



УДК 547.915.5 : 422.23

КОНФОРМАЦИЯ ФОСФОРИЛХОЛИНОВЫХ ГРУПП  
В ФОСФОЛИПИДНЫХ МЕМБРАНАХ \**Барсуков Л. И., Шапиро Ю. Е., Викторов А. В.,\*\*  
Волкова В. И.\*\*\*, Быстров В. Ф., Бергельсон Л. Д.**Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина  
Академии наук СССР, Москва*

Методом спектроскопии  $^1\text{H}$ -ЯМР и  $^{13}\text{C}$ -ЯМР с применением гидрофильных парамагнитных зондов  $\text{Pr}^{3+}$ ,  $\text{Eu}^{3+}$ ,  $\text{Yb}^{3+}$  изучена конформация фосфорилхолиновой группировки на поверхности везикулярных фосфолипидных мембран. Путем сопоставления экспериментально найденных величин псевдоконтактных сдвигов для групп  $\text{POCH}_2$ ,  $\text{N}^+\text{CH}_2$  и  $\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$  с теоретически вычисленными определен относительный вклад *транс*- и *госи*-форм фосфорилхолиновой цепи. Показано, что основной вклад вносят *транс*-формы, причем удельный вес последних возрастает со степенью ненасыщенности холин-фосфатидов, а также с ростом температуры. Сделан вывод, что в везикулярных бислоиных мембранах фосфорилхолиновая группировка ориентирована параллельно поверхности фосфолипидного бислоя и ее конформация не зависит от наличия парамагнитных ионов. Обсуждаются факторы, стабилизирующие развернутую конформацию фосфорилхолиновой группы на поверхности бислоиных мембран.

Конформация и ориентация фосфорилхолиновой группировки в модельных мембранах исследовалась разнообразными физико-химическими методами (см. обзор [2]), однако данные, полученные различными авторами, оказались противоречивыми. Так, результаты рентгеноструктурного анализа многослойных систем были интерпретированы одними авторами как свидетельствующие о том, что цвиттерийная часть молекулы ориентирована параллельно плоскости мембраны [3], тогда как другие пришли к выводу, что она ориентирована перпендикулярно [4].

В литературе описано несколько попыток использовать спектроскопию ЯМР для определения конформации полярной группировки лецитинов в органических растворителях и в водной среде [5—7]. Однако до сих пор не решен вопрос об ориентации и конформации фосфорилхолиновых остатков в озвученных водных дисперсиях лецитина — наиболее часто используемой модели фосфолипидных мембран. Прямое использование констант спин-спинового взаимодействия в полном объеме в этом случае затруднено из-за уширения линий в спектрах ЯМР. В настоящей работе для решения этого вопроса использовался предложенный нами несколько лет назад метод изучения мембранных систем с помощью гидрофильных парамагнитных зондов [8—13].

При добавлении парамагнитных ионов лантанидов к обработанным ультразвуком дисперсиям яичного лецитина и сфингомиелина в  $\text{D}_2\text{O}$

\* Предварительное сообщение см. [4].

\*\* ВНИИ медицинских полимеров Министерства медицинской промышленности СССР, Москва.

Таблица 1

Индукцированные  $Pt^{3+}$  сдвиги ( $\Delta\delta$ ) в спектрах  $^{13}C$ - и  $^{31}P$ -ЯМР водных ( $D_2O$ ) 20% дисперсий яичного лецитина и сфингомиелина \*

Группа	$\Delta\delta$ , м. д.		Группа	$\Delta\delta$ , м. д.	
	яичный лецитин	сфингомиелин		яичный лецитин	сфингомиелин
$POCH_2$	2,97	4,02	$CH_2OSO$ -глицерин	-0,3	—
$CH_2N^+$	1,82	2,49	$CH_2OR$ -глицерин	-0,3	—
$N(CH_3)_3$	0,97	1,43	$CHOSO$ -глицерин	-0,2	—
$C=O$	-0,37	-0,94	$CHON$	—	-0,2
$CH_2C=O$	-0,18	-0,42	$^{31}P$	10,15	17,50
$CH_2CH_2C=O$	-0,08	—			

\*  $Pt(NO_3)_3$  добавляли к фосфолипидной дисперсии после обработки ультразвуком в концентрации 0,05 М (при съемке спектров  $^{13}C$ -ЯМР) и 0,01 М (при съемке спектров  $^{31}P$ -ЯМР). Температура в датчике спектрометра 30°.

Таблица 2

Приведенный псевдоконтактный сдвиг ( $\Delta\delta_{пр}^*$ ) сигнала группы  $POCH_2$  и соотношение сдвигов сигналов групп  $CH_2CO$ ,  $POCH_2$ ,  $N^+CH_2$  и  $N^+(CH_3)_3$  в спектрах  $^1H$ -ЯМР водных ( $D_2O$ ) дисперсий \*\* яичного лецитина и дипальмитоиллецитина и водных ( $D_2O$ ) растворов лизолецитина, фосфата холина и диацетата глицерофосфорилхолина

Образец	Температура, °C	$\Delta\delta_{пр}$ , м. д.	$\Delta\delta_{CH_2CO} : \Delta\delta_{POCH_2} : \Delta\delta_{N^+CH_2} : \Delta\delta_{N^+(CH_3)_3(1)}$
Лизолецитин	30	10,63	-0,03 : 1 : 0,57 : 0,24
Фосфат холина	30	21,33	— 1 : 0,38 : 0,21
Диацетат глицерофосфорилхолина	30	0,27	— 1 : 0,63 : 0,13
Дипальмитоиллецитин	50	6,40	-0,03 : 1 : 0,70 : 0,42
	60	6,46	-0,01 : 1 : 0,66 : 0,39
Яичный лецитин	30	8,70	-0,08 : 1 : 0,59 : 0,35
	50	9,00	-0,06 : 1 : 0,55 : 0,32
	60	9,14	-0,05 : 1 : 0,52 : 0,32

$$* \Delta\delta_{пр} = \frac{[\text{фосфолипид}]}{[Pt^{3+}]} \cdot \Delta\delta.$$

\*\*  $Pt(NO_3)_3$  вводили в липидные дисперсии до обработки ультразвуком.

сигналы, относящиеся к различным группам полярной части молекулы, смещаются в разной степени. Так, при добавлении  $Pt^{3+}$  сигналы от ядер  $^1H$  и  $^{13}C$  холинового остатка (группы  $POCH_2$ ,  $N^+CH_2$  и  $N^+Me_3$ ) смещаются в слабое поле, а сигналы  $^{13}C$  от групп  $CH_2CH_2CO$  жирнокислотных остатков и от групп  $CH_2OSO$ ,  $CH_2OR$  и  $CHOSO$  глицеринового остатка — в область сильного поля (табл. 1 и 2). Наибольшее смещение испытывают сигналы от ядер группы  $POCH_2$ , далее сдвиг уменьшается в ряду  $POCH_2 > N^+CH_2 > N^+Me_3$ , т. е. индуцируемые парамагнитные сдвиги сигналов от ядер холиновой цепи уменьшаются по мере их удаления от фосфатной группировки. Качественно подобная картина изменения индуцированных сдвигов наблюдается также в спектрах  $^1H$ -ЯМР водных ( $D_2O$ ) растворов фосфата холина, диацетата глицерофосфорилхолина и лизолецитина (табл. 2). Сигналы от группировок  $CH_3$ ,  $(CH_2)_n$ ,  $CH_2CH=CH$  и  $CH=CH$ , находящихся в гидрофобной области липидного бислоя, практически не меняют своего положения в спектрах лецитиновых везикулярных мембран. Это означает, что парамагнитные ионы связываются по фосфатным группам лецитиновых молекул и не входят в гидрофобную область бислоя.

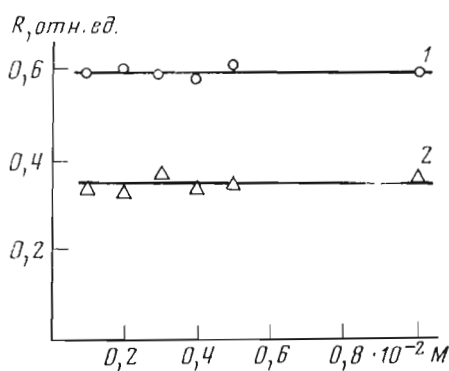


Рис. 1. Отношения (R) индуцированных сдвигов сигналов  $^1\text{H}$  от групп  $\text{N}^+\text{CH}_2$  (1) и  $\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$  (2) к сдвигу сигнала  $\text{POCH}_2$  при различных концентрациях  $\text{Pr}(\text{NO}_3)_3$ . Концентрация яичного лецитина 0,13 М

с конформацией молекулы, постоянство отношений (1) свидетельствует также о том, что относительный вес отдельных конформаций фосфорилхолиновой цепи не зависит от концентрации лантанидов в указанном диапазоне. Напротив, отношения (1) для различных фосфорилхолиновых производных сильно различаются (табл. 2), что может объясняться различиями в конформации цвиттериона (см. ниже). В связи с этим особенно интересны различия в отношениях (1) для яичного лецитина и дипальмитоиллецитина, показывающие, что конформация цвиттериона, по-видимому, существенно зависит от степени ненасыщенности углеводородных цепей. В то же время зависимость отношений (1) от температуры может свидетельствовать об изменении вклада отдельных конформаций при изменении температуры (см. ниже).

Поскольку в спектрах  $^1\text{H}$ -ЯМР отношение индуцированных сдвигов:

$$\Delta\delta_{\text{POCH}_2} : \Delta\delta_{\text{N}^+\text{CH}_2} : \Delta\delta_{\text{N}^+(\text{CH}_3)_3} \quad (1)$$

не зависит от концентрации парамагнитных ионов в интервале  $10^{-3}$ — $10^{-2}$  М (рис. 1), можно предположить, что состав комплекса (фосфатная группа — лантанид) в указанном диапазоне концентраций остается постоянным. Постоянство соотношений сдвигов, индуцированных различными лантанидами ( $\text{Eu}^{3+}$ ,  $\text{Pr}^{3+}$  и  $\text{Yb}^{3+}$ , табл. 3), показывает, что индуцированные сдвиги псевдоконтактны по своей природе [14, 15]. Поскольку величина псевдоконтактного сдвига зависит от пространственной ориентации данной группы по отношению к парамагнитному центру, т. е. связана

Таблица 3

Соотношение сдвигов сигналов групп  $\text{POCH}_2$ ,  $\text{N}^+\text{CH}_2$  и  $\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ , индуцируемых различными лантанидами в спектрах  $^1\text{H}$ - и  $^{13}\text{C}$ -ЯМР бислоиных везикулярных мембран, приготовленных из яичного лецитина \*

Лантанид	$\Delta\delta_{\text{POCH}_2} : \Delta\delta_{\text{N}^+\text{CH}_2} : \Delta\delta_{\text{N}^+(\text{CH}_3)_3}$ (1)	
	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$
$\text{Eu}^{3+}$	1 : 0,59 : 0,37	—
$\text{Pr}^{3+}$	1 : 0,59 : 0,35	1 : 0,61 : 0,36
$\text{Yb}^{3+}$	—	1 : 0,60 : 0,36

\* 5 мМ  $\text{Pr}(\text{NO}_3)_3$ , 10 мМ  $\text{Eu}(\text{NO}_3)_3$  или 10 мМ  $\text{Yb}(\text{NO}_3)_3$  добавляли в дисперсию яичного лецитина до обработки ультразвуком (при съемке спектров  $^1\text{H}$ -ЯМР) или после обработки ультразвуком (при съемке спектров  $^{13}\text{C}$ -ЯМР). Температура в датчике спектрометра 30°.

Чтобы определить вклад тех или иных конформаций, мы провели расчет относительных псевдоконтактных сдвигов сигналов от ядер  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  групп  $\text{POCH}_2$ ,  $\text{N}^+\text{CH}_2$ ,  $\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$  для всех ротамеров фосфорилхолинового цвиттериона, изображенных на рис. 2. Перебор ротамеров при расчете проводился в направлении от фосфатной группы, связывающей парамагнитный ион: I → II → III. Как видно из рис. 2, существует по три ротамера при вращении вокруг связей С—С (III) и С—О (II) и шесть ротамеров при вращении вокруг связи Р—О (I).

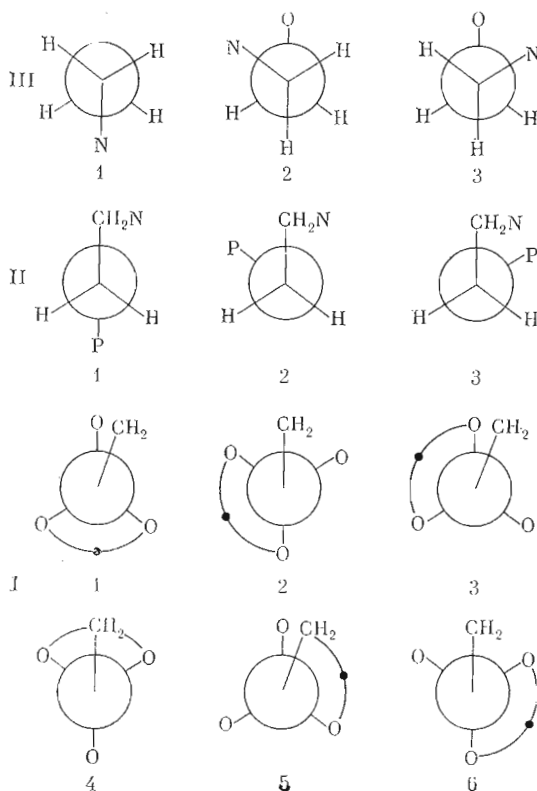


Рис. 2. Ротамеры фосфорилхолиновой группы относительно связей P—O (I), C—O (II) и C—C (III). В тексте и на рис. 3 и 4 конформеры обозначены трехзначным кодом, согласно которому первая цифра обозначает ротамер по связи P—O, вторая — ротамер по связи C—O и третья — ротамер по связи C—C.

Величина псевдоконтактного сдвига рассчитывалась по уравнению (2) [16]:

$$\Delta\delta = \delta_{[Ln] \neq 0} - \delta_{[Ln] = 0} = k(3 \cos^2 \theta - 1)/r^3, \quad (2)$$

где  $k$  — коэффициент, зависящий от температуры и компонент  $g$ -тензора магнитной анизотропии;  $\theta$  — угол, описывающий положение ядра относительно оси аксиальной симметрии  $g$ -тензора;  $r$  — расстояние ядра от парамагнитного катиона. Угловая составляющая  $(3 \cos^2 \theta - 1)$  определяет знак псевдоконтактного сдвига: ядра, лежащие в пределах углов от  $54,7$  до  $125,3^\circ$ , должны иметь сдвиги, знак которых противоположен знаку сдвигов, отвечающих ядрам с углом  $\theta$  от  $0$  до  $54,7$  и от  $125,3$  до  $180^\circ$ . Расчет расстояний и углов проводился с использованием молекулярных моделей, исходя из предположений, что парамагнитный катион симметрично связан с двумя атомами кислорода фосфатной группы и что расстояние  $Ln^{3+} - O$  равно  $3,0 \text{ \AA}$  (по литературным данным расстояние между лантанидом и координационным центром комплексона варьирует в различных комплексах в пределах от  $2,5$  до  $3,5 \text{ \AA}$  [17, 18]).

Для ядер  $^1H$  псевдоконтактные сдвиги рассчитывались для каждого протона групп  $CH_2$  и  $CH_3$  холинового остатка, а затем было взято среднеарифметическое значение. Среднеарифметическими значениями являются также значения псевдоконтактных сдвигов, рассчитанные для ядер  $^{13}C$  группы  $N^+(CH_3)_3$ .

На рис. 3 и 4 вычисленные с помощью уравнения (2) значения относительных псевдоконтактных сдвигов сигналов  $^1H$  и  $^{13}C$  от  $N^+(CH_3)_3$ -

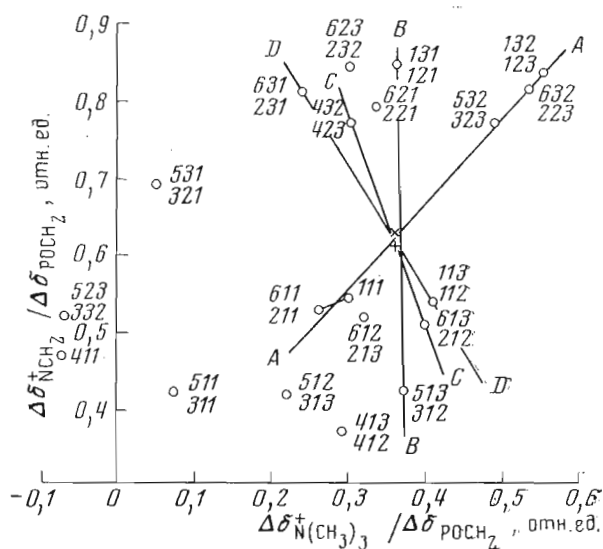


Рис. 3. Карта индуцированных сдвигов для ядер  $^{13}\text{C}$  фосфорилхолинового цвиттериона. Обозначения конформеров см. в подписи к рис. 2. Яичный лецитин — (+); сфингомиелин — (x)

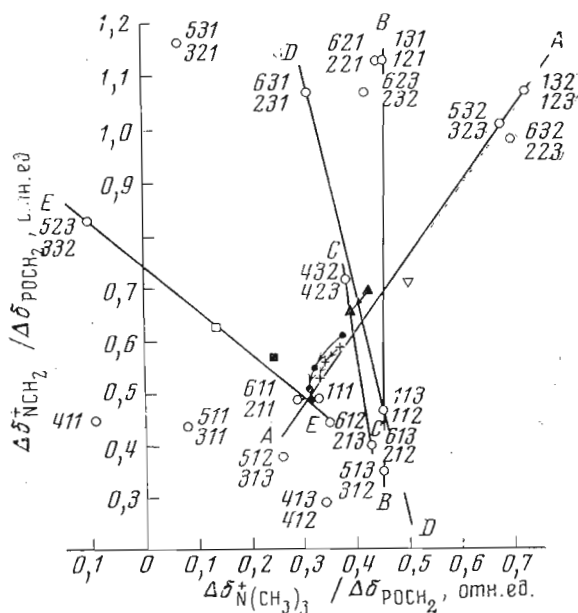


Рис. 4. Карта индуцированных сдвигов для ядер  $^1\text{H}$  фосфорилхолинового цвиттериона. Обозначения конформеров см. в подписи к рис. 2. + — яичный лецитин, ● — диолеиллецитин, ▲ — дипальмитоиллецитин, ■ — лизолецитин, □ — диацетат глицерофосфорилхолина, ▽ — стеарилфосфохолин. Стрелками помечены опыты с повышением температуры

групп отложены по оси абсцисс, а от  $N^+CH_2$ -групп — по оси ординат (сдвиг сигнала  $POCH_2$  принят за 1). Трехзначные обозначения конформеров цвиттерионов соответствуют обозначениям, приведенным на рис. 2, причем первая цифра обозначает ротамер при вращении вокруг связи  $O-P$ , вторая —  $C-O$  и третья —  $C-C$ . На построенные таким образом карты индуцированных сдвигов нанесены экспериментальные значения относительных сдвигов.

Поскольку общее число возможных конформеров фосфорилхолинового цвиттериона велико (54), задача нахождения вклада отдельных конформаций в величину экспериментально наблюдаемого индуцированного сдвига может не иметь определенного решения. Однако фактическое число конформаций может быть значительно меньше теоретически возможного, если учесть ряд ограничений, вытекающих из особенностей структуры цвиттериона.

Во-первых, подавляющее большинство конформеров обладают плоскостью симметрии и потому попарно эквивалентны (на рис. 3 и 4 точки, отвечающие таким конформерам, имеют двойные обозначения). Учитывая этот факт, а также исключив из рассмотрения стерически недопустимые конформеры, получаем 38 конформеров, что отвечает 20 расчетным точкам на картах индуцированных сдвигов (см. рис. 3 и 4).

Во-вторых, рассмотрение карт индуцированных сдвигов показывает, что расчетные точки определенным образом сгруппированы относительно точек эксперимента. Так, на рис. 3 и 4 выше точек эксперимента находятся расчетные точки, отвечающие только тем конформерам, в которых атомы азота и кислорода холиновой цепи находятся в *gosh*-положении (в трехзначных обозначениях этих конформеров вторая цифра обязательно 2 или 3, например  $432 \equiv 423$ ,  $621 \equiv 221$  и т. д.). Ниже экспериментальных точек находятся расчетные точки, отвечающие конформерам с трансoidalной ориентацией азота и кислорода (в их обозначениях вторая цифра 1, например  $611 \equiv 211$ ,  $513 \equiv 312$  и т. д.). На основании этого можно сделать вывод, что величина наблюдаемого индуцированного сдвига должна определяться комбинацией этих двух групп конформеров (по 10 расчетных точек в каждой группе).

Наконец, поскольку вращение фосфорилхолиновой группировки на поверхности липидного бислоя не является свободным, не все из рассматриваемых *транс*- и *gosh*-форм могут реализоваться с одинаковой вероятностью. В предельном случае преобладающим может быть вклад двух пар *gosh*- и *транс*-конформеров. Для отбора таких комбинаций конформеров нами было применено следующее правило: прямая линия, соединяющая расчетные точки на картах индуцированных сдвигов, должна проходить также через точку эксперимента.

В соответствии с этим правилом и с учетом погрешностей определения относительных сдвигов ( $\pm 0,02$  для  $^{13}C$  и  $\pm 0,03$  для  $^1H$ ) на карте  $^{13}C$  (рис. 3) можно выделить четыре прямые (A-A, B-B, C-C и D-D), проходящие через точку эксперимента (яичный лецитин) и расчетные точки, отвечающие различным комбинациям *gosh*- и *транс*-форм. Три из этих прямых (B-B, C-C и D-D) соединяют только по две расчетные точки, отвечающие следующим парным комбинациям конформеров: B-B —  $131 \equiv 121$  и  $513 \equiv 312$ ; C-C —  $432 \equiv 423$  и  $613 \equiv 212$ ; D-D —  $631 \equiv 231$  и  $113 \equiv 112$ , тогда как прямая A-A проходит через большее количество точек, отвечающих группе *gosh*-конформеров ( $632 \equiv 223$ ,  $132 \equiv 123$ ,  $532 \equiv 323$ ) и группе *транс*-конформеров ( $611 \equiv 212$  и 111). Однако на карте  $^1H$  (рис. 4) только прямая A-A проходит через точку эксперимента для яичного лецитина и расчетные точки, отвечающие идентичному набору конформеров (за исключением конформеров  $632 \equiv 223$ ). Все остальные прямые лежат в стороне от экспериментально найденного отношения индуцированных сдвигов.

На карту  $^1H$  нанесены также экспериментальные значения, полученные для других фосфохолиновых производных: лизолецитина, дицетата

глицерофосфорилхолина, дипальмитоиллецитина, диолеоиллецитина и стеарилфосфохолина. Обращает на себя внимание тот факт, что, за исключением точек для лизолецитина и диацетата глицерофосфорилхолина, все остальные точки группируются вблизи прямой А-А. Поэтому можно предположить, что в случае дипальмитоиллецитина, диолеоиллецитина и стеарилфосфохолина конформеры  $132 \equiv 123$ ,  $532 \equiv 323$ ,  $111$  и  $611 \equiv 211$ , лежащие на прямой А-А, являются преобладающими. Если это предположение справедливо, то рассмотрение соотношений между этими конформерами приводит к ряду интересных выводов.

Так, в соответствии со сказанным выше эту группу из семи конформеров можно разделить на две подгруппы: *гош*-конформеров ( $132 \equiv 123$  и  $323 \equiv 532$ ) и *транс*-конформеров ( $611 \equiv 211$  и  $111$ ). Внутри каждой из подгрупп невозможно сделать выбор в пользу того или другого конформера. Однако в самом отборе этих конформеров из большого количества различных *транс*- и *гош*-форм прослеживаются определенные закономерности. Так, в подгруппе *транс*-форм взаимопревращения конформеров  $111$ ,  $611$  и  $211$  могут осуществляться путем торсионных колебаний вокруг связи Р—О, причем угол отклонения фосфатной группы от положения  $111$  не превышает  $60^\circ$ . Это может указывать на существенные ограничения свободы вращения фосфорилхолиновой цепи вокруг связи Р—О (холин), когда эта группировка находится в максимально растянутой конформации. По-видимому, эти ограничения снимаются, если цвиттерион имеет *гош*-конформацию. Для подгруппы *гош*-форм ( $132$ ,  $123$ ,  $532$  и  $323$ ) имеет место одинаковый тип ориентации заместителей вокруг связи Р—О (один из атомов кислорода фосфатной группы находится в заслоненном положении по отношению к метиленовой группе, связанной с атомом кислорода холинового остатка) и переход цвиттериона из одной *гош*-конформации в другую может происходить путем последовательного поворота вокруг связи Р—О на угол  $120^\circ$ .

Общий вклад *гош*- и *транс*-форм в величину экспериментально наблюдаемого индуцированного сдвига можно оценить по обратно пропорциональному отношению длин отрезков прямой А-А, соединяющих экспериментальную точку с центрами расчетных точек этих двух групп конформеров. Полученные значения вклада *транс*-форм для различных типов лецитинов, а также для сфингомиелина приведены в табл. 4. Хотя точность расчета не следует переоценивать, несомненно, что основной вклад в конформацию цвиттериона всех изученных нами холинфосфатидов вносят *транс*-формы, причем вес последних возрастает со степенью ненасыщенности углеводородных цепей.

Экспериментальные точки для лизолецитина и диацетата глицерофосфорилхолина лежат на стороне от прямой А-А. Если предположить, что для этих соединений реализуются те же *транс*-формы ( $111$  и  $611 \equiv 211$ ), что и для яичного лецитина, то в качестве *гош*-форм выступают уже другие конформации ( $523 \equiv 332$ ), локализующиеся вблизи прямой Е-Е (рис. 4). Относительные вклады этих форм в конформацию фосфорилхолиновой цепи существенно различаются: для лизолецитина *транс/гош*-отношение составляет  $81 : 19$ , тогда как для диацетата глицерофосфорилхолина доля *гош*-формы значительно возрастает (*транс/гош*- $58 : 42$ ).

Аналогичным образом можно оценить влияние температуры на конформацию фосфорилхолинового цвиттериона. Как видно из табл. 2, при увеличении температуры для дипальмитоиллецитина и яичного лецитина наблюдается уменьшение величин отношений (1) для сигналов  $N^+CH_2$  и  $N^+Me_3$ . Экспериментальные точки, полученные для указанных липидов при разных температурах, были нанесены на карту  $^1H$  (рис. 4). С увеличением температуры эти точки сдвигались вдоль направления А-А в область *транс*-конформеров  $111$ ,  $211$  и  $611$ , что указывает на возрастание их вклада в конформацию фосфорилхолиновой цепи (табл. 5).

Полученные выводы были подтверждены анализом констант спин-

Таблица 4

Относительные вклады *транс*-форм (111, 211, 611) и *госи*-форм (132, 123, 323, 532) в конформацию фосфорилхолиновой группы на поверхности бислойных везикулярных мембран, приготовленных из диолеоиллецитина, яичного лецитина, дипальмитоиллецитина и сфингомиелина; температура опыта 30°

Липид	<i>транс</i> : <i>госи</i>
Диолеоиллецитин	83 : 17
Яичный лецитин	76 : 24
Дипальмитоиллецитин	65 : 35
Сфингомиелин	69 : 31

Таблица 5

Зависимость от температуры вкладов *транс*- и *госи*-форм в конформацию фосфорилхолиновой группы для бислойных везикулярных мембран, приготовленных из яичного лецитина и диолеоиллецитина

Температура, °С	Яичный лецитин, <i>транс</i> : <i>госи</i>	Диолеоиллецитин, <i>транс</i> : <i>госи</i>
30	76 : 24	83 : 17
35	80 : 20	—
50	92 : 8	89 : 11
65	98 : 2	—
80	—	94 : 6
85	99 : 1	—

спинового взаимодействия. По данным спектров  $^{13}\text{C}$ -ЯМР, в отсутствие парамагнитных ионов вицинальные константы спин-спинового взаимодействия  $^3J_{\text{госи-госи}}$  составляют 7,4 ( $\pm 0,3$ ) Гц для яичного лецитина и 7,3 ( $\pm 0,3$ ) Гц для сфингомиелина. Если принять значения  $^3J_{\text{транс}}$  10 Гц и  $^3J_{\text{госи}}$  1 Гц, как предложено в работе [19], то вклад *транс*-форм для этих липидов составит  $\sim 70\%$ . Это значение, полученное из спектров ЯМР, снятых при отсутствии парамагнитных катионов, близко к значениям, найденным методом парамагнитного зонда (табл. 4).

В соответствии с уравнением (2) то обстоятельство, что сигналы от ядер фосфорилхолинового остатка и от группы  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}$  жирнокислотных цепей имеют противоположно направленные индуцированные сдвиги (табл. 1), свидетельствует о расположении фосфорилхолиновой цепи и жирнокислотных остатков в разных областях пространственных углов  $\theta$ . Анализ молекулярных моделей показывает, что это возможно, если фосфорилхолиновый остаток и жирнокислотные цепи ориентированы перпендикулярно друг другу (рис. 5, А). При переходе фосфорилхолиновой группировки от перпендикулярной ориентации к параллельной жирнокислотные остатки попадают в ту же область пространственных углов  $\theta$ , что и фосфорилхолиновая цепь (рис. 5, В). Согласно уравнению (2), это означает, что в случае параллельной ориентации этих группировок индуцированные сдвиги сигналов от группы  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}$  и сигналов от фосфорилхолиновой цепи должны иметь одинаковый знак. В действительности же, как было отмечено выше, индуцированные сдвиги направлены противоположно.

Таким образом, на основании анализа направления сдвигов, индуцируемых парамагнитными ионами в спектрах ЯМР, можно сделать вывод, что в бислойных везикулярных мембранах фосфорилхолиновые цепи ориентированы перпендикулярно жирнокислотным остаткам. А поскольку



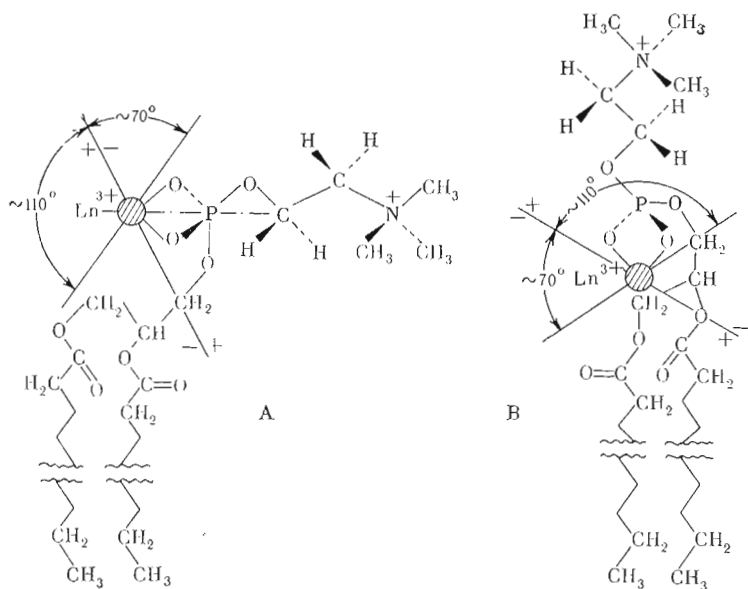


Рис. 5. Схема пространственного расположения фосфорилхолиновой группировки и жирнокислотных цепей относительно парамагнитного катиона ( $\text{Ln}^{3+}$ )

ку последние ориентированы в целом под прямым углом к поверхности липидного бислоя, этот вывод можно одновременно рассматривать и как заключение о том, что фосфорилхолиновые цепи ориентированы параллельно поверхности бислоя.

Проведенный в настоящей работе анализ соотношений индуцированных сдвигов для ряда холинфосфатидов показал, что основной вклад в конформацию их фосфорилхолиновых цепей вносят конформеры с трансoidalным расположением фосфатной и триметиламмониевой групп. В то же время в случае глицерофосфорилхолина сильно увеличивается вклад *gosh*-конформеров цвиттерионной группировки. Это согласуется с данными, полученными ранее при изучении спектров ЯМР водных растворов глицерофосфорилхолина и фосфохолина [5, 6]. Возможно, что по причинам, обсуждаемым ниже, *транс*-форма цвиттерионной группировки существенно преобладает только при наличии бислойной мембранной структуры. Действительно, диацетат глицерофосфорилхолина, глицерофосфорилхолин и фосфохолин (в отличие от амфифильных холинфосфатидов) не способны образовывать в водном растворе упорядоченные ламеллярные агрегаты. С другой стороны, такие агрегаты, по-видимому, не образуются в растворах дипальмитоиллецитина в органических растворителях типа  $\text{CDCl}_3$  и  $\text{CD}_3\text{OD}$  и поэтому фосфорилхолиновый цвиттерион дипальмитоиллецитина в этих растворителях также существует преимущественно в *gosh*-конформации [6], которая, очевидно, стабилизируется электростатически взаимодействием между аммониевым азотом и кислородом фосфатной группы.

Что стабилизирует развернутую *транс*-конформацию фосфорилхолиновой группы на поверхности бислойных мембран? Можно назвать по крайней мере три возможных фактора: 1) эффекты сольватации; 2) влияние катионов; 3) межмолекулярное взаимодействие лецитиновых молекул в бислое. Наличие объемных сольватных оболочек вокруг заряженных групп цвиттериона может повысить энергетическую выгодность растянутой *транс*-конформации. Квантовомеханические расчеты показывают, что молекула фосфохолина при гидратации действительно значительно растягивается, так как связь  $\text{P}-\text{O}$  приобретает *транс*-конформацию [20].

Однако *gosh*-конформация связи С—С при этом сохраняется. Поэтому эффекты сольватации, по-видимому, не могут рассматриваться в качестве основного фактора, определяющего полностью развернутую конформацию фосфорилхолиновой группы. Этот вывод согласуется с литературными данными, согласно которым фосфохолин и глицерофосфохолин в водной среде существуют преимущественно в *gosh*-конформации [5, 6]. Следует, однако, заметить, что условия сольватации в растворе и на границе раздела мембрана/вода, где имеется слой структурированной воды, могут существенно различаться.

Связывание парамагнитных катионов фосфатной группировкой также должно стабилизировать развернутую *транс*-конформацию, так как положительно заряженная  $N^+Me_3$ -группа при этом максимально удаляется от места связывания катиона. Тем не менее проведенный в настоящей работе анализ вицинальных констант спин-спинового взаимодействия  $^3J_{\text{P-C}}$  показал, что *транс*-конформация цвиттериона преобладает и в отсутствие парамагнитных катионов. Кроме того, оказалось, что в диапазоне изученных концентраций  $Pt(NO_3)_2$  отношение индуцированных сдвигов для ядер  $^1H$  и  $^{13}C$  фосфорилхолинового остатка (а следовательно, и его конформация) не зависит от концентрации парамагнитного катиона. Очевидно, наиболее важным фактором, стабилизирующим развернутую *транс*-конформацию цвиттерионной группировки молекул лецитина и сфингомиелина в везикулярных мембранных системах, следует считать межмолекулярное взаимодействие, при котором возможно образование солевой связи между фосфатами и  $N^+(CH_3)_3$ -группами соседних молекул. Этим может объясняться специфика отбора по картам индуцированных сдвигов именно таких *транс*-форм, у которых вращение вокруг связи P—O существенно ограничено. В случае же *gosh*-конформаций, для которых вращение вокруг связи P—O становится более свободным, вклад межмолекулярных взаимодействий в стабилизацию, по-видимому, не столь значителен.

Результаты, полученные нами при определении соотношения конформеров цвиттериона в озвученных дисперсиях лецитинов различной степени насыщенности (дипальмитоиллецитин, яичный лецитин и диолеоиллецитин) (табл. 4) и при изучении зависимости этого соотношения от температуры (табл. 5), показывают, что по мере увеличения ненасыщенности углеводородных цепей и при возрастании температуры доля *транс*-форм увеличивается. Этот эффект несомненно связан с изменением жидкостного состояния лецитинов в бислое. Предположение о зависимости конформации полярной головки от степени ненасыщенности углеводородных цепей было недавно использовано для интерпретации результатов измерения электропроводности гидратированных фосфолипидов [21]. Как оказалось, электропроводность лецитинов [21], а также их способность связывать воду [22] возрастают по мере увеличения ненасыщенности их углеводородных цепей. Однако эти данные не давали информации о том, какие именно конформационные изменения полярной головки связаны с изменением степени насыщенности. Результаты настоящей работы позволяют ответить на этот вопрос.

Плотная упаковка углеводородных цепей ограничивает возможности существования тангенциальной развернутой *транс*-конформации полярной группы. Вероятно, именно по этой причине в многослойных липосомах из дипальмитоиллецитина полярные группы, судя по данным рентгеноструктурного анализа, ориентированы перпендикулярно плоскости бислоя [3]. В плоском бислое все части лецитиновой молекулы упакованы одинаковым образом, тогда как в бислоевых везикулярных мембранах, имеющих большую кривизну, углеводородные цепи упакованы менее регулярно, а полярные группы лецитиновых молекул, расположенных в наружной части бислоя, могут занимать значительно большую площадь, чем в многослойных липосомах [23]. Поэтому в бислоевых везикулярных

мембранах полярная группировка лецитиновой молекулы обладает значительной подвижностью и ее концевая триметиламмониевая группа может находиться довольно долго вблизи фосфатных групп соседних молекул.

### Экспериментальная часть

Личный лецитин, выделенный из желтков куриных яиц по методу Даусова [24], и сфингомиелин, извлеченный из мозга крупного рогатого скота [25], очищали колоночной хроматографией на окиси алюминия и силикагеле. Лизолецитин получали ферментативным расщеплением яичного лецитина фосфолипазой  $A_2$  змеиного яда (*Naja naja oxiana*) в условиях, описанных в работе [26]. 1,2-Дипальмитоил-*L*- $\alpha$ -лецитин синтезировали по методу [27]. Диацетат глицерофосфорилхолина получали ацетилированием [28] глицерофосфорилхолина, полученного из яичного лецитина по методу Брокерхофа [29]. Комплекс фосфат холина— $CaCl_2 \cdot 4H_2O$  (коммерческий препарат фирмы Fluka) использовали без дополнительной очистки.

Бислойные везикулярные мембраны готовили следующим образом: раствор липида в органическом растворителе выпаривали в вакууме досуха, после добавления  $D_2O$  образец встряхивали 30 мин и полученную грубую дисперсию обрабатывали 10 мин в атмосфере аргона ультразвуком на приборе УЗДН-1 при частоте 22 кГц ( $t < 5^\circ$ ). При этом мутная дисперсия становилась прозрачной со слабой опалесценцией. Перед съемкой спектра ЯМР липидную дисперсию центрифугировали 20 мин при 10 000g.

Спектры  $^1H$ -ЯМР получали на спектрометрах JEOL JNM-100 и Varian XL-100-15 при рабочей частоте 100 МГц. На первом спектрометре стабилизацию осуществляли по сигналу гексаметилдисилоксана, который использовался в качестве внешнего стандарта. На втором приборе стабилизацию проводили на ядрах  $^2H$  тяжелой воды. Образец помещали в ампулу диаметром 5 мм. Погрешность измерения химического сдвига  $\pm 0,002$  м.д.

Спектры  $^{13}C$ -ЯМР получали на спектрометрах Varian XL-100-15 и Varian SFT-20 при естественном содержании изотопа  $^{13}C$ , рабочей частоте 25, 16 и 20 МГц в режиме фурье-преобразования при шумовой развязке от ядер  $^1H$  (полоса развязки 2 кГц). Число проходов 20 000. Стабилизацию проводили на ядрах  $^2H$  тяжелой воды. Внешний стандарт — тетраметилсилан. Погрешность измерения химического сдвига  $\pm 0,026$  м.д. На первом спектрометре ширина импульса 55 мкс, время прослушивания отклика 0,8 с. Образец помещали в ампулу диаметром 12 мм. На втором спектрометре, обладающем более мощным импульсом, ширина импульса составляла 10 мкс, а время прослушивания отклика 1,023 с. Образец помещали в ампулу диаметром 8 мм.

Температуру в датчиках спектрометров поддерживали с точностью  $\pm 0,5^\circ$ .

Отнесения сигналов в спектрах  $^1H$ -ЯМР сделаны на основании данных, приведенных в работе [30]. Сигналы в спектрах  $^{13}C$ -ЯМР отнесены в соответствии с работой [7].

### ЛИТЕРАТУРА

1. Барсуков Л. И., Шапиро Ю. Е., Викторов А. В., Быстров В. Ф., Бергельсон Л. Д. (1973) Докл. АН СССР, 208, 717—720.
2. Phillips M. C. (1972) in Progress in Surface and Membrane Science, vol. 5, pp. 139—224, Acad. Press, Inc., N. Y.—London.
3. Wilkins M. H. F. (1972) Ann. N. Y. Acad. Sci., 195, 324—332.
4. Phillips M. C., Finer E. G., Hauser H. (1972) Biochim. et biophys. acta, 290, 397—402.
5. Henderson T. O., Glonek T., Myers T. C. (1974) Biochemistry, 13, 623—628.
6. Dufourcq J., Lussan C. (1972) FEBS Lett., 26, 35—38.
7. Birdsall N. J. M., Lee A. G., Feeney J., Levine A. G., Metcalfe J. C. (1972) J. Chem. Soc. Perkin II, 1441—1445.

8. Бергельсон Л. Д., Барсуков Л. И., Дубровина Н. И., Быстров В. Ф. (1970) Докл. АН СССР, 194, 708—710.
9. Bystrov V. F., Dubrovina N. I., Barsukov L. I., Bergelson L. D. (1974) Chem. Phys. Lipids, 6, 343—350.
10. Bystrov V. F., Shapiro Yu. E., Viktorov A. V., Barsukov L. I., Bergelson L. D. (1972) FEBS Lett., 25, 337—338.
11. Barsukov L. I., Shapiro Yu. E., Viktorov A. V., Volkova V. I., Bystrov V. F., Bergelson L. D. (1974) Biochem. and Biophys. Res. Commun., 60, 196—203.
12. Barsukov L. I., Shapiro Yu. E., Viktorov A. V., Volkova V. I., Bystrov V. F., Bergelson L. D. (1975) Chem. Phys. Lipids, 14, 211—226.
13. Shapiro Yu. E., Bystrov V. F., Viktorov A. V., Volkova V. I., Barsukov L. I., Bergelson L. D. (1975) Chem. Phys. Lipids, 14, 227—232.
14. Bleaney B. (1972) J. Magn. Reson., 8, 91—103.
15. Bleaney B., Dobson C. M., Levine B. A., Martin R. B., Williams R. J. P., Xavier A. V. (1972) Chem. Commun., 791—793.
16. Shapiro B. L., Hlubicek J. P., Sullivan G. R. (1971) J. Amer. Chem. Soc., 93, 3281—3288.
17. Briggs J., Hart F. A., Moss G. P. (1970) Chem. Commun., 1506—1507.
18. Briggs J., Hart F. A., Moss G. P. (1971) Chem. Commun., 364—365.
19. Mantsch H. H., Smith I. C. P. (1972) Biochem. and Biophys. Res. Commun., 46, 808—815.
20. Pullman B., Berthod H., Gresh N. (1975) FEBS Lett., 53, 199—204.
21. Jendrsiak G. L., Hasty J. H. (1974) Biochim. et biophys. acta, 348, 45—54.
22. Jendrsiak G. L., Hasty J. H. (1974) Biochim. et biophys. acta, 337, 79—86.
23. Chan S. I., Sheetz M. P., Seiter C. H. A., Feigenson G. W., Hsu Ming-chu, Lau A. (1974) Ann. N. Y. Acad. Sci., 231, 499—522.
24. Dawson R. M. (1963) Biochem. J., 88, 414—423.
25. Ansell G. B. (1964) in Phospholipids, p. 101, Amsterdam — London — N. Y.
26. Moore J. H., Williams D. L. (1964) Biochim. et biophys. acta, 84, 41—54.
27. Gordon D. T., Jensen R. G. (1972) Lipids, 7, 261—268.
28. Kögl F., de Haas G. H., van Deenen L. L. M. (1960) Rec., 79, 661—669.
29. Brookerhoff H., Yurkowski M. (1965) Can. J. Biochem., 43, 1777—1785.
30. Finer E. G., Flook A. G., Hauser H. (1972) Biochim. et biophys. acta, 260, 49—53.

Поступила в редакцию  
26.XII.1975

После переработки  
10.V.1976

## THE CONFORMATION OF PHOSPHORYLCHOLINE GROUPS IN PHOSPHOLIPID MEMBRANES

BARSUKOV L. I., SHAPIRO Yu. E., VIKTOROV A. V.,  
VOLKOVA V. I., BYSTROV V. F., BERGELSON L. D.

*M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, Academy  
of Sciences of the USSR, Moscow*

The conformation of the phosphorylcholine groups on the outer surface of sonicated phosphatidylcholine vesicles was studied by  $^1\text{H}$ - and  $^{13}\text{C}$ -NMR with the use of hydrophilic paramagnetic probes ( $\text{Pr}^{3+}$ ,  $\text{Eu}^{3+}$  and  $\text{Yb}^{3+}$ ). The ratio of trans- and gauche-forms was obtained by comparison of experimental values of the induced pseudocontact shifts with the theoretically calculated ones. It was shown that the major contribution was brought in by trans-forms, their relative weight being enhanced with the increase of fatty acyl unsaturation and with temperature raise. It was concluded that the phosphorylcholine groups are oriented parallel to the bilayer surface and that their conformation is independent of the presence of paramagnetic ions. The factors which stabilize an extended conformation of the phosphorylcholine group on the bilayer surface are discussed.