



УДК 577.334:591.145.2-812.6:577.352.2.088.5

ИЗУЧЕНИЕ МЕТОДОМ ЭПР ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ЦИТОТОКСИНА II С МОДЕЛЬНЫМИ МЕМБРАНАМИ

© 2001 г. М. А. Дубинный^{#*}, П. В. Дубовский, Ю. Н. Уткин,
Т. Н. Симонова, Л. И. Барсуков, А. С. Арсеньев

Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
117997 ГСП, Москва, В-437, ул. Миклухо-Маклая, 16/10;

* Московский физико-технический институт (Государственный университет),
141700, Московская обл., г. Долгопрудный, Институтский пер., 9

Поступила в редакцию 05.07.2000 г. Принята к печати 03.09.2000 г.

Цитотоксин II из яда среднеазиатской кобры *Naja oxiana*, спин-меченый по Lys35 (SLCT II), исследован методом ЭПР-спектроскопии в водном растворе и при взаимодействии с фосфолипидными везикулами, сформированными из яичного фосфатидилхолина или его смеси с димиристоилфосфатидилглицерином (9 : 1 моль/моль). Анализ данных о распределении SLCT II между водной и липидной фазами в зависимости от концентрации токсина, липида и ионной силы раствора при помощи модифицированного уравнения Гуи–Чапмена, позволяющего учитывать различие заряда цитотоксина в растворе и на мембране, выявил два состояния цитотоксина в мембране. Первое состояние соответствует мономерному SLCT II, который связывается гидрофобными силами с липидной мембраной с константой взаимодействия $(8 \pm 3) \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ и несет заряд 4.4 ± 0.3 . С учетом этих параметров и пространственной структуры цитотоксина II в мицелле додецилфосфохолина сделан вывод, что цитотоксин встраивается преимущественно в область полярных групп липидного бислоя. Второе состояние SLCT II реализуется при больших концентрациях цитотоксина в мембране и соответствует образованию токсин-липидных комплексов с разрушением бислоевой структуры мембраны.

Ключевые слова: кардиотоксин (цитотоксин); спиновая метка; ЭПР; фосфолипидный бислой; модель Гуи–Чапмена.

ВВЕДЕНИЕ

Биологическое действие яда кобры обеспечивается целым рядом компонентов белковой природы, в частности фосфолипазой A₂ и структурно-гомологичными полипептидами: нейротоксинами и кардиотоксинами. Кардиотоксины, они же цитотоксины, относятся к классу миотоксинов, то есть белков, влияющих на функции мышечных волокон. Содержание цитотоксинов в яде кобры достигает 50% сухого веса. *In vivo* они вызывают быстрый лизис сарколеммы, гиперсокращение саркомеров и мышечных волокон [1]. *In vitro* эти белки обуславливают слияние и лизис фосфолипидных везикул, клеточных мембран, модифицируют термотропное поведение гидратированных мультимеллярных фосфолипидных дисперсий [2], дестабилизируя структуру липидного бислоя и индуцируя межмембранное смешивание липидов [3].

Сокращения: ЭПР – электронный парамагнитный резонанс; СТ II – цитотоксин II из яда *Naja oxiana*; SLCT II – спин-меченый по Lys35 СТ II; ЕРС – яичный фосфатидилхолин; DMPG – димиристоилфосфатидилглицерин.

[#] Автор для переписки (тел.: (095) 335-27-33; e-mail: maxim@nmr.ru).

Цитотоксины состоят из 60–62 а. о., из них 10–12 остатков лизина и аргинина. Пространственная структура этих высокоосновных белков консервативна и представлена тремя β-слоями, которые образуют характерную трехпальцевую структуру. Высокая стабильность молекулы обеспечивается четырьмя дисульфидными связями, положение которых одинаково для всех известных типов цитотоксинов и коротких нейротоксинов. Считается, что токсический эффект цитотоксинов обусловлен их действием на плазматическую мембрану клетки [4], однако количественные аспекты токсин-липидного взаимодействия изучены мало. В частности, несмотря на большое количество работ по влиянию цитотоксинов на клеточные и модельные липидные мембраны, в литературе отсутствуют данные по распределению цитотоксинов между водной и липидной фазами в зависимости от концентраций белка и липида.

Источником такой информации могло бы служить изменение вторичной структуры белка при его связывании с мембраной (в этом случае связывание регистрируется, например, по спектрам кругового дихроизма [5]) или изменение флуоресцентных свойств хромофоров, например, трипто-

фана (по спектрам флуоресценции [6]). В некоторых случаях информацию о связывании можно получить по количеству теплоты, выделяющейся при переходе белка из водной фазы в липидное окружение, регистрируемому методом изотермической титрационной калориметрии [7]. Однако перечисленные методы ограниченно применимы к цитотоксинам. Неизвестно, как их структура изменяется при связывании с мембраной [8–10]. Остаток Trp, который мог бы быть удобным хромофором, присутствует только у 23 из известных 52 цитотоксинов [11]. Существует гипотеза, что цитотоксины на поверхности мембраны образуют олигомерный комплекс из нескольких молекул [12]. Тепловые процессы, которые неизбежно сопровождают олигомеризацию белка, накладываются на тепло его связывания с бислоем и затрудняют получение кривой связывания методом изотермической титрационной калориметрии [13].

Достаточно универсальным инструментом изучения липид-белковых взаимодействий может служить метод ЭПР-спектроскопии спиновых меток. Ранее нами описано получение селективно спин-меченого по аминокислоте остатка Lys35 цитотоксина II (SLCT II) из яда кобры *Naja oxiana* с использованием *N*-оксисукцинимидного эфира 2,2,5,5-тетраметилпирролин-*N*-оксил-3-карбоновой кислоты [14]. Показано, что ЭПР-спектр отчетливо изменяется при переходе SLCT II из водной фазы в липидный бислои. СТ II* принадлежит к кардиотоксинам Р-типа, которые взаимодействуют с нейтральными и отрицательно заряженными фосфолипидными мембранами концевыми участками первой и второй петель молекулы [15]. В настоящей работе, используя SLCT II, мы изучили связывание цитотоксина II с везикулами (диаметр 100 нм) различного фосфолипидного состава и в рамках теории Гуи–Чапмена оценили гидрофобную и электростатические составляющие этого взаимодействия.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Спектры ЭПР спин-меченого цитотоксина

Ранее в литературе уже было описано получение спин-меченых производных цитотоксина с неспецифическим введением спиновой метки по остаткам лизина [16, 17]. При этом спектры ЭПР свидетельствовали о наличии как минимум двух меченых остатков с различной степенью иммобилизации спиновой метки [18], а в присутствии фосфолипидных мембран число компонент спектра увеличилось, что затрудняло интерпретацию результатов. Используемый нами селективно-меченый SLCT II дает однокомпонентный спектр ЭПР как в растворе (рис. 1а), так и при связывании с

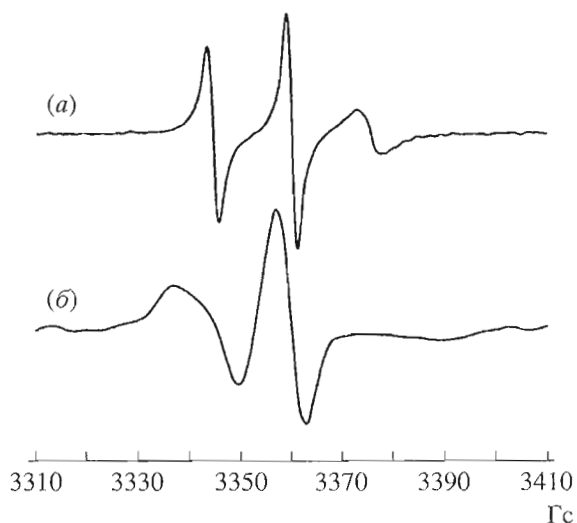


Рис. 1. Спектры ЭПР свободного SLCT II в растворе (ацетатный буфер 25 мМ, pH 5.5, 18°C) (а) и мембрано-связанного SLCT II (20 мкМ SLCT II, 2 мМ EPC/DMPG, 25 мМ ацетатный буфер, pH 5.5, 18°C) (б).

моноамеллярными липосомами (рис. 1б), что подтверждает селективность модификации белка. Различие этих спектров позволяет проводить количественный анализ связывания цитотоксина II с липидным бислоем.

Кривые связывания

Для анализа взаимодействия SLCT II с модельными фосфолипидными липосомами мы использовали зависимость степени связывания белка с мембраной (r) от концентрации белка в растворе (C_{pf}) (в дальнейшем кривые связывания). Степень связывания определяется как отношение концентрации мембраносвязанного белка (C_{pb}) к концентрации липида (C_L):

$$r = \frac{C_{pb}}{C_L} \quad (1)$$

Кривая связывания содержит в себе информацию о распределении белка между раствором и липидным бислоем при различных концентрациях белка и липида. На рис. 2 показана геометрическая интерпретация кривой связывания, которая наглядно иллюстрирует равновесие в системе липид/белок. Для того чтобы определить, как белок распределится между раствором и липидной мембраной, необходимо дополнить кривую связывания уравнением, выражающим закон сохранения вещества для белка:

$$C_{pf} + rC_L = C_p, \quad (2)$$

здесь C_p – суммарная концентрация белка в системе. Уравнение (2) задает прямую линию в координатах кривой связывания, которая пересекает ось

* В некоторых работах цитотоксин II из яда *Naja oxiana* обозначают аббревиатурой Vc5.

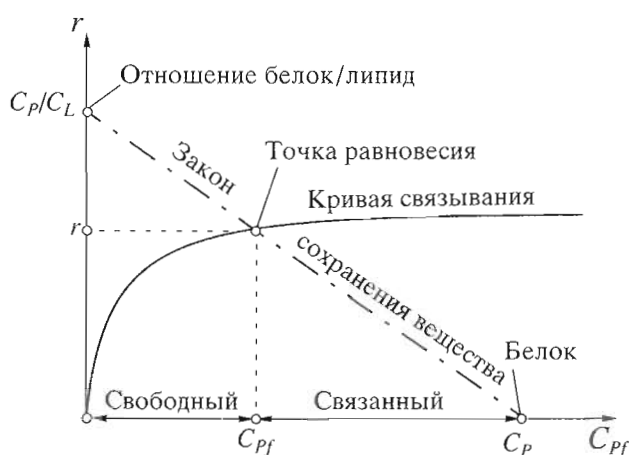


Рис. 2. Схема распределения белка между раствором и липидным бислоем. По оси абсцисс отложена концентрация свободного белка C_{pf} , по оси ординат — степень связывания r . Прямая линия задается уравнением (2) (закон сохранения вещества для белка). Она пересекает ось абсцисс в точке, равной суммарной концентрации белка в растворе и на мембране, и ось ординат в точке, равной молярному отношению белок/липид. Точка пересечения кривой связывания с данной прямой определяет равновесное состояние системы белок/липид. Перпендикуляр, опущенный из точки пересечения на ось абсцисс, отсекает на ней два отрезка: длина левого соответствует концентрации свободного белка, а длина правого — концентрации связанного белка.

абсцисс в точке, соответствующей C_p , и ось ординат в точке, соответствующей отношению белок/липид C_p/C_L . Положение равновесия определяется пересечением кривой связывания с прямой, заданной уравнением (2). Перпендикуляр, опущенный вниз из точки пересечения, отсекает на оси абсцисс два отрезка, из которых левый равен концентрации свободного белка C_{pf} , а правый — концентрации связанного белка C_p (рис. 2). Таким образом, кривая связывания позволяет моделировать распределение белка между водной и липидной фазами.

Титрование липосом цитотоксином

Поскольку в результате проведенных нами экспериментов оказалось, что механизм взаимодействия СТ II с липосомами сильно зависит от соотношения липид/белок, мы использовали два варианта смешивания белка с липидом: титрование липосом SLCT II (в дальнейшем титрование “белок в липид”) и титрование SLCT II липосомами (“липид в белок”). В обоих случаях процесс оказался равновесным, о чем свидетельствовали спектры ЭПР, которые не зависели от времени (до 24 ч), прошедшего после смешивания SLCT II и раствора липосом.

Для получения кривой связывания методом “белок в липид” использовали раствор липосом, состоящих из смеси яичного фосфатидилхолина (ЕРС) и димиристоилфосфатидилглицерина (DMPG) в соотношении 9 : 1 (моль/моль) при суммарной концентрации липида 0.6 мМ. На рис. 3 приведена серия спектров, полученных в результате титрования. Видно, что при первом добавлении цитотоксина спектр ЭПР соответствует практически полностью мембраносвязанному SLCT II (рис. 1б), в то время как при дальнейшем добавлении белка в спектре появляется свободная компонента (рис. 1а), доля которой растет с увеличением концентрации цитотоксина. Полученные экспериментальные спектры, содержащие в некотором соотношении свободную и мембраносвязанную компоненту, будем называть суммарными спектрами, а спектры SLCT II в растворе и в мембраносвязанном состоянии — базисными спектрами.

Каждый из суммарных спектров может быть разложен на базисные компоненты так, что коэффициенты разложения дают относительное содержание свободного и мембраносвязанного SLCT II. Коэффициенты разложения могут быть найдены по методу наименьших квадратов (см. “Эксперимент. часть”) из уравнения:

$$P = (B^T B)^{-1} B^T S, \quad (3)$$

здесь в столбцах матрицы S находятся суммарные спектры, в столбцах матрицы B — базисные компоненты (спектры свободного и мембраносвязанного SLCT II, нормированные на двойной интеграл), в столбцах матрицы P находятся коэффициенты разложения соответствующих суммарных спектров. По найденным коэффициентам разложения P вычисляются теоретические спектры:

$$S^{\text{теор}} = B P. \quad (4)$$

На рис. 4а показан суммарный спектр SLCT II в сравнении с теоретическим, а на рис. 4б их разница (остаток разложения) $S - S^{\text{теор}}$. Хорошо видно, что остаток разложения представляет из себя небольшие случайные колебания, и это доказательство того, что каждый из зарегистрированных экспериментальных спектров представим в виде соответствующей линейной комбинации спектров свободного и мембраносвязанного SLCT II. Для количественной характеристики качества разложения использовалось отношение стандартного отклонения остатка разложения от нуля к пиковой амплитуде сигнала:

$$\eta = \frac{\sqrt{D(S - S^{\text{теор}})}}{\text{PPA}(S)} \times 100\%, \quad (5)$$

здесь D обозначает дисперсию и $\text{PPA}(S)$ представляет пиковую амплитуду сигнала, которая определяется как разница между максимальным и ми-

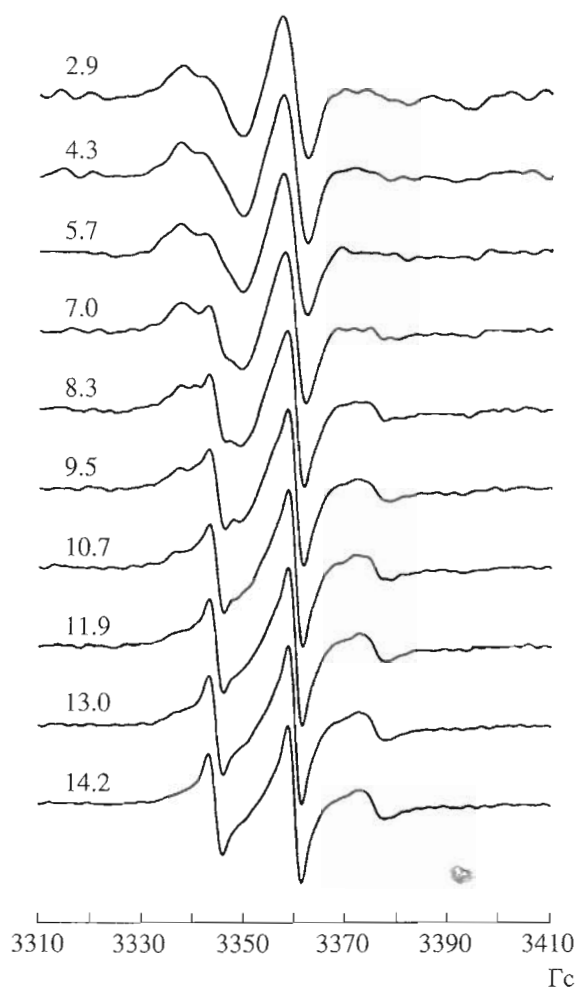


Рис. 3. Спектры ЭПР SLCT II, полученные методом титрования “белок в липид”. Исходная концентрация липида 0.6 мМ EPC/DMPG-липосомы, 25 мМ ацетатный буфер, pH 5.5, 1 мМ EDTA, 18°C. Концентрация SLCT II (мкМ) приведена рядом со спектрами.

нимальным значением ординаты спектра. Во всех случаях значение η не превышало 5%.

По найденной матрице P легко находится доля мембраносвязанного SLCT II (рис. 5а):

$$\theta_j = \frac{P_{2,j}}{P_{2,j} + P_{1,j}}, \quad (6)$$

а также концентрация свободного SLCT II C_{Pf} и степень связывания r :

$$C_{P_{f,j}} = C_{P,j}(1 - \theta_j), \quad r_j = \frac{C_{P,j}\theta_j}{C_{L,j}}, \quad (7)$$

здесь $C_{P,j}$ и $C_{L,j}$, соответственно, общие концентрации белка и липида в растворе на j -м шаге титрования. Зависимость r_j от $C_{P_{f,j}}$ задает экспериментальную кривую связывания белка с липидным бислоем (рис. 5б).

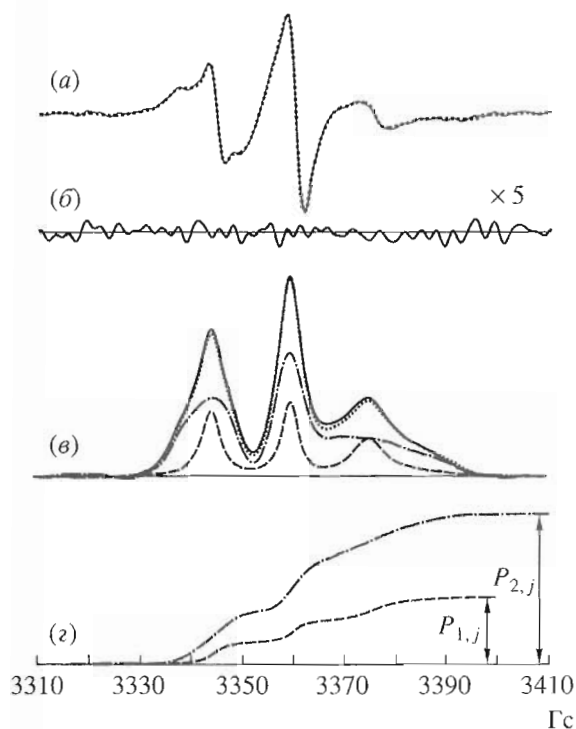


Рис. 4. Разложение двухкомпонентного спектра ЭПР на свободную и мембраносвязанную составляющую. (а) Спектр SLCT II, соответствующий концентрации цитотоксина 9.5 мкМ (рис. 3) в сравнении с теоретическим спектром (пунктир). Теоретический спектр рассчитан по формулам (3), (4). (б) Остаток разложения – разница между экспериментальным и теоретическим спектром. (в) Первые интегралы (спектры поглощения) для экспериментального (сплошная линия), теоретического (пунктир) спектра ЭПР, а также для свободной (штрих) и мембраносвязанной (штрих-пунктир) компонент. (г) Интегралы спектров поглощения свободной (штрих) и мембраносвязанной компонент (штрих-пунктир). Указаны величины $P_{1,j}$ и $P_{2,j}$, пропорциональные концентрации свободного и мембраносвязанного SLCT II, соответственно.

Полученные экспериментальные данные анализировали в рамках модели Гуи–Чапмена [5, 7, 19], которая в данной работе была модифицирована (см. “Эксперимент. часть”) с целью учета отличия заряда белка в растворе (z_{PS}) от заряда после связывания с липидной мембраной (z_{PM}):

$$C_{Pf} = \frac{r}{\beta K} \exp \left[\frac{2z_{PS}}{z_s} \operatorname{arsh} b \left(z_L + \frac{r z_{PM}}{\beta} \right) \right], \quad (8)$$

здесь K (M^{-1}) – константа связывания белка с мембраной, которая наблюдалась бы в отсутствие электростатического взаимодействия между белком и липидной мембраной, соответственно, z_L – средний заряд липидной молекулы ($z_L = -0.1$ для EPC/DMPG-липосом), β – доля липидной поверхности, доступной белку для связывания, z_s – заряд ионов электролита ($z_s = 1$), b – параметр, учитываю-

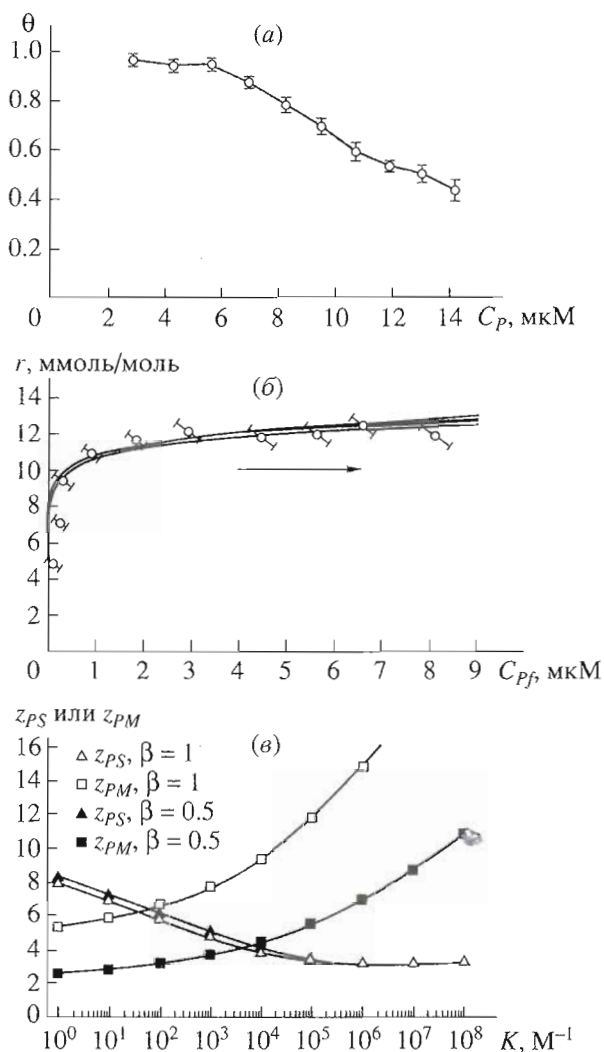


Рис. 5. Титрование EPC/DMPG-липосом спин-меченым цитотоксином по схеме "белок в липид". Исходная концентрация липида 0.6 мМ, 25 мМ ацетатный буфер, pH 5.5, 1 мМ EDTA. (а) Зависимость доли мембраносвязанного SLCT II (θ) от суммарной концентрации цитотоксина (C_p). Данные усреднены по результатам четырех экспериментов, показана статистическая погрешность θ . (б) Кривая связывания (зависимость степени связывания r от концентрации свободного SLCT II C_{pf}). Показана статистическая погрешность, которая ориентирована вдоль прямой линии на рис. 2 (закон сохранения вещества для белка). Стрелка указывает направление титрования. Тонкие сплошные линии рассчитаны по теории Гуи-Чапмена для $\beta = 0.5$ при пяти значениях константы связывания $K = 1, 10^2, 10^4, 10^6$ и $10^8 M^{-1}$ и значениях заряда белка, указанных на рис. 5в. (в) Результат нелинейной регрессии кривой связывания рис. 5б к изотерме Гуи-Чапмена. Регрессия проводилась при различных значениях константы связывания K для определения значений заряда белка в растворе (z_{PS} , треугольники) и на мембране (z_{PM} , квадраты), в предположении, что связывание происходит с обеими сторонами мембраны ($\beta = 1$, белые маркеры) либо только с одной стороной мембраны ($\beta = 0.5$, черные маркеры). При любых значениях константы из приведенного на рисунке диапазона теоретическая кривая описывает полученную экспериментальную зависимость (см. рис. 5б).

щий концентрацию электролита ($b = 15.2$ для 25 мМ ацетатного буфера pH 5.5).

Анализ производили в предположении равенства ($z_{PS} = z_{PM} = z_p$) или различия ($z_{PS} \neq z_{PM}$) зарядов SLCT II в растворе и на поверхности мембраны. В предположении равенства зарядов два неизвестных параметра (заряд z_p и константа K) однозначно находят нелинейной регрессией уравнения (8) к экспериментальной кривой связывания. Результат регрессии в предположении связывания только с наружной стороной мембраны ($\beta = 0.5$) приводит к следующим значениям параметров: заряд цитотоксина $z_p = 4.2 \pm 0.4$ и константа связывания $K = (4.5 \pm 2) \times 10^3 M^{-1}$. Связывание с обеими сторонами мембраны представляется маловероятным, поскольку цитотоксин является высокоосновным водорастворимым белком.

Анализ экспериментальной кривой связывания в предположении $z_{PS} \neq z_{PM}$ затруднен тем, что три неизвестных параметра (K, z_{PS} и z_{PM}) не могут быть однозначно найдены из экспериментальных данных. Для того чтобы проанализировать экспериментальную кривую связывания в этом предположении, значение константы связывания было зафиксировано и, положив ее известной, методом нелинейной регрессии находились значения z_{PS} и z_{PM} (рис. 5в). Как видно из рисунка, заряды z_{PS} и z_{PM} зависят от константы K по закону, близкому к логарифмическому, поэтому даже небольшое различие в их величинах приводит к изменению в оценке константы связывания в несколько раз. Следует также заметить, что экспериментальные данные могут быть достаточно хорошо согласованы с любым значением константы K за счет выбора подходящих (различных) значений z_{PS} и z_{PM} , при этом вид теоретической кривой связывания практически не изменится (см. рис. 5б).

Заряды белка в растворе z_{PS} и на поверхности мембраны z_{PM} могут различаться, например, из-за изменения локального pH вблизи поверхности мембраны и/или изменения pK_a ионогенных групп белка, взаимодействующих с мембраной. В молекуле SLCT II присутствует единственная ионогенная группа, титрующаяся в районе pH 5.5, а именно имидазольное кольцо остатка His31. Показано [20], что для раствора СТ II в воде pK_a остатка His31 составляет 5.15, в то время как при связывании СТ II с мицеллами додецилфосфохолина значение pK_a возрастает до 5.75. Предположим, что такое же изменение pK_a остатка His31 будет наблюдаться и при переходе спин-меченого аналога цитотоксина (SLCT II) из водной фазы на поверхность липосом. Тогда в наших условиях (ацетатный буфер pH 5.5) эффективный заряд остатка His31 при переходе SLCT II из водного окружения на поверхность липосом должен увеличиться на 0.5 единицы. Полагая в уравнении (8) $z_{PM} = z_{PS} + 0.5$,

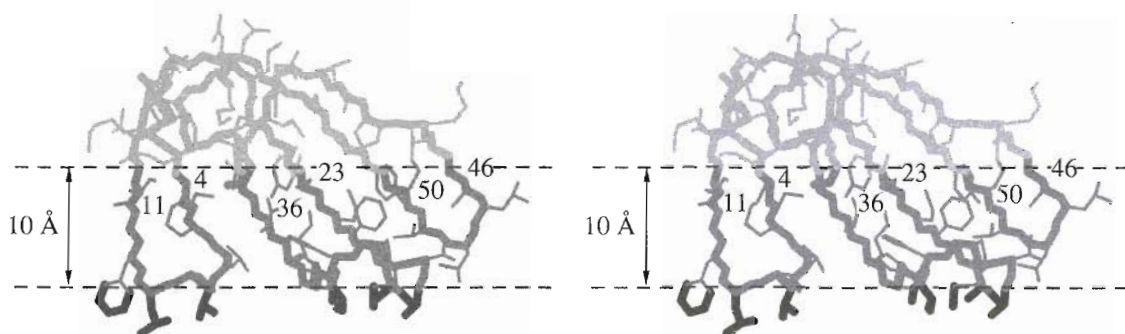


Рис. 6. Глубина проникновения и ориентация СТ II в мембране (стереоизображение). Фрагменты СТ II, проникающие в гидрофобную область бислоя, в область полярных групп и экспонированные в водную фазу показаны, соответственно, черным, темно-серым и светло-серым цветами. Штриховыми линиями ограничена область полярных групп липидных молекул. Цифрами обозначены соответствующие аминокислотные остатки, находящиеся на границе раздела липидный бислой/вода.

получим после нелинейной регрессии к данным рис. 5б значение константы связывания $K = (8 \pm 3) \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ и значения зарядов белка $z_{PS} = 3.9 \pm 0.3$ и $z_{PM} = 4.4 \pm 0.3$.

Исходя из константы $K = (8 \pm 3) \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ можно оценить свободную энергию перехода раствор/липосома: $\Delta G = -RT \ln 55.5 K = -7.5 \pm 0.5 \text{ ккал/моль}$ [5]. При связывании с липосомой молекула SLCT II теряет одну поступательную и две вращательные степени свободы, что соответствует приблизительно 12 ккал/моль свободной энергии. Таким образом, при связывании с мембраной полное изменение свободной энергии составляет $-19.5 \pm 0.5 \text{ ккал/моль}$. Поскольку перенос белка в неполярное окружение сопровождается изменением свободной энергии на $-15 \dots -20 \text{ ккал/моль}$ в расчете на 1 \AA^2 [21, 22], то площадь белка, погруженная в гидрофобную область липидного бислоя может быть оценена как $950 \dots 1300 \text{ \AA}^2$.

Ранее нами было показано [20], что СТ II взаимодействует с мицеллами додецилфосфохолина окончаниями трех гидрофобных петель, включая остатки 4–11, 23–36, 46–50. При этом глубина погружения молекулы СТ II в мицеллу определяется поясом полярных боковых цепей остатков 4, 5, 12, 23, 31, 35, 36 и 50, заряженные группы которых должны либо находиться на границе раздела липид/вода, либо быть экспонированы в водную фазу. Исходя из пространственной структуры СТ II в комплексе с мицеллой додецилфосфохолина [20], величина погруженной в мицеллу площади поверхности молекулы составляет 2700 \AA^2 . Однако необходимо учесть, что вклад в энергию гидрофобного взаимодействия дают только те атомы, которые контактируют с гидрофобной частью мицеллы (липосомы). Считая, что погруженность SLCT II в липосомы такая же, как и погруженность СТ II в мицеллы, и полагая толщину слоя полярных групп липидных молекул равной 10 \AA [23] (рис. 6), получим площадь поверхности молекулы

SLCT II, погруженной в гидрофобную часть липосомы равную 1100 \AA^2 , что находится в хорошем согласии с вышеприведенной оценкой $950 \dots 1300 \text{ \AA}^2$. Модель взаимодействия СТ II с мембраной показана на рис. 6.

Титрование цитотоксина липосомами

Методом титрования “липид в белок” получены четыре кривых связывания. Из них три кривые связывания с заряженными липосомами состава EPC/DMPG (9 : 1) при разных концентрациях KCl (0, 50 и 125 mM) и одна кривая связывания с нейтральными EPC-липосомами в отсутствие KCl (рис. 7). Методика разделения спектров и расчета кривой связывания была такой же, как и при титровании методом “белок в липид”. Различие между двумя способами титрования в том, что в одном случае концентрация свободного цитотоксина C_{pf} изменяется от меньших значений к большим, а в другом случае – от больших к меньшим, что показано стрелками на рис. 5б и рис. 7. Более слабое связывание с нейтральными EPC-липосомами, чем с отрицательно заряженными EPC/DMPG-липосомами, а также уменьшение связывания с увеличением концентрации соли (рис. 7) подтверждает существенную роль электростатики во взаимодействии цитотоксинов с липидным бислоем [6].

Как видно из рис. 7, кривые связывания, полученные методом титрования “липид в белок”, сильно отличаются от кривой, полученной методом “белок в липид”, а также от кривых связывания, задаваемых уравнением Гуи–Чапмена (уравнение (8)). Следует заметить, что титрование методом “липид в белок” является традиционным, в частности, при изучении липид-белковых взаимодействий методом изотермической титрационной калориметрии [7]. В нашем же случае классическая кривая связывания Гуи–Чапмена была получена только при титровании методом “белок в

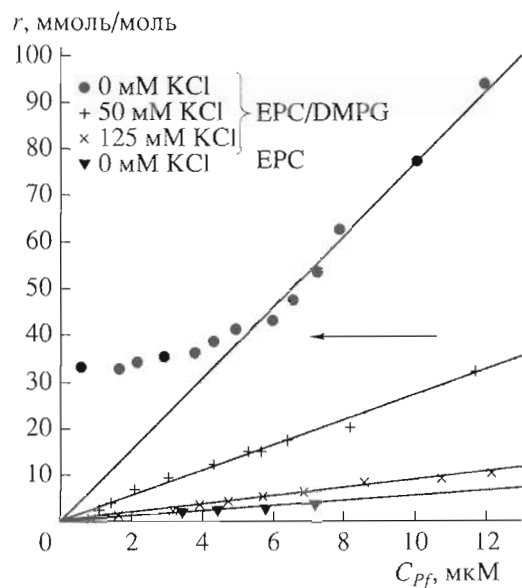


Рис. 7. Кривые связывания SLCT II с липосомами, полученные по схеме титрования “липид в белок” (25 мМ ацетатный буфер, pH 5.5, 1 мМ EDTA, 18°C). Концентрация KCl и тип липосом указан на рисунке, стрелкой обозначено направление титрования. Прямые линии получены регрессией к прямой пропорциональности и соответствуют эффективным константам связывания (сверху вниз): 7640, 2700, 870 и 540 M^{-1} . Прямолинейные участки кривых титрования не могут быть согласованы с уравнением Гуи–Чапмена при значении заряда белка на мембране $z_{PM} > 0.05$ и предположительно соответствуют разрушению бислоевой структуры липида с образованием токсин-липидных комплексов.

липид”, при котором липид всегда находится в большом избытке по отношению к цитотоксину.

Главная отличительная особенность кривых связывания, полученных методом “липид в белок”, — наличие линейных участков (рис. 7). Эти участки не могут быть описаны в рамках модели Гуи–Чапмена при значении заряда белка на мембране z_{PM} , превышающем 0.05. Поскольку SLCT II содержит остаток Lys35 нейтрализован при модификации СТ II спиновой меткой) и только два отрицательно заряженных, столь малое значение заряда цитотоксина при связывании с мембраной представляется маловероятным.

Для интерпретации кривых связывания “липид в белок” мы учли мембранолитические свойства СТ II и, следовательно, возможность разрушения липидного бислоя с последующим формированием токсин-липидного комплекса. Известно, что цитотоксины при высокой концентрации способны вызывать лизис клеточных и модельных липидных мембран, приводя к разрушению их бислоевой структуры [2, 24]. При исследовании методом ^{31}P -ЯМР кардиотоксина IIа *Naja mossaibica* [25] наблюдалось появление гидрофобного ком-

плекса при высоких соотношениях кардиотоксина/липид. При низких соотношениях кардиотоксина/липид происходила агрегация комплексов с формированием новой бислоевой структуры. В нашем эксперименте в первых точках титрования по методу “липид в белок” имелся большой избыток SLCT II, в частности, в самой верхней точке рис. 7 отношение связанных токсин/липид достигает высокой величины — 100 ммоль/моль, что соответствует одной связанной молекуле белка на 10 молекул липида. В то же время площадь, занимаемая одной молекулой цитотоксина на поверхности бислоя, составляет 420 \AA^2 [26]. Таким образом, причина дестабилизации бислоя может заключаться в том, что SLCT II, встраиваясь преимущественно в область полярных групп мембраны (рис. 6), существенно увеличивает объем и плотность упаковки ее полярной области, что приводит к уменьшению плотности упаковки гидрофобной области.

В рамках рассматриваемой модели вид кривых связывания объясняется следующим образом. В условиях большого избытка SLCT II, а именно, когда его степень связывания с липидом превышает критическое значение 35 ммоль/моль (рис. 7), бислоевая организация липида становится энергетически невыгодной и мембрана разрушается с образованием токсин-липидных комплексов, имеющих спектр ЭПР, близкий к спектру мембраносвязанного SLCT II. После разрушения бислоя вид кривой связывания определяется взаимодействием цитотоксина с образовавшимися липидными комплексами и может быть описан серией бимолекулярных равновесий вида $CT + CT_{k-1}L \rightleftharpoons CT_kL$, $k = 1, \dots, N_{CT}$, здесь L обозначает липидный комплекс (мицеллу), N_{CT} — максимальное количество молекул SLCT II, которое может связаться с одним липидным комплексом. Анализ бимолекулярных равновесий в предположении независимого связывания молекул цитотоксина с липидным комплексом показывает, что при условии $K C_{pf} \ll 1$ (K — константа связывания SLCT II с липидом) кривая связывания описывается простой зависимостью:

$$r = \frac{K}{N_L} C_{pf}, \quad (9)$$

здесь N_L — количество молекул липида в комплексе. Данная зависимость описывает прямую пропорциональность, которая и наблюдается в отсутствие соли при соотношении токсин/липид > 35 ммоль/моль и при соотношении токсин/липид > 1 ммоль/моль в присутствии 50 и 125 мМ KCl (рис. 7). Иными словами, поведение кривых связывания свидетельствует о том, что присутствие ионов электролита в физиологических концентрациях способствует разрушению липидного бислоя. Значительно более слабый эффект соли

наблюдался в работе [6], где комплекс кардиотоксина II *Naja mossaibica* с отрицательно заряженными липосомами (100% фосфатидилсерин) был стабилен при концентрации ионов Na и K до 1 М. Данное отличие в эффекте ионов электролита может быть объяснено отличным, чем в нашей работе, содержанием отрицательно заряженного липида в липосомах.

При дальнейшем добавлении липида концентрация SLCT II в растворе и его степень связывания с липидом уменьшается и при достижении критического соотношения связанный токсин/липид 35 ммоль/моль токсин-липидные комплексы становятся энергетически менее выгодными и происходит регенерация бислоевой структуры липида. Этим объясняется наличие горизонтального участка на кривой связывания, полученной в отсутствие соли по схеме титрования "липид в белок" (верхняя кривая на рис. 7): этот участок может соответствовать связыванию с бислоем в соответствии с уравнением Гуи-Чапмена. Однако расхождение между высотой плато при титровании методом "липид в белок" (рис. 7) и "белок в липид" (рис. 5б) более чем в два раза свидетельствует о более сложном механизме взаимодействия токсина с липидными структурами на данном участке кривой связывания.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Анализ кривых связывания SLCT II с фосфолипидными везикулами, сформированными из яичного фосфатидилхолина или его смеси с димиристоилфосфатидилглицерином, свидетельствует о наличии двух разных способов взаимодействия цитотоксина II с мембраной. Первый способ реализуется в случае избытка липида по отношению к цитотоксину и соответствует взаимодействию мономерного цитотоксина с внешним монослоем везикул без разрушения их структуры. Такое гидрофобное взаимодействие характеризуется значением константы связывания $K = (8 \pm 3) \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ и эффективными зарядами белка в растворе $z_{PS} = 3.9 \pm 0.3$ и на поверхности мембраны $z_{PM} = 4.4 \pm 0.3$. На основании полученной константы и структуры цитотоксина в комплексе с мицеллой додецилфосфохолина [20] предложена модель взаимодействия СТ II с липидным бислоем в этом состоянии. Второй способ взаимодействия наиболее вероятно сопровождается разрушением бислоевой структуры с образованием токсин-липидных комплексов, что проявляется в сильном изменении формы кривых связывания SLCT II с фосфолипидом и в отклонении от теории Гуи-Чапмена.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Химическая модификация и очистка спин-меченого по Lys35 цитотоксина II описаны ранее

[14]. EPC и DMPG (Sigma) использовали без дополнительной очистки.

Приготовление липосом. Моноламеллярные липосомы диаметром 100 нм состава EPC/DMPG (9 : 1), а также липосомы из EPC готовили следующим образом. Смесь фосфолипидов в требуемой пропорции в виде раствора в хлороформе упаривали досуха на ротаторном испарителе и остаток растворителя удаляли под вакуумом. После этого добавляли 25 мМ ацетатный буфер pH 5.5. Полученную встряхиванием липидную дисперсию подвергали не менее 10 циклам замораживания-оттаивания с использованием жидкого азота и образовавшуюся взвесь 11 раз продавливали через поликарбонатный фильтр (Липософаст) с диаметром пор 100 нм, после чего к полученному образцу добавляли EDTA.

Схемы титрования. Титрование проводили по схеме "липид в белок" или "белок в липид".

Титрование по схеме "липид в белок". Раствор SLCT II (20 мкМ) в 25 мМ ацетатном буфере pH 5.5, 1 мМ EDTA, содержащий заданное количество KCl, помещали в кювету ЭПР-спектрометра (объем 200 мкл) и регистрировали ЭПР-спектр. Затем в кювету добавляли 5–10 мкл 15 мМ раствора липидов (липосомы) в том же буфере с той же концентрацией KCl и EDTA, раствор перемешивали в кювете и снимали спектр. После этого добавляли новую порцию раствора липосом, перемешивали, снимали новый спектр и так 7–10 раз. Таким методом провели три титрования в присутствии 0, 50 и 125 мМ KCl с добавлением EPC/DMPG-липосом и одно титрование в отсутствие KCl с добавлением цвиттерионных EPC-липосом. Разведение раствора, не превышающее 30%, учитывали при расчете концентрации токсина и липида. Вклад 25 мМ ацетатного буфера pH 5.5 в ионную силу раствора составляет 18 мМ ($b = 15.2$, см. уравнения (18), (19)).

Титрование по схеме "белок в липид". Раствор EPC/DMPG-липосом, суммарная концентрация липида 0.6 мМ в 25 мМ ацетатном буфере pH 5.5, содержащий 1 мМ EDTA в отсутствие KCl, помещали в кювету ЭПР-спектрометра (объем 200 мкл). Затем в кювету добавляли порциями по 3 мкл раствор 0.1 мМ SLCT II, перемешивали и снимали спектр ЭПР, добавляли новую порцию SLCT II и т.д.

Базисные ЭПР-спектры для процедуры разделения на свободную и мембраносвязанную компоненты регистрировали в следующих условиях: спектр 50 мкМ SLCT II (рис. 1а) был получен в 25 мМ ацетатном буфере pH 5.5. Спектр 20 мкМ SLCT II в присутствии 2 мМ EPC/DMPG (токсин полностью связан с липосомами, рис. 1б) записан в отсутствие ионов KCl.

Регистрация спектров ЭПР. Спектры ЭПР регистрировали при комнатной температуре (~18°C) на спектрометре Varian E-109, рабочая частота 9.5 ГГц (X-диапазон), с использованием прямо-

угольного резонатора E-248. Запись спектров производили при следующих значениях параметров: диапазон сканирования 3310–3410 Гс, частота модуляции 100 кГц, мощность СВЧ-поля 15 мВт, время сканирования 8 мин, постоянная времени 1 с. В серии спектров, полученных по схеме “липид в белок”, амплитуда модуляции составляла 2 Гс. В серии спектров, полученных по схеме “белок в липид”, каждый спектр регистрировали при значениях амплитуды модуляции: 2.0, 4.0, 6.3 и 10 Гс. Спектры с цифровым разрешением 1024 точки на спектр сохраняли в ASCII-формате.

Обработка спектров ЭПР. Обработку полученных спектров проводили в пакете программ Mathematica. До этапа разложения спектра на свободную и мембраносвязанную составляющие со спектрами проводились следующие операции: коррекция базовой линии, сглаживание шумов, центрирование спектров по полю и нормирование на величину двойного интеграла либо на амплитуду шума.

Базовую линию корректировали с использованием такого многочлена второй степени, чтобы обнулить значения спектра на концах области сканирования и одновременно получить нулевое значение первого интеграла от спектра. Шумы сглаживали Фурье-фильтрацией: после преобразования Фурье обнуляли высокочастотную область с сохранением первых 30–40 гармоник и проводили обратное преобразование Фурье. Для компенсации дрейфа магнитного поля спектрометра, в некоторых случаях достигающего $\pm 0.2 \dots 0.3$ Гс, проводили центрирование спектров по полю. Для этого спектры сдвигали вдоль поля так, чтобы точка пересечения центральной линии сверхтонкого расщепления с базовой линией совпадала с центром области сканирования (3360 Гс). Технически процедура сдвига реализована добавлением фазового множителя к Фурье-образу сигнала. Вычисление двойного интеграла производили методом прямоугольников. Качество полученного двойного интеграла проверяли визуально, типичный пример приведен на рис. 4г. Во всех случаях начальный и конечный участок двойного интеграла представлял из себя горизонтальное плато, поэтому значение двойного интеграла брали как разницу ординат между конечным и начальным участком.

В зависимости от дальнейшей задачи, спектры нормировали либо на величину двойного интеграла, чтобы различные спектры соответствовали одинаковой концентрации парамагнитных молекул [27], либо на величину шума, определенную как среднеквадратичное отклонение сигнала от нуля на краях диапазона сканирования. На всех рисунках спектры нормированы на пиковую амплитуду сигнала.

Разложение суммарных спектров. Разделение суммарных спектров на базисные компоненты (спе-

ктры свободного и мембраносвязанного SLCT II) проводили методом наименьших квадратов с помощью следующей процедуры. Обозначим серию суммарных спектров матрицей S_{ij} , $i = 1, \dots, N$, $j = 1, \dots, M$. Здесь переменная i пробегает значения абсциссы каждого спектра, N – количество точек в цифровом представлении спектра (в нашем случае $N = 1024$), j – номер спектра, а M количество суммарных спектров. Таким образом, суммарные спектры расположены в столбцах матрицы S . Базисные спектры, нормированные на двойной интеграл, обозначим B_{ik} , где $i = 1, \dots, N$, $k = 1, \dots, L$, L – число базисных спектров. Базисные спектры находятся в столбцах матрицы B . Пусть матрица P_{kj} ($k = 1, \dots, L$, $j = 1, \dots, M$) содержит коэффициенты разложения суммарных спектров S по базису B . В этом случае линейная комбинация базисных спектров B с коэффициентами даст теоретические спектры

$$S_{ij}^{\text{теор}} = \sum_{m=1}^L B_{im} P_{mj}, \quad \text{или} \quad S^{\text{теор}} = BP, \quad (10)$$

которые должны быть максимально близки к экспериментальным спектрам S . Для нахождения коэффициентов разложения P минимизируем сумму квадратов отклонений теоретических спектров от экспериментальных:

$$\sum_{i=1}^N \left(\sum_{m=1}^L B_{im} P_{mj} - S_{ij} \right)^2 \rightarrow \min \quad (11)$$

по P_{mj} при заданном j .

Дифференцируя это выражение по P_{lj} , $l = 1, \dots, L$ и приравнявая к нулю производную, получим:

$$(B^T B)P = B^T S. \quad (12)$$

Линейная система уравнений (12), рассматриваемая относительно P , имеет квадратную матрицу коэффициентов. Чтобы ее определитель $|B^T B|$ был отличен от нуля, необходимо, чтобы все базисные спектры были линейно независимы, а также чтобы число точек в спектре было больше или равно числу базисных спектров ($N \geq L$). При выполнении этого условия решение системы (12) запишется в виде уравнения (3):

$$P = (B^T B)^{-1} B^T S,$$

которое задает коэффициенты разложения серии спектров S по базису B методом наименьших квадратов: элемент P_{kj} – относительный вклад k -го базисного спектра в j -й суммарный спектр. В нашем случае величины $P_{1,j}$ и $P_{2,j}$ пропорциональны концентрациям свободного и мембраносвязанного SLCT II, соответственно.

Уравнение Гуи–Чапмена. Модель Гуи–Чапмена является наиболее распространенным теоре-

тическим описанием кривых связывания белков с липидным бислоем [5, 7, 19]. Ниже приводится вывод обобщенного уравнения Гуи–Чапмена с целью учета двух факторов: собственного заряда липидного бислоя и различия заряда белка в растворе и на поверхности липида.

При связывании заряженного белка с нейтральной или заряженной липидной мембраной существенная роль принадлежит электростатическим взаимодействиям. Связавшись с мембраной, белок изменяет ее заряд, добавляя к заряду липида свой собственный. Таким образом, связывание белка с мембраной существенно зависит от потенциала мембраны и ее собственного заряда. Гуи и Чапмен предложили уравнение, которое связывает электрический потенциал мембраны (ψ) с плотностью заряда на поверхности мембраны (σ). Потенциал зависит от концентрации C_S и зарядов ионов $\pm z_s$ фонового электролита:

$$\sigma = \sqrt{8\epsilon\epsilon_0 RTC_S} \operatorname{sh}\left(\frac{z_s \psi}{2 \psi_0}\right), \quad (13)$$

$$\psi_0 = \frac{RT}{F} = 25 \text{ мВ},$$

здесь $\epsilon = 81$ – диэлектрическая проницаемость воды, ϵ_0 – электрическая постоянная, R – газовая постоянная, T – температура, F – постоянная Фарадея. Уравнение (13), которое можно назвать электростатическим уравнением состояния липидного бислоя, выведено в предположении, что мембрана является бесконечной равномерно заряженной плоскостью и не содержит допущения о малости потенциала мембраны ψ по сравнению с ψ_0 .

Наличие у мембраны электростатического потенциала вызывает отталкивание одноименно заряженных частиц от поверхности мембраны и притяжение к ней частиц противоположного знака. Для белка, концентрация которого на большом удалении от мембраны равна C_{pf} , а заряд в растворе – z_{ps} , концентрация непосредственно над поверхностью мембраны $C_p(0)$ будет составлять:

$$C_p(0) = C_{pf} \exp\left(-z_{ps} \frac{\psi}{\psi_0}\right). \quad (14)$$

Обычно концентрация белка много меньше концентрации соли и влиянием заряда белка на ионную силу раствора можно пренебречь. Физический смысл заряда z_{ps} – это работа против электростатических сил, которая должна быть совершена для переноса молекулы белка из раствора на поверхность мембраны, деленная на электростатический потенциал мембраны.

Связываться с мембраной может только тот белок, который находится непосредственно над ее поверхностью. При этом для малой степени связывания белка с мембраной (r) можно пользо-

ваться простейшим соотношением в виде прямой пропорциональности [5]:

$$C_p(0) = \frac{r}{\beta K}. \quad (15)$$

Отметим, что уравнение (15) применимо только при отсутствии олигомеризации белка на поверхности мембраны. Константа K , имеющая размерность M^{-1} , представляет собой константу связывания с мембраной, которая наблюдалась бы в отсутствие электростатического взаимодействия между белком и липидной мембраной. Параметр β есть доля липидной поверхности, доступной белку для связывания. Для больших моноламеллярных липосом $\beta = 0.5$, так как белок может связываться только с внешней поверхностью бислоя.

Для вывода уравнения кривой связывания необходимо учесть изменение заряда мембраны при связывании с ней заряженного белка:

$$\sigma = \frac{e}{A_L} \left(z_L + \frac{r z_{PM}}{\beta} \right), \quad (16)$$

здесь e – элементарный заряд, A_L – площадь, занимаемая одной молекулой липида на поверхности мембраны ($A_L = 68 \text{ \AA}^2$ [5, 28]), z_L – средний заряд одной молекулы липида, z_{PM} – заряд белка на поверхности мембраны. Физический смысл заряда z_{PM} – это изменение суммарного заряда мембраны при связывании одной молекулы белка. Подчеркнем, что при выводе уравнения кривой связывания мы не предполагаем равенство зарядов белка в растворе z_{ps} и на поверхности мембраны z_{PM} .

Уравнения (13)–(16) могут быть решены в явном виде. Для этого из них необходимо исключить параметры ψ , σ и $C_p(0)$. В результате получим уравнение, которое опишет кривую связывания белка с мембраной, то есть зависимость степени связывания белка с мембраной r от его концентрации в растворе C_{pf} . Исключим из уравнений (13) и (16) плотность заряда мембраны σ :

$$\frac{e}{A_L} \left(z_L + \frac{r z_{PM}}{\beta} \right) = \sqrt{8\epsilon\epsilon_0 RTC_S} \operatorname{sh}\left(\frac{z_s \psi}{2 \psi_0}\right)$$

и выразим из полученного уравнения электрический потенциал мембраны ψ :

$$\frac{\psi}{\psi_0} = \frac{2}{z_s} \operatorname{arsh} b \left(z_L + \frac{r z_{PM}}{\beta} \right), \quad \text{где} \quad (17)$$

$$b = \frac{e}{A_L \sqrt{8\epsilon\epsilon_0 RTC_S}}. \quad (18)$$

Параметр b является безразмерной характеристикой и обычно известен из условий проведения

эксперимента. В нашем случае ($A_L = 68 \text{ \AA}^2$, $\varepsilon = 81$, $T = 291 \text{ K}$):

$$b = \frac{2.04}{\sqrt{C_S}}, \quad (19)$$

где для получения правильных численных значений концентрация C_S должна быть выражена в М. С учетом уравнений (14), (15) и (17) получим выражение для C_{Pf} (уравнение (8)):

$$C_{Pf} = \frac{r}{\beta K} \exp \left[\frac{2z_{PS}}{z_s} \operatorname{arsh} b \left(z_L + \frac{r z_{PM}}{\beta} \right) \right].$$

Уравнение (8) в сочетании с (18) или (19) задает кривую связывания белка с липидной мембраной. Его частный случай при $z_s = 1$, $z_L = 0$, $z_{PS} = z_{PM}$ предложен в работе [19]. Если имеется экспериментально полученная кривая связывания, то согласовав ее с уравнением (8), например, по методу наименьших квадратов, можно оценить область допустимых значений неизвестных параметров K , z_{PS} и z_{PM} . Большинство авторов (см. например [5]) полагают в уравнении (8) $z_{PS} = z_{PM} = z_p$, в этом случае неизвестными являются только два параметра: константа связывания K и заряд белка z_p .

БЛАГОДАРНОСТИ

Финансовая поддержка данной работы осуществлялась грантом "Университеты России – фундаментальные исследования" № 414/98/1ДП, грантом ГНТП "Новейшие методы биоинженерии" № 03.0001-306, грантом РФФИ № 99-04-48886 и частично проектом CRP/RUS98-01 Международного Центра геномной инженерии и биотехнологии. Дубинный М. А. выражает признательность доктору G. Schwarz (Department of Biophysical Chemistry, Biocenter of the University of Basel, Switzerland) за ценную дискуссию по уравнению Гуи–Чапмена.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Fletcher J.E., Hubert M., Wieland S.J., Gong Q.H., Jiang M.S. // *Toxicon*. 1996. V. 34. P. 1301–1311.
2. Aripov T.F., Rozenshtein I.A., Salakhutdinov B.A., Lev A.A., Gottlib V.A. // *Gen. Physiol. Biophys.* 1987. V. 6. P. 343–357.
3. Гасанов С.Э., Арипов Т.Ф., Салахутдинов Б.А. // *Биофизика*. 1990. V. 35. P. 958–962.
4. Bougis P.E., Tessier M., van Rietschoten J., Rochat H., Faucon J.F., Dufourcq J. // *Mol. Cell. Biochem.* 1983. V. 55. P. 49–64.
5. Beschiaschvili G., Seelig J. // *Biochemistry*. 1990. V. 29. P. 52–58.
6. Dufourcq J., Faucon J.F. // *Biochemistry*. 1978. V. 17. P. 1170–1176.
7. Seelig J. // *Biochim. Biophys. Acta*. 1997. V. 1331. P. 103–116.
8. Dufourcq J., Faucon J.F., Bernard E., Pezolet M., Tessier M., van Rietschoten J., Delori P., Rochat H. // *Toxicon*. 1982. V. 20. P. 165–174.
9. Pezolet M., Pezolet L., Bougis P., Faucon J.F., Dufourcq J. // *Biochim. Biophys. Acta*. 1982. V. 704. P. 515–523.
10. Dauplais M., Neumann J.M., Pinkasfeld S., Menez A., Roumestand C. // *Eur. J. Biochem.* 1995. V. 230. P. 213–220.
11. Kumar T.K., Jayaraman G., Lee C.S., Arunkumar A.I., Sivaraman T., Samuel D., Yu C. // *J. Biomol. Struct. Dyn.* 1997. V. 15. P. 431–463.
12. Bilwes A., Rees B., Moras D., Menez R., Menez A. // *J. Mol. Biol.* 1994. V. 239. P. 122–136.
13. Wenk M.R., Seelig J. // *Biochemistry*. 1998. V. 37. P. 3909–3916.
14. Уткин Ю.Н., Дубовский П.В., Дубинный М.А., Жаравин В.А., Симонова Т.Н., Барсуков Л.И., Арсеньев А.С. // *Биоорганическая химия*. 1999. Т. 25. С. 930–932.
15. Chien K.Y., Chiang C.M., Hseu Y.C., Vyas A.A., Rule G.S., Wu W. // *J. Biol. Chem.* 1994. V. 269. P. 14473–14483.
16. Gasanov S.E., Alsarraj M.A., Gasanov N.E., Rael E.D. // *J. Membr. Biol.* 1997. V. 155. P. 133–142.
17. Арипов Т.Ф., Салахутдинов Б.А., Ташмухамедов Б.А., Садыков А.С. // *Докл. АН СССР*. 1982. Т. 262. С. 1275–1277.
18. Кузнецов А.Н. *Метод спинового зонда*. М.: Наука, 1976. С. 24–116.
19. Schwarz G., Beschiaschvili G. // *Biochim. Biophys. Acta*. 1989. V. 979. P. 82–90.
20. Dubovskii P.V., Dementieva D.V., Bocharov E.V., Utkin Yu.N., Arseniev A.S. // *J. Mol. Biol.* 2001. V. 305. P. 137–149.
21. Chothia C. // *Nature*. 1974. V. 248. P. 338–339.
22. Richards F.M. // *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.* 1977. V. 6. P. 151–176.
23. Marsh D.M.A. *CRC Handbook of Lipid Bilayers*. Boston: CRC Press, 1990. P. 87.
24. Aripov T.F., Gasanov S.E., Salakhutdinov B.A., Rozenshtein I.A., Kamaev F.G. // *Gen. Physiol. Biophys.* 1989. V. 8. P. 459–474.
25. Picard F., Pezolet M., Bougis P.E., Auger M. // *Biophys. J.* 1996. V. 70. P. 1737–1744.
26. Bougis P., Rochat H., Pieroni G., Verger R. // *Biochemistry*. 1981. V. 20. P. 4915–4920.
27. Берлинер Л. *Метод спиновых меток: теория и применение*: Пер. с англ. М.: Мир, 1979. С. 292–294.
28. Chiang C.M., Chien K.Y., Lin H.J., Lin J.F., Yeh H.C., Ho P.L., Wu W.G. // *Biochemistry*. 1996. V. 35. P. 9167–9176.

An ESR Study of the Cytotoxin II Interaction with Model Membranes

M. A. Dubinnyi^{***}, P. V. Dubovskii^{*}, Yu. N. Utkin^{*},
T. N. Simonova^{*}, L. I. Barsukov^{*}, and A. S. Arseniev^{*}

^{*}*Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,
ul. Miklukho-Maklaya 16/10, GSP Moscow, 117997 Russia*

^{**}*Moscow Institute of Physics and Technology (State University), Institutskii per. 9,
Dolgoprudnyi, Moscow oblast, 141700 Russia*

Cytotoxin II from the venom of the Central-Asian cobra *Naja oxiana* spin-labeled at Lys35 (SLCT II) was studied by ESR spectroscopy in aqueous solution and upon interaction with phospholipid vesicles from egg phosphatidylcholine or its mixture with dimyristoylphosphatidylglycerol (molar ratio 9 : 1). The distribution of SLCT II between the aqueous and lipid phases depended on the toxin and lipid concentrations and on the solution ionic strength. It was analyzed using the modified Gouy–Chapman equation that takes into account different charges of the cytotoxin in solution and in membrane. The analysis revealed two states of the cytotoxin–lipid complex. The first state corresponds to monomeric SLCT II hydrophobically interacting with the lipid membrane [a binding constant of $(8 \pm 3) \times 10^3 \text{ M}^{-1}$] and carrying the charge of 4.4 ± 0.3 . On the basis of these parameters and the spatial structure of cytotoxin II in dodecylphosphocholine micelles, we concluded that the cytotoxin is mainly incorporated into the region of polar groups of the lipid bilayer. The second state of SLCT II is realized at high cytotoxin concentrations in the membrane and corresponds to the formation of toxin–lipid complexes that destruct the membrane bilayer structure.

Key words: cardiotoxin (cytotoxin), ESR, Gouy–Chapman model, phospholipid bilayer, spin label

[#] *To whom correspondence should be addressed; phone: +7 (095) 335–2733; e-mail: maxim@nmr.ru.*

The full English version of the paper is published in *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2001, vol. 27, no. 2, and is also available (free) at <http://www.maik.ru/>.