

УДК 577.37

**RESONANCE ENERGY TRANSFER STUDY OF HEMOGLOBIN BINDING TO MODEL LIPID MEMBRANES****О.К. Kutsenko, G.P. Gorbenko, V.M. Trusova***V.N. Karazin Kharkov National University, 4 Svobody Sq., Kharkov, 61077*

Submitted 31 May, 2010

Accepted 17 June, 2010

In the present study fluorescence resonance energy transfer (FRET) technique was employed to obtain the information about the structure of hemoglobin (Hb) complexes with model lipid membranes of different composition. For this purpose three membrane probes, 3-methoxybenzanthrone (MBA), 4-dimethylaminochalcone (DMC) and 6-propionyl-2-dimethylaminonaphthalene (Prodan) were assessed as possible donors for heme moiety of the protein. Model membranes were composed of zwitterionic lipid phosphatidylcholine (PC), anionic lipid cardiolipin (CL) and cholesterol (Chol). FRET measurements were interpreted in terms of the model of energy transfer in two-dimensional systems proposed by Fung and Stryer and further extended by Davenport et al. No FRET was observed between Prodan and Hb because Prodan under the employed experimental conditions was not distributed into the lipid bilayer. In the case of DMC, Hb-induced oxidative processes in the lipid phase hampered the estimation of Hb location in a lipid bilayer. Therefore, structural analysis of Hb-lipid complexes was carried out using MBA as a donor. First, the donor quantum yield, Förster radii and fluorescence anisotropy of the probes have been measured. Second, the amount of Hb bound to model membranes was estimated in terms of the lattice models of large ligand adsorption to lipid bilayers allowing for the possibility of protein insertion into membrane interior. Finally, the distance from acceptor plane to the bilayer center and the depth of Hb penetration into lipid bilayer were calculated. It was assumed that protein binds to membranes in the form of dimers and penetrates into the membrane interior. In neutral liposomes Hb penetrates only to the depth of lipid headgroups. The observed higher extent of Hb penetration into Chol containing bilayer as compared to PC liposomes may be a consequence of specific Hb-Chol interaction. In the case of PC/CL liposomes Hb was found to insert in the non-polar membrane region. Taking into account the possibility of forming the inverted hexagonal structures in the presence of CL, it cannot be excluded that Hb being entrapped in such structures, translocates through the membrane. If this phenomenon takes place, deeper Hb penetration into lipid bilayer might be expected. The obtained results can be useful for exact characterization of Hb binding to the membranes.

**KEY WORDS:** hemoglobin, model membranes, protein-lipid complexes, fluorescence energy transfer.**ИССЛЕДОВАНИЕ СВЯЗЫВАНИЯ ГЕМОГЛОБИНА С МОДЕЛЬНЫМИ ЛИПИДНЫМИ МЕМБРАНАМИ МЕТОДОМ РЕЗОНАНСНОГО ПЕРЕНОСА ЭНЕРГИИ****О.К. Куценко, Г.П. Горбенко, В.М. Трусова***Харьковский национальный университет имени В.Н. Каразина, пл. Свободы, 4, Харьков, 61077*

В данной работе метод индуктивно резонансного переноса энергии (ИРПЭ) был применен для исследования структуры комплексов гемоглобина (Hb) с модельными липидными мембранами различного состава. Для достижения цели в качестве доноров применялись три мембранных зонда 3-метоксибензантрон (МБА), 4-диметиламинохалкон (ДМХ) и 6-пропионил-2-диметиламинонафтален (Продан), а акцептором выступала гемовая группа Hb. Модельные мембраны состояли из цвиттерионного липида фосфатидилхолина (ФХ), анионного липида кардиолипина (КЛ) и холестерина (Хол). Данные ИРПЭ интерпретировались в рамках модели переноса энергии в двумерных системах, предложенной Фангом и Страером и позднее расширенной Дэвенпорт и др. Между Проданом и Hb не наблюдалось переноса энергии вследствие того, что при используемых экспериментальных условиях зонд практически не распределялся в липидную фазу. В случае ДМХ окислительные процессы, инициированные Hb, затруднили определение положения гемоглобина на липидном бислое. Таким образом, анализ структуры Hb-липидных комплексов проводился с применением МБА в качестве донора. Вначале были измерены квантовый выход, анизотропия флуоресценции доноров и радиусы Ферстера. Затем проводилась оценка связанного с мембранами Hb в рамках решеточных моделей адсорбции больших лигандов, учитывающих проникновение белка в бислои. Затем рассчитывали расстояние плоскости акцепторов до центра бислоя и глубину проникновения белка в мембрану. Высказано предположение, что Hb связывается с мембранами в виде димеров и проникает во внутреннюю область бислоя. В нейтральных липосомах Hb проникает только на глубину липидных головок. Возможно, большая глубина проникновения белка в бислои, содержащий Хол, по сравнению с ФХ мембранами является

## Resonance energy transfer study of hemoglobin binding to model lipid membranes

следствием специфического взаимодействия Hb с Хол. В случае липосом, содержащих КЛ, белок проникает в неполярную область мембраны. Кроме того, если принять во внимание возможность формирования инвертированных гексагональных структур в присутствии КЛ, нельзя исключить тот факт, что при попадании Hb в такие структуры он может проникать через мембрану. В таком случае можно допустить более глубокое проникновение белка в бислой. Полученные данные могут быть полезными для детальной характеристики связывания Hb с мембранами.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** гемоглобин, модельные мембраны, белок-липидные комплексы, резонансный перенос энергии.

### ДОСЛІДЖЕННЯ ЗВ'ЯЗУВАННЯ ГЕМОГЛОБІНУ З МОДЕЛЬНИМИ ЛІПІДНИМИ МЕМБРАНАМИ МЕТОДОМ РЕЗОНАНСНОГО ПЕРЕНОСУ ЕНЕРГІЇ

**О.К. Куценко, Г.П. Горбенко, В.М. Трусова**

*Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна, пл. Свободи, 4, Харків, 61077*

В даній роботі метод індуктивно резонансного переносу енергії (ІРПЕ) був використаний для дослідження структури комплексів гемоглобіну (Hb) з модельними ліпідними мембранами різного складу. У якості донорів застосовувались три мембранні зонди 3-метоксибензантрон (МБА), 4-діметиламінохалкон (ДМХ) та 6-пропіоніл-2-діметиламінонафтален (Продан), а акцептором виступала гемова група Hb. Модельні мембранні складалися з цвіттеріонного ліпиду фосфатидилхоліну (ФХ), аніонного ліпиду кардіоліпіну (КЛ) та холестерину (Хол). Дані ІРПЕ інтерпретувались у рамках моделі переносу енергії в двовимірних системах, запропонованої Фангом і Страером та пізніше розширеної Девенпорт та ін. Між Проданом та Hb не спостерігалось переносу енергії внаслідок того, що за застосованих експериментальних умов зонд практично не розподілявся у ліпідну фазу. У випадку ДМХ окиснювальні процеси, ініційовані Hb, ускладнили визначення положення білка у ліпідному бішарі. З огляду на це, аналіз структури Hb-ліпідних комплексів проводився із застосуванням МБА у якості донора. Спочатку були проведені вимірювання квантового виходу донорів, анізотропії флуоресценції зондів та радіуси Фьорстера. Потім проводилася оцінка зв'язаного з мембранами Hb у рамках решіткових моделей адсорбції великих лігандів, які враховують проникнення білка у бішар. Потім розраховувались відстань площини акцепторів до центру бішару та глибина проникнення білка у мембрану. Було висловлено припущення, що Hb зв'язується з мембранами у вигляді димерів та проникає у внутрішню область мембрани. У нейтральних липосомах Hb проникає тільки на глибину ліпідних голівок. Можна припустити, що більша глибина проникнення білка у бішар, який містить Хол, у порівнянні з ФХ мембранами, може бути наслідком специфічної взаємодії Hb з Хол. У випадку липосом, які містять КЛ, білок проникає у неполярну область мембрани. Крім того, якщо взяти до уваги можливість формування інвертованих гексагональних структур в присутності КЛ, не можна виключити, що при включенні Hb у такі структури, білок може проникати через мембрану. У такому випадку можна припустити більш глибоке проникнення білка у бішар. Отримані дані можуть бути корисними для детальної характеристики зв'язування Hb з мембранами.

**КЛЮЧОВІ СЛОВА:** гемоглобін, модельні мембрани, білок-ліпідні комплекси, резонансний перенос енергії

Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET), is an increasingly popular method used to measure the distances between two fluorophores. Resonance energy transfer occurs only over very short distances, typically within 10 nm, and involves the direct transfer of excited state energy from the donor fluorophore to an acceptor. A donor chromophore, initially in its electronic excited state, may transfer energy to an acceptor chromophore through nonradiative dipole–dipole interaction. In most applications, the donor and acceptor dyes are different, and FRET can be detected by measuring the fluorescence of the acceptor or quenching of the donor fluorescence [1].

The resonance transfer of energy between molecules, or between constituents of a large molecule, plays a central role in many areas of modern biochemistry and biophysics. FRET is an important technique for investigating a variety of biological phenomena which produce changes in molecular proximity. It is a useful tool to quantify intra- and intermolecular interactions in biological systems, such as protein-lipid, protein-DNA interactions, and protein conformational changes. Since fluorophores can be employed to specifically label biomolecules and the distance condition for FRET is of the order of the diameter of most biomolecules, FRET is often used to determine when and where two or more biomolecules interact within their physiological surroundings [2, 3].

The validity of distance estimates derived from FRET crucially depends on the adequacy of the employed theoretical model. This model must take into account peculiar properties of investigated systems, for example specific features of the donor and acceptor distribution or