

## БІОФІЗИКА КЛІТИНИ

УДК 577.37

## ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ РИБОНУКЛЕАЗЫ С ЛИПОСОМАМИ

Г.П.Горбенко

Харьковский государственный университет, пл. Свободы 4, 310077

Поступила в редакцию 22 сентября 1998 г.

Исследовано взаимодействие катионного белка рибонуклеазы с отрицательно заряженными липосомами, состоящими из смесей фосфатидилхолина с дифосфатидилглицерином. В рамках решеточных и континуальных моделей адсорбции больших лигандов на поверхности проведена оценка параметров образования белок-липидных комплексов. Обнаружена положительная кооперативность связывания рибонуклеазы с липидным бислоем. Предполагается, что при возрастании заряда бислоя увеличивается степень самоассоциации связанного белка.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** рибонуклеаза, липосомы, модели адсорбции, параметры связывания, кооперативность, самоассоциация белка

Взаимодействие белков с липидным бислоем, являющееся одной из стадий формирования надмолекулярной структуры биомембран [1], характеризуется рядом особенностей, существенно осложняющих термодинамический анализ процесса комплексообразования. Особые статистические свойства белок-липидных систем определяются, в частности, а) большим размером лиганда, т.е. способностью белка одновременно контактировать с несколькими центрами связывания, б) стерическими препятствиями, возникающими при адсорбции (эффект исключенной площади), в) зависимостью процесса связывания от формы лиганда, т.е. от формы контактного участка в белок-липидном комплексе. Попытки учесть эти особенности привели к развитию моделей адсорбции больших лигандов на поверхности, которые можно разделить на две группы - решеточные и континуальные [2-6]. Несмотря на то, что эти модели позволяют получить наиболее корректную оценку параметров комплексообразования в белок-липидных системах, в литературе описаны лишь единичные случаи их применения [4,7,8].

В настоящей работе модели адсорбции больших лигандов на поверхности были использованы для анализа данных по связыванию катионного белка рибонуклеазы с липосомами, состоящими из смеси цвиттерионного фосфолипида фосфатидилхолина (ФХ) с отрицательно заряженным фосфолипидом дифосфатидилглицерином (ДФГ). Кривые связывания белка с модельными мембранами получали с помощью предложенного ранее метода, основанного на изучении конкурентного взаимодействия флуоресцентного зонда 4-(п-диметиламиностирил)-1-метилпиридиний п-толуолсульфоната (ДСМ) и рибонуклеазы с липидным бислоем [9-11].

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали ФХ, ДФГ (Концерн "Биолек", Харьков), рибонуклеазу из поджелудочной железы крупного рогатого скота ("Reanal", Венгрия). Липосомы формировали из смесей ФХ с ДФГ как описано в [11]. При анализе экспериментальных данных использовали решеточные модели адсорбции линейного лиганда и диска на однородной поверхности, связывания диска с разреженными центрами, кооперативного связывания линейного лиганда [3,4] и континуальные модели связывания линейного лиганда и диска с поверхностью [6]. Взаимодействие линейного лиганда с двумерной решеткой центров описывали соотношениями:

$$K_a F = \frac{r}{1 - nr} \left( \frac{1 - (1 - \lambda)nr}{1 - nr} \right)^{n-1}; r = \frac{B}{L}; \lambda = \frac{z-2}{z} - \frac{2}{nz} \quad (1)$$

где  $B, F$  - концентрации связанного и свободного белка, соответственно,  $n$  - число липидных молекул, приходящихся на молекулу связанного белка,  $K_a$  - константа ассоциации,  $z$  - координационное число решетки ( $z=6$ ),  $L$  - концентрация липида. В предположении дискообразной формы лиганда кривые связывания анализировали с помощью соотношения:

$$K_a F = \frac{r}{1 - nr} \exp\left(\frac{\alpha nr}{1 - \alpha r}\right) \quad (2)$$

где  $\alpha$  - параметр исключенной площади (для диска  $\alpha=3$ ),  $\omega = 2\sqrt{3}n/\pi$ . Связывание диска с разрезанными центрами решетки описывали уравнением:

$$K_a F = \frac{r}{(1-nr)^n} \exp\left(\frac{\alpha nr}{1-nr}\right) \quad (3)$$

При анализе возможности кооперативного взаимодействия линейного лиганда с поверхностью использовали соотношения:

$$K_a F = B_o (1 + A/p)^\delta (1 + Ap)^{-r-\delta}; \quad B_o = \frac{r}{1-nr} \left( \frac{1 - (1-\lambda)nr}{1-nr} \right)^r; \quad p = \frac{\lambda nr}{1-nr};$$

$$A = (\sqrt{\phantom{x}} - 1) / (\sqrt{\phantom{x}} + 1); \quad \sqrt{\phantom{x}} = \left[ 1 + \frac{4(\eta-1)\lambda nr(1-nr)}{(1 - (1-\lambda)nr)^2} \right]^{1/2} \quad (4)$$

где  $\eta$  - параметр кооперативности. Континуальные модели были представлены соотношениями:

$$K_a F = \Phi G(\Phi); \quad \ln G = -\ln(1-\Phi) - \varepsilon - 1 + \frac{1}{1-\Phi} + \frac{\varepsilon}{(1-\Phi)^2}; \quad (5)$$

где  $\varepsilon$  - параметр, зависящий от формы лиганда, ( $\varepsilon=1$  для диска,  $\varepsilon = (g/\pi)(1+1/g)^2$  для прямоугольника с соотношением осей  $g$ ).

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Взаимодействие рибонуклеазы с липосомами сопровождается уменьшением флуоресценции ДСМ, которое является следствием конкуренции между белком и зондом за мембранные центры связывания.

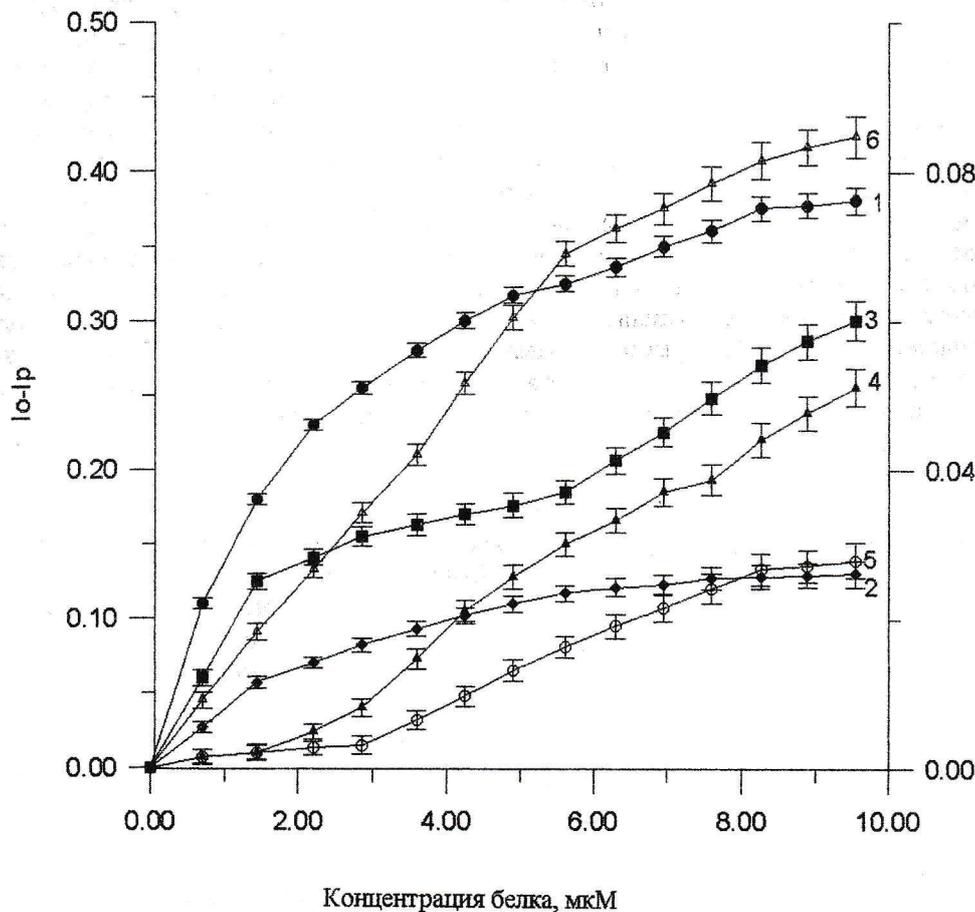


Рисунок 1. Изменение интенсивности флуоресценции ДСМ при добавлении рибонуклеазы. Содержание ДФГ, мол.% - 1 - 5, 2 - 11, 3 - 25, 4 - 43, 5 - 67, 6 - 100. Концентрация липида, мкМ: 1 - 67, 2 - 61, 3 - 23, 4 - 11, 5 - 9, 6 - 4. Концентрация ДСМ - 5 мкМ. Кривым 2,5,6 соответствует левая ось Y, кривым 1,3,4 - правая ось Y.  $I_0$  - интенсивность флуоресценции ДСМ в отсутствие белка.

### Взаимодействие рибонуклеазы с липосомами

На рис. 1 представлены типичные кривые вытеснения зонда белком, полученные при изучении зависимости флуоресценции ДСМ от концентрации рибонуклеазы. Предыдущие исследования показали, что в липосомальных мембранах имеется два типа центров сорбции ДСМ, различающиеся по параметрам связывания и молярной флуоресценции [12]. Было высказано предположение, что конкуренция между ДСМ и рибонуклеазой происходит, главным образом, за более полярные участки связывания [11]. В настоящей работе предложенный ранее метод конкурентного анализа [10,11] был развит для случая конкуренции за оба типа центров сорбции. Первый этап анализа данных заключался в оценке доли площади поверхности липосом, занятой белком, из экспериментальных зависимостей интенсивности флуоресценции ДСМ ( $I_P$ ) от концентрации белка ( $P$ ). Интенсивность флуоресценции ДСМ, связанного с центрами двух типов, можно представить в виде:

$$I_P = B_1 f_1 + B_2 f_2 \quad (6)$$

где  $B_i$  - концентрация зонда,  $f_i$  - интенсивность флуоресценции одного моля зонда, связанного с центрами  $i$ -го типа (отметим, что флуоресценция свободного зонда пренебрежимо мала по сравнению с измеряемой величиной  $I_P$ ). Концентрация свободного зонда ( $Z_f$ ) равна:

$$Z_f = Z_o - B_1 - B_2 = Z_o - \frac{I_P}{f_2} - B_1 \left(1 - \frac{f_1}{f_2}\right) = a_1 - B_1 a_2 \quad (7)$$

где  $Z_o$  - общая концентрация зонда. Константы связывания зонда с центрами двух типов определяются выражениями:

$$K_1 = \frac{B_1}{Z_f N_1^f}; K_2 = \frac{B_2}{Z_f N_2^f} \quad (8)$$

где  $N_1^f, N_2^f$  - концентрации свободных центров связывания. Из соотношений (8) получаем:

$$N_1^f = \frac{B_1}{Z_f K_1}; \quad N_2^f = \frac{B_2}{Z_f K_2}; \quad \frac{B_1}{K_1 N_1^f} = \frac{B_2}{K_2 N_2^f} \quad (9)$$

Если общее число центров 1-го и 2-го типов обозначить  $N_1$  и  $N_2$ , доля площади поверхности, занятой белком, будет равна:

$$\Phi = 1 - \frac{N_1^f + B_1}{N_1} = 1 - \frac{N_2^f + B_2}{N_2} \quad (10)$$

Из уравнений (6), (7), (9) и (10) получаем:

$$B_2 = \frac{B_1 N_2 \left(1 + \frac{1}{K_1(a_1 - B_1 a_2)}\right)}{N_1 \left(1 + \frac{1}{K_2(a_1 - B_1 a_2)}\right)} = \frac{I_P - B_1 f_1}{f_2} \quad (11)$$

Выражение (11) можно преобразовать в квадратное уравнение:

$$aB_1^2 + bB_1 + c = 0; \text{ где}$$

$$a = K_1 K_2 \left(1 - \frac{f_1}{f_2}\right) \left(N_2 + \frac{f_1}{f_2} N_1\right);$$

$$b = -N_1 K_1 \left(\frac{I_P K_2}{f_2} \left(1 - \frac{f_1}{f_2}\right) + \frac{f_1}{f_2} + \frac{f_1 K_2}{f_2} \left(Z_o - \frac{I_P}{f_2}\right)\right) - N_2 K_2 \left(1 + K_1 \left(Z_o - \frac{I_P}{f_2}\right)\right);$$

$$c = \frac{I_P N_1 K_1}{f_2} \left(1 + Z_o K_2 - \frac{I_P K_2}{f_2}\right);$$

$$B_1 = \frac{-b - \sqrt{D}}{2a}; \quad D = b^2 - 4ac \quad (12)$$

Используя вычисленное таким образом значение  $B_1$ , из уравнений (6), (9) и (10) можно найти значение  $\Phi$ , соответствующее данной интенсивности флуоресценции  $I_P$ . Значения  $N_1, N_2, K_1, K_2, f_1, f_2$  для исследуемых липосом были определены ранее [11]. С помощью описанного выше алгоритма был

проведен анализ массива данных, полученных для 5-7 концентраций липосом различного состава. На основе экспериментальных зависимостей  $I_p(P)$ , были найдены зависимости  $\Phi(P)$ , которые использовались в дальнейшем для определения параметров связывания рибонуклеазы с липосомами. Значения  $n$  и  $K_a$ , обеспечивающие наилучшую аппроксимацию экспериментальных данных уравнениями (1)-(5) находили путем минимизации функции:

$$f = \frac{1}{m} \sum_{i=1}^m (P_o^e - P_o^c)^2 \quad (13)$$

где  $P_o^e$  - концентрация белка, определенная экспериментально,  $m$  - число экспериментальных точек,

$P_o^c$  - концентрация белка, вычисляемая при данном наборе параметров,  $n$ ,  $K_a$  и  $\eta$ ,  $P_o^c = B + F$ ,  $B = \Phi L/n$ ; значение  $F$  находили, используя уравнения (1) - (5).

Таблица 1. Параметры связывания рибонуклеазы с липосомами

| Состав липосом<br>Содержание ДФГ, мол. %     | ФХ : ДФГ<br>18 : 1            | ФХ : ДФГ<br>8 : 1              | ФХ : ДФГ<br>3 : 1             | ФХ : ДФГ<br>4 : 3             | ФХ : ДФГ<br>1 : 2              | ДФГ                             |
|--|-------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|
|  | 5                             | 11                             | 25                            | 43                            | 67                             | 100                             |
| <b>Решеточные модели</b>                     |                               |                                |                               |                               |                                |                                 |
| <b>Линейный лиганд</b>                       |                               |                                |                               |                               |                                |                                 |
| $K_a, M^{-1}$                                | (6.1±1.1)<br>×10 <sup>5</sup> | (7.9±1.3)<br>×10 <sup>6</sup>  | (1.2±0.3)<br>×10 <sup>5</sup> | (7.3±1.3)<br>×10 <sup>4</sup> | (1.6±0.3)<br>×10 <sup>5</sup>  | (1.5±0.3)<br>×10 <sup>5</sup>   |
| $n$  | 13±2                          | 12±3                           | 7±2                           | 4±1                           | → 0                            | → 0                             |
| <b>Диск</b>                                  |                               |                                |                               |                               |                                |                                 |
| $K_a, M^{-1}$                                | (7.6±1.5)<br>×10 <sup>3</sup> | (4.8±1.0)<br>×10 <sup>5</sup>  | (6.3±1.2)<br>×10 <sup>4</sup> | (1.0±0.2)<br>×10 <sup>6</sup> | (2.1±0.5)<br>×10 <sup>6</sup>  | (4.6±1.0)<br>×10 <sup>6</sup>   |
| $n$  | 78±17                         | 15±4                           | 10±3                          | → 0                           | → 0                            | → 0                             |
| <b>Разреженные центры</b>                    |                               |                                |                               |                               |                                |                                 |
| <b>Диск</b>                                  |                               |                                |                               |                               |                                |                                 |
| $K_a, M^{-1}$                                | (4.2±0.7)<br>×10 <sup>6</sup> | (2.6±0.5)<br>×10 <sup>8</sup>  | (7.0±1.5)<br>×10 <sup>5</sup> | (9.1±2.1)<br>×10 <sup>5</sup> | (1.7±0.4)<br>×10 <sup>6</sup>  | (2.9±0.7)<br>×10 <sup>6</sup>   |
| $n$  | 9±2                           | 9±2                            | 3±1                           | → 0                           | → 0                            | → 0                             |
| <b>Кооперативность</b>                       |                               |                                |                               |                               |                                |                                 |
| <b>Линейный лиганд</b>                       |                               |                                |                               |                               |                                |                                 |
| $K_a, M^{-1}$                                | (4.3±0.9)<br>×10 <sup>5</sup> | (1.2±0.3)<br>×10 <sup>7</sup>  | (9.7±1.9)<br>×10 <sup>5</sup> | (7.5±1.4)<br>×10 <sup>5</sup> | (4.3±1.6)<br>×10 <sup>6</sup>  | (1.0±0.2)<br>×10 <sup>7</sup>   |
| $n$  | 12±3                          | 13±3                           | 11±2                          | 10±2                          | 12±4                           | 13±4                            |
| $\eta$                                       | 1.0±0.02                      | 1.05±0.02                      | 1.1±0.02                      | 1.2±0.06                      | 1.3±0.08                       | 1.4±0.08                        |
| <b>Континуальные модели</b>                  |                               |                                |                               |                               |                                |                                 |
| <b>Линейный лиганд (<math>g = 10</math>)</b> |                               |                                |                               |                               |                                |                                 |
| $K_a, M^{-1}$                                | (1.5±0.2)<br>×10 <sup>8</sup> | (5.3±1.1)<br>×10 <sup>11</sup> | (3.1±0.7)<br>×10 <sup>8</sup> | (7.7±1.5)<br>×10 <sup>8</sup> | (1.3±0.3)<br>×10 <sup>10</sup> | (8.9±1.7)×<br>×10 <sup>11</sup> |
| $n$  | 7±2                           | 7±2                            | 2±0.6                         | 0.7±0.2                       | 0.5±0.1                        | 0.3±0.1                         |
| <b>Диск</b>                                  |                               |                                |                               |                               |                                |                                 |
| $K_a, M^{-1}$                                | (7.4±1.4)<br>×10 <sup>5</sup> | (1.8±0.4)<br>×10 <sup>7</sup>  | (1.1±0.3)<br>×10 <sup>6</sup> | (1.8±0.5)<br>×10 <sup>6</sup> | (1.3±0.2)<br>×10 <sup>7</sup>  | (5.2±1.1)<br>×10 <sup>7</sup>   |
| $n$  | 135±24                        | 11±3                           | 4±1                           | 1±0.3                         | 0.5±0.1                        | 0.3±0.1                         |

Как видно из представленных в таблице данных, с увеличением отрицательного заряда бислоя (при повышении содержания ДФГ) величина  $n$  уменьшается, и в ряде случаев при подгонке  $n \rightarrow 0$ . Исключение составляет лишь модель кооперативного связывания - в этом случае  $n$  практически не зависит от состава липосом. Изменение константы связывания при возрастании заряда мембран имеет немонотонный характер - при увеличении содержания ДФГ от 5 до 11 и от 47 до 100 мол. % наблюдается повышение  $K_a$ , тогда как в области 25-43 мол. % ДФГ  $K_a$  достигает минимального значения. Обнаруженные тенденции позволяют сделать некоторые предположения о характере взаимодействия рибонуклеазы с модельными мембранами. Среднее сечение молекулы белка составляет  $\sim 3340 \text{ \AA}^2$  [13], что соответствует площади  $\sim 48$

## Взаимодействие рибонуклеазы с липосомами

молекул ФХ или 28 молекул ДФГ [14]. Поскольку при используемых в эксперименте значениях pH (~ 7.4) рибонуклеаза имеет суммарный положительный заряд (изоэлектрическая точка белка ~ 9.6), определяющую роль в стабилизации белок-липидных комплексов играют электростатические взаимодействия. Если предположить, что с белком контактируют только отрицательно заряженные полярные головки ДФГ, параметр  $n$ , полученный с помощью модели разреженных центров (ур-е (3)) можно рассматривать как приближенную оценку числа таких контактов ( $n_c$ ). Континуальные модели и модели адсорбции на однородной решетке (ур-я (1), (2), (5)) позволяют приближенно оценить общее число липидных молекул, приходящихся на молекулу связанного белка ( $n_o$ ). Как видно из таблицы, разумные оценки  $n_o$  и  $n_c$  были получены только для липосом, содержащих 5 и 11 мол. % ДФГ. Наблюдаемое резкое уменьшение  $n_o$  и  $n_c$  при повышении заряда бислоя послужило основанием для предположения о кажущемся увеличении плотности упаковки белковых молекул на поверхности липосом, или положительной кооперативности комплексообразования. В связи с этим экспериментальные данные были проанализированы в рамках модели кооперативного связывания (ур-е (4)). Оказалось, что взаимодействие рибонуклеазы с липосомами действительно характеризуется положительной кооперативностью, степень которой возрастает при увеличении заряда бислоя. Наиболее вероятной причиной этого эффекта представляется образование белковых ассоциатов на поверхности липосомальных мембран. Следующий закономерный этап работы заключался в попытке анализа результатов с помощью континуальной модели, описывающей самоассоциацию сорбированного лиганда [6]. Однозначная оценка параметров связывания в рамках этой модели невозможна, однако анализ положения минимума функции  $f$  (ур-е (13)) позволил выявить некоторые качественные закономерности. Так, оказалось, что степень самоассоциации белка возрастает с увеличением заряда бислоя - параметр, характеризующий количество белковых молекул в ассоциате, равнялся 2 при содержании ДФГ 25 мол. %, 4 при 43 мол. % и 8 при 67 и 100 мол. % ДФГ.

Существование минимума зависимости константы ассоциации от заряда бислоя может быть следствием суперпозиции двух противоположно направленных эффектов - а) увеличения числа электростатических белок-липидных контактов и б) взаимного отталкивания молекул сорбированного белка. При повышении содержания ДФГ в липидном бислое возрастает степень экранирования суммарного заряда рибонуклеазы и увеличивается число белковых молекул на единицу площади поверхности мембран, что создает предпосылки для самоассоциации белка. Полученные результаты позволяют предположить, что плотность поверхностного заряда липидного бислоя является одним из факторов, модулирующих взаимодействия между периферическими белками биомембран.

### ВЫВОДЫ

В настоящей работе с использованием решеточных и континуальных моделей адсорбции больших лигандов на поверхности проведена оценка параметров связывания рибонуклеазы с липосомами, состоящими из смесей ФХ с ДФГ. Показано, что процесс образования белок-липидных комплексов характеризуется положительной кооперативностью, обусловленной, по-видимому, образованием белковых ассоциатов, размер которых возрастает при увеличении заряда липидного бислоя.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Benga G., Holmes R. // *Progr. Biophys. Mol. Biol.* 1984. V.43. P.195-257.
2. Miyazawa S. // *Biopolymers.* 1983. V.22. P.2253-2271.
3. Stankowski S. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1983. V.735. P.341-360.
4. Stankowski S. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1984. V.777. P.167-182.
5. Tamm L., Bartoldus I. // *Biochemistry.* 1988. V.27. P.7453-7458.
6. Chatelier R., Minton A. // *Biophys.J.* 1996. V.71. P.2367-2374.
7. Горбенко Г.П., Древаль В.И. // *Биополимеры и клетка.* 1990. Т.6. С.87-90.
8. Горбенко Г.П., Древаль В.И. // *Укр. биохим. журнал.* 1990. Т. 62. С. 106-111.
9. Горбенко Г.П. // *Укр. биохим. журн.* 1994. Т. 66. С. 99-104.
10. Горбенко Г.П. // *Укр. биохим. журн.* 1996. Т. 68. С.55-60.
11. Горбенко Г.П. // *Биофизика.* 1996. Т. 41. С. 355-362.
12. Горбенко Г.П., Дюбка Т.С. // *Биофизика.* 1996. Т.68. С.348-354.
13. Кантор Ч., Шиммель П. *Биофизическая химия.* М.: Мир, Т. 3. 1985. 535 с.
14. Ивков В.Г., Берестовский Г.Н. *Липидный бислой биологических мембран.* М.: Наука, 1982. 224 с.