро уменьшается (рис. 5). В отсутствие же метгемоглобина мембрана остается непроницаемой для ионов Mn^{2+} даже при высоких температурах (рис. 6). Таким образом, результаты, полученные при изучении проницаемости мембран в присутствии и отсутствии метгемоглобина, не противоречат предложенной модели взаимодействия молекул метгемоглобина с липидным бислоем (рис. 4).

Результаты данной работы едва ли имеют значение для интерпретации функциональных особенностей эритроцитарной мембраны, поскольку известно [14], что бислоевая структура мембраны эритроцитов жестко зафиксирована (по-видимому, интегральными белками). Однако при создании искусственных эритроцитов, безусловно, необходимо принимать во внимание возможность полиморфных перестроек в липидном бислое в присутствии метгемоглобина.

Экспериментальная часть

Фосфатидилхолин и фосфатидилэтаноламин были выделены из яичных желтков [15]. Тиофосфатидилхолин синтезирован по методу [16]. Гемоглобин был выделен по методу [17] и переведен в метгемоглобин [12].

Модельные липосомные мембраны получали механическим диспергированием 250–300 мг фосфолипидов в 2 мл тяжелой воды, содержащей 25 мМ трис-НСI (рН 7,4). Липосомы получали как в присутствии, так и в отсутствие метгемоглобина. Отношение липид/белок во всех образцах составляло 2 : 1 по весу.

Спектры ^{31}P -ЯМР снимали на импульсном фурье-спектрометре Bruker WP-60 (ФРГ), рабочая частота 24,28 МГц. Все спектры получены при

широкополосной развязке от протонов, количество накоплений — 3000. Термостатирование образцов осуществлялось в датчике спектрометра.

ЛИТЕРАТУРА

1. Lee A. G. *Biochim. et biophys. acta*, 1977, v. 472, № 2, p. 237–281.
2. Cullis P. R., de Kruijff B. *Biochim. et biophys. acta*, 1979, v. 559, № 3, p. 399–420.
3. De Kruijff B., Verkley A. J., van Echteld C. J. A., Gerritsen W. J., Mombers C., Noordam P. C., de Gier J. *Biochim. et biophys. acta*, 1979, v. 559, № 2, p. 200–209.
4. Cullis P. R., de Kruijff B. *Biochim. et biophys. acta*, 1978, v. 513, № 1, p. 31–42.
5. Yeagle P. L., Hutton W. C., Martin R. B. *Biochemistry*, 1978, v. 17, № 21, p. 5745–5750.
6. Чупин В. В., Василенко И. А., Серебренникова Г. А., Евстигнеева Р. П. *Биоорганическая химия*, 1979, т. 5, № 12, с. 1831–1835.
7. Cullis P. R., Hope M. J. *Nature*, 1978, v. 271, p. 672–674.
8. Barsukov L. I., Victorov A. V., Vasilenko I. A., Evstigneeva R. P., Bergelson L. D. *Biochim. et biophys. acta*, 1980, v. 598, № 1, p. 153–168.
9. Чупин В. В., Василенко И. А., Предводителев Д. А., Серебренникова Г. А., Евстигнеева Р. П. *Докл. АН СССР*, 1979, т. 248, № 1, с. 235–237.
10. Чупин В. В., Василенко И. А., Серебренникова Г. А., Евстигнеева Р. П. *Биоорганическая химия*, 1981, т. 7, № 5, с. 768–772.
11. De Kruijff B., Cullis P. R. *Biochim. et biophys. acta*, 1980, v. 602, № 4, p. 477–490.
12. Bossi L., Aletta S., Calissano P., Marra E. *Biochim. et biophys. acta*, 1975, v. 375, № 4, p. 477–482.
13. Bergelson L. D. *Methods in Membrane Biol.*, 1977, v. 9, p. 275–335.
14. Van Meer G., de Kruijff B., op den Kamp J. A. F., van Deenen L. L. M. *Biochim. et biophys. acta*, 1980, v. 596, № 1, p. 1–9.
15. Dawson R. M. E. *Biochem. J.*, 1965, v. 88, № 4, p. 414–420.
16. Vasilenko I. A., de Kruijff B., Verkley A. J. *Biochim. et biophys. acta*, 1982, in press.
17. Хачатурьян А. А., Вязова Е. П., Морозова Г. М., Розенберг Г. Я. *Пробл. гематол. и переливания крови*, 1979, т. 24, № 1, с. 58–60.

Поступила в редакцию
23.III.1982

³¹P NMR STUDY ON METHEMOGLOBIN INTERACTION WITH MODEL MEMBRANES

CHUPIN V. V., USHAKOVA I. P., BONDARENKO S. V., VASILENKO I. A.,
SEREBRENNIKOVA G. A., EVSTIGNEEVA R. P., ROZENBERG G. J.,
KOLTSOVA G. N.

*M. V. Lomonosov Institute of Fine Chemical Technology, Moscow;
Institute of Hematology and Blood Transfusion, Moscow*

Interaction of methemoglobin with model membranes containing neutral-charge phospholipids was studied by ³¹P NMR. Methemoglobin was found to destabilize the lipid bilayer and increase the membrane permeability. A model for methemoglobin action on membrane was proposed.