

В. В. ОБРАЗЦОВ, Б. Г. ТЕНЧОВ, В. С. ДАНИЛОВ

**ВЛИЯНИЕ БЕЛОК-ЛИПИДНОГО ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ
НА СТРУКТУРУ ИСКУССТВЕННОЙ ВЕЗИКУЛЯРНОЙ МЕМБРАНЫ**

(Представлено академиком А. Л. Курсановым 24 X 1975)

В основе современных представлений о структуре и функции мембранных систем лежит идея о взаимном влиянии белка и липида. С одной стороны, известны многочисленные данные о том, что конформация и активность отдельных мембраносвязанных ферментов зависит от состава и структуры липидной части мембраны (¹⁻⁴). С другой стороны, кооперативный характер фосфолипидного бислоя некоторых мембран предполагает значительные изменения его характеристик при непосредственном контакте с молекулами белков (⁵). Изучение этой стороны белок-липидного взаимодействия, в большинстве случаев, связано с использованием искусственных фосфолипидных мембран и высокоочищенных препаратов белков.

Влияние связи белков и липидов на структуру бислоя изучали на примере комплексов фосфолипидных везикулярных мембран с феррицитохромом с и лизоцимом. Многочисленными исследованиями установлено, что феррицитохром с взаимодействует с кислыми фосфолипидами главным образом электростатически (⁶). Напротив, лизоцим при низких рН способен к гидрофобному связыванию с фосфолипидами (⁷). Зондами структуры мембраны служили стабильные нитроксильные радикалы: 2,2,6,6-тетраметил-4-октадеканоилпиперидин-1-оксил' (C_{18}) и 2,2,6,6-тетраметил-4-пропаноилпиперидин-1-оксил (C_3). Гидрофобный зонд C_{18} сосредоточен в мембране, и параметры его спектра электронного парамагнитного резонанса (э.п.р.) несут информацию о микровязкости окружения зонда. Время вращательной корреляции зонда C_{18} определяли по формуле (⁸)

$$\tau_k = 6,65 \cdot \Delta H_+ \left(\sqrt{\frac{I_+}{I_-}} - 1 \right) \cdot 10^{-10} \text{ сек.}, \quad (1)$$

где ΔH_+ — ширина низкочастотной компоненты спектра в эрстедах, I_+ и I_- — интенсивность низко- и высокочастотной компоненты спектра соответственно. Зонд C_3 , аналогично зонду «Темпо», широко используемому в изучении температурных структурных переходов в мембранах, распределяется между мембраной и массой воды. Однако сродство зонда C_3 к мембране выше, чем у «Темпо», что делает его более удобным в изучении низкоконцентрированных мембранных систем. Нормированный коэффициент распределения (f_n) вычисляли согласно МакКоннеллу (⁹) по формуле $f_n = H/(H+P)$, где H — интенсивность гидрофобной компоненты спектра, P — интенсивность водной компоненты спектра.

Лецитин был выделен из яиц по ранее описанной методике (¹⁰). Фосфатидилсерин и кардиолипин фирмы «Nutrition Biochem. Corpor.», феррицитохром с фирмы «Sigma» и лизоцим фирмы «Reanal» использовали без дополнительной очистки. Везикулярные мембраны готовились из суспензии жидко-кристаллической фазы фосфолипидов облучением ультразвуком в непрерывном токе аргона на диспергаторе УЗДН-1. Феррицитохром с, лизоцим и зонд C_3 добавляли к препаратам мембран непо-

средственно перед снятием спектра. Спектры э.п.р. были записаны на радиоспектрометре «Varian E-4» при комнатной температуре.

В области исследованных рН от 7 до 3 везикулы из нейтрального лецитина не адсорбируют белки на свою поверхность. Добавление феррицитохрома с или лизоцима к мембранам из нейтрального лецитина не вызывает изменений как во времени вращательной корреляции (τ_K) зонда C_{18} , так и в коэффициенте распределения (f_H) зонда C_3 .

Везикулы, содержащие фосфатидилсерин, который в слабокислых рН имеет отрицательно заряженную карбоксильную группу ($pK_{соон}=4,0$), адсорбируют белки на свою поверхность. Адсорбция белков вызывает заметное увеличение τ_K зонда C_{18} (рис. 1). Адсорбция белков на мембраны из чистого фосфатидилсерина, где подвижность зонда C_{18} относительно

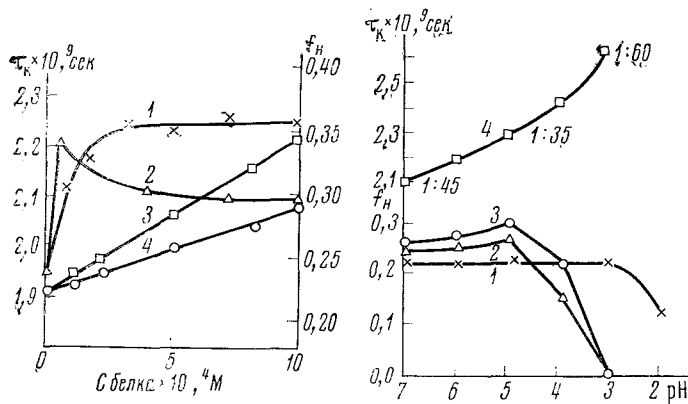


Рис. 1

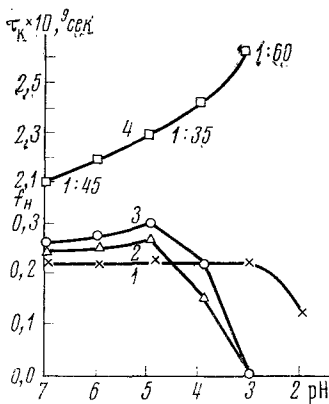


Рис. 2

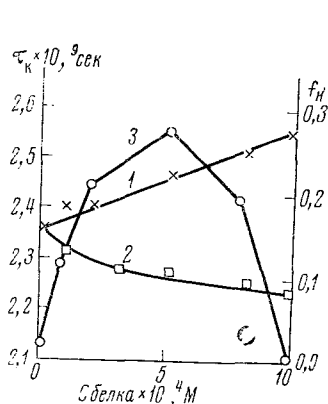


Рис. 3

Рис. 1. Измерение τ_K зонда C_{18} и f_H зонда C_3 при адсорбции феррицитохрома с и лизоцима на лецитиновые везикулы, содержащие 25% фосфатидилсерина. 1, 3 — изменение τ_K и f_H соответственно при адсорбции феррицитохрома с; 2, 4 — изменение τ_K и f_H соответственно при адсорбции лизоцима. Концентрация фосфолипидов 15 мг/мл, рН 5,0

Рис. 2. Изменение τ_K , f_H и соотношения белок : липид при образовании комплекса в различных рН. 1 — f_H в мембранах без добавления белка; 2 и 3 — f_H при образовании комплекса с феррицитохромом с и лизоцимом соответственно; 4 — τ_K при адсорбции феррицитохрома с (цифры рядом с кривой — отношение белок : липид, М/М, в осаждаемом комплексе). Концентрация фосфолипидов 15 мг/мл (лецитин : фосфатидилсерин 3:1). Концентрация белков $5 \cdot 10^{-4}$ М

Рис. 3. Изменение τ_K и f_H при адсорбции белков на лецитиновые везикулы, содержащие 20% кардиолипина. 1, 2 — изменение f_H при адсорбции феррицитохрома с и лизоцима соответственно; 3 — изменение τ_K при адсорбции феррицитохрома с. Концентрация фосфолипидов 15 мг/мл, рН 7,0

заторможена, увеличивает τ_K настолько, что спектр зонда значительно видоизменяется, и расчет τ_K по формуле (1) оказывается невозможным⁽⁸⁾. Коэффициент распределения зонда C_3 при адсорбции как феррицитохрома с, так и лизоцима на мембраны, содержащие фосфатидилсерин, монотонно увеличивается, что свидетельствует об увеличении эффективного гидрофобного объема мембраны.

Изменение f_H зонда C_3 при образовании белок-липидного комплекса для обоих изучаемых белков с мембранами, содержащими 25% фосфатидилсерина в различных рН, представлено на рис. 2. Следует отметить, что при небольших различиях в τ_K зонда C_{18} при образовании комплекса феррицитохрома с с мембранами, содержащими фосфатидилсерин в различных рН, зависимость f_H меняется более резко. Небольшое увеличение f_H при подкислении сменяется полным вытеснением зонда C_3 в массу воды в более кислых рН.

Образование белок-липидного комплекса феррицитохрома с и лизоцима с везикулами из лецитина, содержащими кардиолипин, увеличивает τ_k зонда C_{18} (рис. 3). Изменение τ_k при добавлении белков носит явно выраженный экстремальный характер. Добавление белков к мембранам из чистого кардиолипина, как и в случае мембран из чистого фосфатидилсерина, увеличивает τ_k настолько, что спектр зонда значительно видоизменяется и расчет τ_k по формуле (1) становится невозможен⁽⁸⁾.

Образование белок-липидного комплекса феррицитохрома с с мембранами, содержащими кардиолипин, вызывает вход зонда C_3 в мембрану, что эквивалентно увеличению эффективного гидрофобного объема последней. Напротив, образование белок-липидного комплекса лизоцима с лецитиновыми везикулами, содержащими кардиолипин, сопровождается монотонным вытеснением зонда C_3 в массу воды. Такие тенденции сохраняются и при образовании белок-липидных комплексов с везикулами из чистого кардиолипина.

Нейтральный лецитин не взаимодействует с основными белками или полипептидами. Различные кислые добавки — кардиолипин, фосфатидиловая кислота, фосфатидилсерин, фосфатидилинозитол, жирные кислоты и анионные детергенты, включенные в лецитиновые мембраны, — способствуют образованию белок-липидного комплекса. Образование этого комплекса приводит к общей конденсации фосфолипидного бислоя. Уменьшение подвижности спиновых зондов, включенных в мембрану при адсорбции белков или основных полипептидов, наблюдали ранее как в нативных⁽¹¹⁾, так и в искусственных мембранах⁽⁷⁾. Позднее методом я.м.р. было показано, что адсорбция феррицитохрома с на лецитиновые везикулы, содержащие жирные кислоты, приводит к значительной иммобилизации полярной головки фосфолипида, причем влияние адсорбции белка на подвижность жирнокислотных остатков фосфолипидов выражено в меньшей степени⁽¹²⁾. Вероятно, молекулярной основой конденсации бислоя при образовании белок-липидного комплекса является торможение быстрой латеральной диффузии фосфолипидных молекул в плане мембраны и уменьшение степени транс-гош-изомеризации жирнокислотных остатков. По-видимому, в своем конденсирующем действии на гидрофобную часть бислоя кислых фосфолипидов основные белки сходны с холестерином. Обнаружено, что в присутствии цитохрома с в мембранах дипальмитоил-фосфатидилглицерола уширяется его эндотермический пик фазового перехода, регистрируемый дифференциальной сканирующей калориметрией, понижается температура и уменьшается средняя теплота фазового перехода на одну молекулу фосфолипида⁽⁵⁾.

Неожиданным оказалось увеличение f_n при образовании комплекса феррицитохрома с с фосфолипидами, так как зонд C_{18} регистрирует конденсацию бислоя, обычно сопровождающуюся вытеснением зондов в массу воды⁽⁹⁾. По-видимому, вход зонда C_3 в мембрану при белок-липидном взаимодействии обусловлен нейтрализацией заряда кислых фосфолипидов. Действительно, f_n зонда C_3 сильно зависит от содержания заряженных фосфолипидов и меняется от 0,27 в чистом лецитине до 0,06 в чистом фосфатидилсерине (концентрация липидов 15 мг/мл).

Незначительное увеличение f_n зонда C_3 с уменьшением pH сопровождается увеличением τ_k зонда C_{18} и соотношением белок : липид в осаждаемом комплексе. Полное вытеснение зонда C_3 в массу воды при адсорбции цитохрома с при pH 3,0 связано, по-видимому, с возрастанием вклада гидрофобных сил в белок-липидное взаимодействие, поскольку значения pK для групп COO^- и PO_4^- равны 4,0 и 3,7 соответственно⁽¹³⁾. Незменность f_n при pH 4,0 для цитохрома с и 4,5 для лизоцима не означает отсутствие взаимодействия. Постоянство f_n при образовании комплекса в этих условиях следует интерпретировать как равенство вклада электростатических и гидрофобных сил в белок-липидное взаимодействие.

Распределение зонда C_3 между водой и мембраной, содержащей кар-

диолипин, имеет различный характер в зависимости от адсорбции феррицитохрома с и лизоцима. При нейтральных рН адсорбция цитохрома с на поверхность мембраны приводит к входу зонда в бислой. Напротив, образование белок-липидного комплекса с лизоцимом при этих же рН приводит к монотонному выталкиванию зонда в массу воды. Эта тенденция сохраняется также и для везикул из чистого кардиолипина. Таким образом, распределение зонда C_3 является универсальным тестом на характер белок-липидного взаимодействия. Вход зонда C_3 в мембрану связан с нейтрализацией поверхностного заряда везикул и сопровождается вкладом электростатических сил в белок-липидное взаимодействие. Выход же зонда из мембраны обеспечивается гидрофобными силами белок-липидного взаимодействия, связанными с непосредственным проникновением некоторых аминокислот белка в толщу бислоя, что также сопровождается общей конденсацией мембраны. Очевидно, что для изученных белков электростатическое взаимодействие предшествует гидрофобному, поскольку не наблюдается образования комплекса с везикулами из чистого лецитина. Вклад гидрофобных сил в белок-липидное взаимодействие определяется типом белка, значением рН среды и составом фосфолипидного бислоя, причем как заряд, так и ненасыщенность могут оказаться решающими.

Экстремальные значения τ_k при образовании белок-липидного комплекса интерпретируются с трудом, поскольку изучение адсорбции цитохрома с на везикулы, содержащие кардиолипин, показало, что количество связанного белка и соотношение белок:липид в комплексе не уменьшается с увеличением концентрации цитохрома с. F_n зонда C_3 меняется также монотонно с увеличением концентрации белка. По-видимому, при большем количестве адсорбированного белка наблюдается дезорганизация бислоя, нарушение его упорядоченной структуры, что обеспечивает высокий коэффициент проницаемости ионов (⁵). Возможно, это явление аналогично разделению фаз, индуцированному ионами кальция на мембранах из смеси лецитина и фосфатидилсерина (¹⁴). Свободно диффундирующие в плане мембраны молекулы кардиолипина способны соединяться с молекулами цитохрома с, адсорбированного на поверхности мембраны. Таким образом, возможно существование кластеров кардиолипина, связанного с феррицитохромом с, и фазы, представляющей смесь свободного лецитина и кардиолипина. Первоначальные этапы адсорбции цитохрома с сопровождаются увеличением τ_k при равномерном распределении зонда C_{18} . Образование кластеров конденсированного кардиолипина, связанного с цитохромом с, приводит к вытеснению зонда C_{18} в более жидкую фазу чистого лецитина, что сопровождается уменьшением τ_k . Таким образом, при высоких соотношениях белок:липид в изучаемом комплексе метод спинного зондирования не регистрирует увеличения вязкости гидрофобного слоя мембраны, как это было обнаружено в исследованиях (¹⁵), выполненных на сходной модели.

Московский государственный университет
им. М. В. Ломоносова

Поступило
28 VIII 1975

ЛИТЕРАТУРА

- ¹ D. F. H. Wallach, J. Gen. Physiol., v. 54 (1), 3 (1969). ² S. Eletr, M. A. Williams et al., Biochim. et biophys. acta, v. 339, 190 (1974). ³ L. Lacko, B. Wittke, P. Geck, J. Cell Physiol., v. 82, 213 (1973). ⁴ G. Wilson, S. P. Rose, C. F. Fox, Biochem. Biophys. Res. Commun., v. 38, 617 (1970). ⁵ D. Papahajopoulos, M. Cowden, H. Kimelberg, Biochim. et biophys. acta, v. 330, 8 (1973). ⁶ K. M. Ivanetich, J. J. Henderson, L. S. Kaminsky, Biochemistry, v. 13, 1469 (1974). ⁷ F. Caron, L. Mateu et al., J. Mol. Biol., v. 85, 279 (1974). ⁸ Б. Г. Тенцов, Исследование с помощью спиновых зондов микрогетерогенных систем, Канд дисс., М., 1974. ⁹ E. S. Shimshick, H. McConnell, Biochemistry, v. 12, 2351 (1973). ¹⁰ W. S. Singleton, M. S. Gray et al., J. Am. Oil Chem. Soc., v. 42, 53 (1965). ¹¹ S. Rottem, W. L. Hubbell et al., Biochim. et biophys. acta, v. 219, 104 (1970). ¹² В. С. Кобелев, В. В. Образцов и др., Всесоюз. симп. Ф.-х. основы функц. надмол. структур, М., 1974. ¹³ S. Tsutomu, O. Shinpei, Biochim. et biophys. acta, v. 298, 546 (1973). ¹⁴ T. Ito, S. Ohnishi, ibid., v. 352, 29 (1974). ¹⁵ Shui Pong Van, O. H. Griffith, J. Membrane Biol., v. 20, 155 (1975).