

УДК 577.3

БИОФИЗИКА

О. С. КСЕНЖЕК, В. С. ГЕВОД, М. М. КОГАНОВ

ПОВЕРХНОСТНЫЙ ПОТЕНЦИАЛ ЦИТОХРОМФОСФОЛИПИДНЫХ МОНОСЛОЕВ НА ГРАНИЦЕ РАЗДЕЛА ЭЛЕКТРОЛИТ — ВОЗДУХ

(Представлено академиком А. Н. Фрумкин 16 I 1975)

Имеющиеся в настоящее время литературные данные свидетельствуют о способности цитохрома с взаимодействовать с искусственными фосфолипидными мембранами за счет электростатических (¹⁻⁴) и неполярных (^{5, 6}) сил. Методы, применявшиеся в цитируемых работах, позволяют лишь косвенно судить о характере белково-липидных взаимодействий и электрохимических процессах, протекающих в мембранных структурах при окислении — восстановлении цитохрома с. В данной работе для исследования взаимодействия липидов с цитохромом с применен метод измерения поверхностного потенциала (п.п.) белковых, липидных и липопротеиновых монослоев, сформированных на границе раздела вода — воздух и изучено влияние окисления — восстановления белка на величину возникающего потенциала.

В работе использовали препарат цитохрома с фирмы «Biomed», выделенный из сердца лошади. Концентрацию белка определяли спектрофотометрически (⁷). Восстановленную форму цитохрома с получали добавлением к окисленному белку избытка аскорбата (1:5) с последующей гельфильтрацией через колонку, упакованную сефадексом G-25 и уравновешенную 1 мМ фосфатным буфером pH 7,0. Идентификацию форм белка проводили по спектру поглощения в интервале длин волн 400–600 нм. Используемая в работе фракция фосфолипидов была выделена из белого вещества головного мозга быка (⁸). Комплекс цитохрома с с фосфолипидами получали путем добавления белка к диспергированному в 1 мМ фосфатном буфере pH 7,0 фосфолипидам с последующей экстракцией комплекса в изооктан (⁹).

Монослой формировали из гептанового раствора фосфолипидов с концентрацией 0,5 мг/мл по методу Ленгмюра (¹⁰) на границе раздела вода — воздух. Площадь поверхности электролита составляла 450 см², объем кюветы 3 л. П.п. на границе раздела электролит — монослой — воздух измеряли по методу вибрирующего конденсатора (¹¹) на частоте 400 гц. Площадь золотого электрода 1 см², расстояние электрода от поверхности электролита равно 1 мм. Измеряемый сигнал, усиленный электрометром, выделяли при помощи анализатора спектра С4-12 и после выпрямления регистрировали на самописце И-37. За ноль отсчета принимался п.п. на чистой поверхности 1 мМ раствора NaCl.

Для изучения условий взаимодействия между цитохромом и липидами формировали монослой различной структуры. В табл. 1 показаны схемы строения различных типов монослоев и основные результаты измерения п.п. на этих монослоях.

Монослой фосфолипидов при плотной упаковке ($\sigma=30$ дин/см) имеет п.п. 260 мв. Для неплотного монослоя ($\sigma=10$ дин/см) п.п. ниже и составляет всего 140 мв.

Цитохром с в водном растворе обладает выраженной поверхностной активностью и адсорбируется на границе раздела фаз. При этом возникает п.п., зависящий от концентрации белка в субфазе, как показано на рис. 1.

При концентрации цитохрома в субфазе около 0,05 мкмол/л происходит заполнение поверхности раздела монослоем белка и кривая п.п. выходит на плато. Уровень плато различен для окисленного и восстановленного цитохрома с. Для окисленного — около 210 мв, для восстановленного 280 мв. С увеличением концентрации цитохрома с в субфазе наблюдается возрастание п.п., что обусловлено полислойной адсорбцией белка, которой может способствовать известная склонность цитохрома с к полимеризации⁽¹²⁾.

На монослоях цитохрома с наблюдается положительный п.п., т. е. гидрофобная часть молекулы цитохрома, обращенная в сторону воздушной

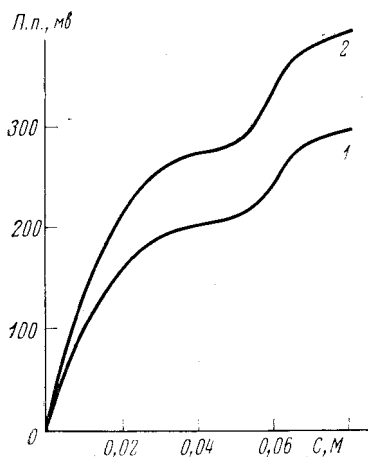


Рис. 1. Зависимость величины п.п. от концентрации цитохрома с в субфазе; 1 — окисленный, 2 — восстановленный белок

фазы, является положительной по отношению к гидрофильной части, обращенной в сторону водного раствора. Различие п.п. для окисленной и восстановленной форм белка указывает на изменение дипольного момента при окислении — восстановлении. Известно, что при таких процессах существенно изменяется третичная структура цитохрома с^(7, 13).

Изменение п.п. при окислении или восстановлении белка вполне обратимо. Введение в водную фазу под монослой окисленного цитохрома с восстановителей — аскорбата или NN-диметил-*n*-фенилендиаминна (ДМФД) приводит к возрастанию значений п.п. до уровня, соответствующего восстановленной форме белка (280 мв). Последующее добавление избытка ферроцианида вызывает возврат к исходному значению.

Адсорбция цитохрома с из раствора происходит не только на чистой поверхности раздела, но и на поверхности, покрытой монослоем фосфолипидов. При введении под плотный фосфолипидный монослой ($\sigma=30$ дин/см, п.п.=260 мв), сформированный на поверхности раздела, окисленного цитохрома с в количестве, необходимом для заполнения поверхности раздела монослоем, измеряемый п.п. равен сумме п.п., создаваемых раздельно монослоем липидов и белка (рис. 2а). Это свидетельствует о том, что имеющая более положительный заряд часть молекул цитохрома с взаимодействует с гидрофильной частью молекул фосфолипидов, заряженной отрицательно. На электростатический характер связи между положительно заряженными участками молекул белка и отрицательно заряженными группами липидов указывает также резкое уменьшение значений п.п. при замене исходного раствора субфазы (1 мМ NaCl) на 0,1 М NaCl. Известно, что при такой концентрации происходит полная десорбция электростатически связанного с фосфолипидами цитохрома с⁽¹⁾.

Окисленный цитохром с, связанный с плотным монослоем липидов, может быть восстановлен аскорбатом и ДМФД. Причем эти восстановители вызывали одинаковое увеличение п.п. на 70 мв, т. е. до значений, соответствующих восстановленной форме белка. Одинаковое увеличение п.п., наблюдавшееся как при добавлении водорастворимого аскорбата, так и при добавлении жирорастворимого ДМФД, указывает на локализацию белка в гидрофильной области плотного монослоя фосфолипидов. Таким образом, цитохром с не проникает в гидрофобную область плотного липидного монослоя.

В том случае, если липидный монослой, сформированный на границе раздела, имел низкое поверхностное давление ($\sigma=10$ дин/см, п.п.=140 мв), добавление окисленного цитохрома с в субфазу в количестве, необходимом

для заполнения поверхности монослоем, вызывало рост п.п. до 420 мв (рис. 2б). На локализацию части молекул цитохрома с в гидрофобной области неплотного липидного монослоя указывает различная доступность белка для аскорбата, вызывавшего рост п.п. на 70 мв, и ДМФД, дополнительно увеличивавшего п.п. на 30 мв. В результате проникновения некоторого количества молекул цитохрома с в гидрофобную область ли-

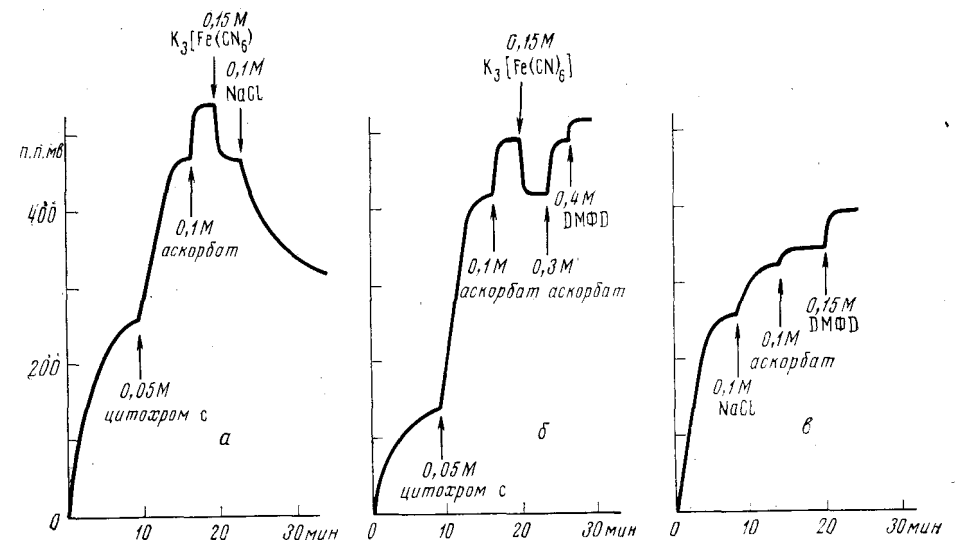


Рис. 2. Динамика изменения величины п.п. монослоев на границе раздела электролит - воздух. а - монослой фосфолипидов ($\sigma=30$ дин/см) в присутствии цитохрома с, б - монослой фосфолипидов ($\sigma=10$ дин/см) в присутствии цитохрома с, в - липо-протениновый монослой, сформированный из комплекса цитохром с - фосфолипид

пидного монослоя общее увеличение п.п. при восстановлении белка превы-пало увеличение п.п. при восстановлении мономолекулярного слоя цито-хрома. При этом общий скачок потенциала определялся суммой усредненного скачка потенциала на верхнем (граничащем с воздухом) липопротениновом монослое и лежащем ниже монослое белка.

Таблица 1

№№ п.п.	Схема строения границы раздела фаз	Ориента-ция диполей	П.п. окисле-ния/восста-новления, мв	Действие	
				аскорбата, мв	ДМФД, мв
1	В. э. LLLLLLLLLLLLLLLLLL	+	260	0	0
2	В. э. CCCCCCCCCCCCCCCCCC	+	210/280	+70	+70
3	В. э. LLLLLLLLLLLLLLLLLL CCCCCCCCCCCCCCCCC	+	470/540	+70	+70
4	В. э. L L C C C L C L L L C C L L C C C L C C C C C C C C C C C C C C C C C C	+	420/520	+70	+100
5	В. э. L C L C L C L C L C L C L C L C L C	+	330/400	+20	+70

Примечание. В.— воздух; э.— электролит; С — цитохром с; L — липид.

Формирование липопротеиновых слоев, содержащих молекулы цитохрома с в гидрофобной области липидов, может быть осуществлено и при отсутствии белка в субфазе. В этом случае белково-липидный монослой формировали из изооктанового раствора липопротеинового комплекса, в котором молекулярное соотношение белок-липид определяется стехиометрической пропорцией и равно 1:20:30⁽⁹⁾. П.п. липопротеинового монослоя составлял 270 мв (рис. 2в). Для определения характера связи белка с фосфолипидом в липопротеиновом монослое была проведена замена состава субфазы на 0,1 М NaCl. Это приводило к увеличению п.п. на 65 мв, что обусловлено увеличением ионной силы раствора и согласуется с данными, полученными на фосфолипидном монослое⁽¹⁴⁾.

После замены субфазы на 0,1 М NaCl аскорбат вызывал увеличение п.п. на 20 мв, а ДМФД — дополнительно на 50 мв. Таким образом, цитохром с из липопротеинового монослоя полностью не десорбируется и в основном локализуется в гидрофобной области монослоя, на что указывает рост п.п. после добавления жирорастворимого восстановителя.

Результаты, полученные методом динамической емкости, свидетельствуют о способности цитохрома с связываться с фосфолипидами за счет неполярного взаимодействия и проникать в монослой фосфолипидов при низком поверхностном давлении. Это хорошо согласуется с данными, полученными другими методами^(5, 6). Следует заметить, что состоянию фосфолипидов в реальных мембранах, по-видимому, соответствует не вполне плотная упаковка липидов⁽¹⁵⁾, и в связи с этим способность цитохрома проникать в гидрофобную область мембран может иметь определенное значение в процессе их формирования. Существенно также, что окислительно-восстановительные реакции цитохрома с, встроенного в мембрану, сопровождаются значительным изменением поверхностного потенциала.

Днепропетровский химико-технологический
институт им. Ф. Э. Дзержинского

Поступило
16 I 1975

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ A. Steinemann, P. Läuger, J. Membrane Biol., v. 4, 74 (1971). ² D. Papahadjopoulos, N. Miller, Biochim. et biophys. acta, v. 135, 624 (1967). ³ G. G. Shipley, R. B. Leslie, D. Chapman, *ibid.*, v. 173, 1 (1967). ⁴ H. K. Kimelberg, C. P. Lee *et al.*, J. Membrane Biol., v. 2, 235 (1970). ⁵ P. J. Quinn, R. M. C. Dawson, Biochem. J., v. 113, 791 (1969). ⁶ P. J. Quinn, R. M. Dawson, *ibid.*, v. 116, 671 (1970). ⁷ R. Lemberg, J. Barret, Cytochromes, London, 1973. ⁸ P. Mueller, D. O. Rudin *et al.*, J. Phys. Chem., v. 67, 534 (1963). ⁹ M. L. Das, F. L. Crane, Biochemistry, v. 3, 696 (1964). ¹⁰ L. George, Gr. Gaines, Insoluble Monolayers at Liquid-Gas Interfaces, N. Y., 1966. ¹¹ J. T. Davies, Nature, v. 167, 193 (1951). ¹² E. Margoliash, J. Lustgarten, J. Biol. Chem., v. 273, 3397 (1962). ¹³ N. N. Lichtin, A. Shafferman, G. Stein, Biochim. et biophys. acta, v. 314, 117 (1973). ¹⁴ И. В. Мягков, И. С. Сотников и др., Биофизика мембран, сб. матер. симпозиума, Каунас, ч. 1, 1971, стр. 627. ¹⁵ A. D. Bangham, Progress in Biophys. and Molecular Biol., v. 18, N. Y., 1968.