



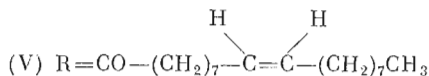
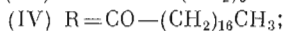
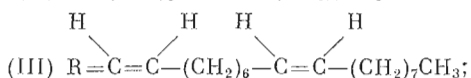
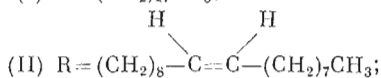
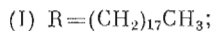
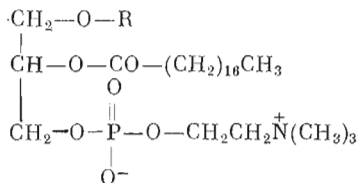
УДК 547.953.03+543.422.23

**ИЗУЧЕНИЕ С ПОМОЩЬЮ ^{31}P -ЯМР ФАЗОВЫХ ПЕРЕХОДОВ
В ОДНО- И ДВУХКОМПОНЕНТНЫХ ФОСФАТИДИЛХОЛИНОВЫХ
МЕМБРАНАХ***Чупин В. В., Василенко И. А., Серебrenникова Г. А.,
Евстигнева Р. П.**Московский институт тонкой химической технологии
им. М. В. Ломоносова*

Изучены фазовые переходы углеводородных цепей в мембране фосфатидилхолинов с простой и сложной эфирной связью с помощью ^{31}P -ЯМР. Показана возможность использования ^{31}P -ЯМР для исследования латерального фазового разделения в бинарных фосфатидилхолиновых мембранах.

Фосфолипидный состав биологических мембран отличается большим разнообразием. Это, по-видимому, связано с необходимостью создания соответствующего липидного микроокружения для мембранных белков [1]. На функционирование мембранных белков значительное влияние оказывает фазовое состояние мембраны [2–5]. При физиологических условиях фазовое состояние мембраны определяется температурой фазового перехода (Т.ф.п.) углеводородных цепей фосфолипидов, входящих в состав мембраны. При изучении биологических мембран и их моделей, в том числе фазовых превращений в мембранах, широко используется метод ^{31}P -ЯМР [6]. В данной работе нами были определены Т.ф.п. ряда фосфатидилхолинов с помощью ^{31}P -ЯМР, а также показана возможность использования ^{31}P -ЯМР для изучения латерального фазового разделения в двухкомпонентных фосфатидилхолиновых мембранах.

К настоящему времени в ряду фосфолипидов ацильного типа хорошо изучено влияние структуры молекулы фосфолипида на Т.ф.п. [1, 6]. Однако в биологических мембранах наряду с фосфолипидами ацильного типа обнаружены липиды с простой эфирной связью (алкильные и альдегидогенные) [7]. Поведение фосфолипидов алкильного и альдегидогенного типов в мембранах и их моделях до сих пор практически не исследовалось, поэтому представлялось целесообразным определить Т.ф.п. фосфатидилхолинов алкил-ацильного (I), (II), альдегидогенного (III) типов и сравнить с Т.ф.п. фосфатидилхолинов диацильного типа (IV), (V):



Как было показано нами ранее [8], Т.ф.п. фосфатидилхолинов природной конфигурации и рацематов практически одинаковы, поэтому в данной работе для определения Т.ф.п. использовались рацемические фосфатидилхолины (I)–(V).

Метод определения Т.ф.п. с помощью ³¹P-ЯМР основан на том, что при «плавлении» углеводородных цепей увеличивается подвижность фосфатных групп молекул фосфолипидов, что приводит к уменьшению ширины сигналов в спектрах ³¹P-ЯМР везикулярных дисперсий фосфолипидов [6]. На графике температурной зависимости ширины сигналов имеется ярко выраженный излом, соответствующий Т.ф.п.

Для определения Т.ф.п. фосфатидилхолинов (I)–(III) наряду с методом ³¹P-ЯМР нами использовалась дифференциальная сканирующая калориметрия (Т.ф.п. диацильных фосфатидилхолинов (IV), (V) калориметрически определялись ранее [9–11]). Т.ф.п. фосфолипидов (I)–(V), определенные с помощью ³¹P-ЯМР, несколько ниже Т.ф.п., измеренных калориметрически (таблица), что хорошо согласуется с литературными данными [6]. Как видно из таблицы, замена жирнокислотных остатков в положении 1 фосфатидилхолина на остаток спирта или альдегида той же длины и степени ненасыщенности понижает Т.ф.п.

Спектроскопия ³¹P-ЯМР была также использована нами для изучения латерального фазового разделения в бинарной фосфатидилхолиновой мембране. Латеральное разделение липидов в бислое оказывает значительное влияние на функционирование мембраны: транспорт веществ и ионов [12], кинетику ферментативных процессов [13], иммунные свойства модельных мембран [14]. Для изучения латерального разделения до настоящего времени в основном использовался ЭПР [14–16]. Необходимо отметить, что последний метод позволяет получить информацию о липидном микроокружении спицевого зонда, а сам зонд может оказывать возмущающие воздействия на микроокружение. Этот недостаток отсутствует в случае ЯМР-спектроскопии. Ранее была показана возможность использования

Температуры фазового перехода фосфатидилхолинов (I)–(VI)

Фосфатидилхолины	Т. ф. п., °С, определенная	
	³¹ P-ЯМР	калориметрически
1-О-Октадецил-2-стеароил- <i>гас</i> -глицерофосфохолин (I)	54	55
<i>цис</i> -1-О-(9-Октадецил)-2-стеароил- <i>гас</i> -глицерофосфохолин (II)	17	18
<i>цис,цис</i> -1-О-(1,9-Октадекадиенил)-2-стеароил- <i>гас</i> -глицерофосфохолин (III)	12	13
1,2-Дистеароил- <i>гас</i> -глицерофосфохолин (IV)	55	58 [9] 55 [10]
1-Олеоил-2-стеароил- <i>гас</i> -глицерофосфохолин (V)	20	22 [11]
1,2-Дистеароил- <i>гас</i> -глицеротионфосфохолин (VI)	—	56

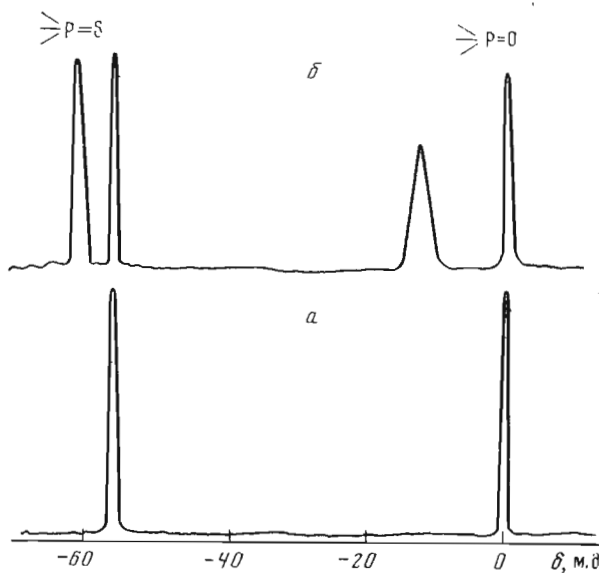
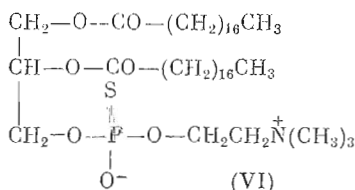


Рис. 1. Спектры ^{31}P -ЯМР озвученной водной дисперсии эквимольной смеси 1,2-дистеароил-*rac*-глицерофосфохолина (IV) и 1,2-дистеароил-*rac*-глицеротионфосфохолина (VI) (60°C): *a* — без сдвигового реагента; *б* — $0,01\text{ M Pr}(\text{NO}_3)_3$ во внешнем объеме

^{13}C -ЯМР для изучения фазового разделения в двухкомпонентной фосфатидилхолиновой везикулярной мембране [17]. Для того чтобы проследить за поведением фосфатидилхолинов, различающихся лишь строением гидрофобной части молекул, использовали фосфолипиды, избирательно обогащенные ядрами ^{13}C по N-метильной группе.

Нами предлагается новый подход к исследованию бинарных фосфатидилхолиновых мембран, основанный на ^{31}P -ЯМР. При этом используются везикулярные мембраны, в состав которых наряду с фосфатидилхолином входит его синтетический аналог — тионфосфатидилхолин (VI):



Химические сдвиги ядер ^{31}P тионфосфатидилхолина и фосфатидилхолина отличаются на $56,7$ м.д. ($-56,2$ и $0,5$ м.д. соответственно) [18], что позволяет дифференцировать их в везикулярной мембране с помощью ^{31}P -ЯМР.

Одним из главных требований к модифицированным фосфолипидам, предназначенным для изучения мембран и их моделей, является отсутствие возмущающих воздействий со стороны модифицированных липидов на мембрану. Нами было проведено сравнительное изучение поведения 1,2-дистеароил-*rac*-глицерофосфохолина (IV) и 1,2-дистеароил-*rac*-глицеротионфосфохолина (VI), имеющих одинаковое строение гидрофобных участков молекул. Определенная калориметрически Т.ф.п. тионфосфатидилхолина (VI) оказалась близка Т.ф.п. 1,2-дистеароил-*sn*-глицерофосфохолина [10, 11] (таблица). В спектре ^{31}P -ЯМР озвученной водной дисперсии эквимольной смеси фосфолипидов (IV), (VI) наблюдаются два сигнала, соответствующие тионфосфатидилхолину (VI) и фосфатидилхолину (IV) (рис. 1*a*). Добавление к везикулярной дисперсии сдвигового реагента ($0,01\text{ M Pr}(\text{NO}_3)_3$) приводит к дифференциации сигналов липидов, распо-

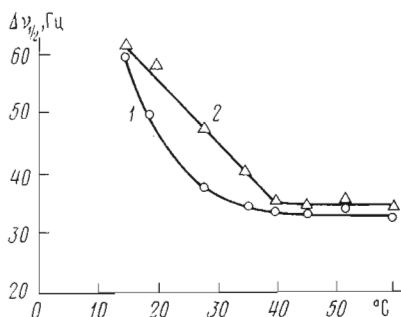


Рис. 2

Рис. 2. Температурная зависимость ширины сигналов в спектрах ^{31}P -ЯМР везикулярной мембраны, содержащей эквимольные количества фосфатидилхолинов (II), (VI). Ширина сигналов измерена на полувысоте: 1 – фосфатидилхолин (II), 2 – тиофосфатидилхолин (VI)

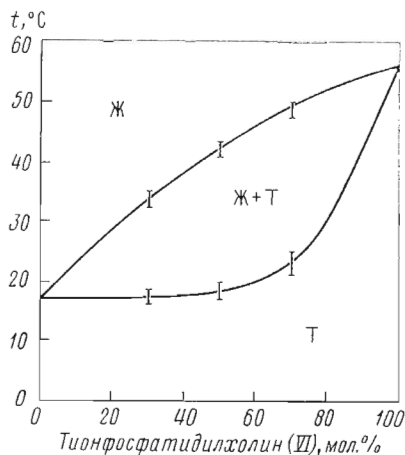


Рис. 3

Рис. 3. Фазовая диаграмма «температура – состав двухкомпонентной везикулярной мембраны фосфатидилхолинов (II), (VI)»

ложенных на наружной и внутренней поверхностях везикул [19] (рис. 1б). Отношение интегральных интенсивностей «наружного» и «внутреннего» сигналов фосфатидилхолина (IV) и тиофосфатидилхолина (VI) оказалось одинаковым, что свидетельствует о симметричном распределении фосфолипидов (IV), (VI) в везикулярной мембране. Этот факт указывает на то, что тиофосфатидилхолин не оказывает заметных возмущающих воздействий на везикулярную мембрану. Необходимо отметить, что индуцированный $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ сдвиг сигнала фосфатидилхолина (IV) в 3 раза больше индуцированного сдвига тиофосфатидилхолина (VI). По-видимому, это обусловлено тем, что с тиофосфатами многозарядные катионы образуют менее устойчивые комплексы, чем с фосфатами.

Тиофосфатидилхолин (VI) был использован нами для изучения латерального фазового разделения в бинарной фосфатидилхолиновой мембране, содержащей *цис*-1-0-(9-октадеценил)-2-стеароил-*гас*-глицерофосфохолин (II) и 1,2-дистеароил-*гас*-глицеротиофосфохолин (VI). Для построения фазовой диаграммы исследовались температурные зависимости ширины сигналов спектров ^{31}P -ЯМР везикулярных мембран, содержащих фосфолипиды (II), (VI) в различных соотношениях (см. рис. 2, 3). Возможность использования ЯМР для построения фазовых диаграмм бинарных мембран была теоретически обоснована ранее и подтверждена экспериментально в случае ^{13}C -ЯМР [17].

Мы показали, что при температуре $\sim 42^\circ\text{C}$ ширина сигнала тиофосфатидилхолина (VI) начинает быстро увеличиваться (рис. 2). Эта температура соответствует началу латерального фазового разделения в бислое, содержащем эквимольные количества фосфолипидов (II), (VI). При температурах ниже 42°C ширина сигналов тиофосфатидилхолина (VI) больше ширины сигналов фосфолипида (II), что свидетельствует о предпочтительной локализации насыщенного фосфолипида (VI) в твердой фазе. Ширина сигналов фосфатидилхолинов (II), (VI) становится практически одинаковой при температуре примерно 18°C , что соответствует окончанию латерального фазового разделения и переходу фосфолипидов (II), (VI) в твердую фазу. Аналогично начало и конец латерального разделения определялись в мембранах, содержащих фосфатидилхолины (II), (VI) в других соотношениях.

Из фазовой диаграммы «температура — состав бинарной фосфатидилхолиновой мембраны» (рис. 3) видно, что выше линии «ликвидуса» бинарная смесь независимо от мольного соотношения компонентов находится в жидкокристаллическом состоянии (Ж), ниже линии «солидуса» — в твердом (Т). Между этими линиями лежит область термодинамического сосуществования жидкокристаллической и твердой фаз (Ж+Т).

Таким образом, показаны возможности использования ^{31}P -ЯМР для изучения фазовых превращений как в одно-, так и в двухкомпонентных фосфатидилхолиновых мембранах. Определены Т.ф.п. ряда индивидуальных фосфатидилхолинов, исследовано латеральное фазовое разделение в мембране, содержащей ненасыщенный фосфатидилхолин алкильного типа (II) и насыщенный тиофосфатидилхолин ацильного типа (VI). Моделирование латерального фазового разделения липидов в мембране представляет особый интерес, так как, по мнению некоторых исследователей, любая нормально функционирующая бактериальная мембрана должна содержать липиды в жидкокристаллической и твердой фазах, т. е. областью функционирования бактериальной мембраны является интервал термодинамического сосуществования жидкокристаллической и твердой фаз в фосфолипидном бислое [1, 20]. До какой степени это положение справедливо в случае мембран клеток млекопитающих, пока еще не ясно.

Экспериментальная часть

Фосфатидилхолины — 1-О-октадецил-2-стеароил-*rac*-глицерофосфохолин (I), *cis*-1-О-(9-октадецил)-2-стеароил-*rac*-глицерофосфохолин (II), *cis*, *cis*-1-О-(1,9-октадекаденил)-2-стеароил-*rac*-глицерофосфохолин (III), 1, 2-дистеароил-*rac*-глицерофосфохолин (IV), 1-олеоил-2-стеароил-*rac*-глицерофосфохолин (V) и 1,2-дистеароил-*rac*-глицеротиофосфохолин (VI) — были синтезированы по ранее описанным методам [18, 20—23].

Везикулы получали озвучиванием 10% (вес.) раствора фосфатидилхолинов в тяжелой воде, содержащей 25 мМ трис-НСl (р^h 7,1), в атмосфере аргона с последующим центрифугированием при 10 000g.

Спектры ^{31}P -ЯМР снимали на импульсном фурье-спектрометре WP-60 (Bruker, ФРГ), рабочая частота 24,28 МГц.

Калориметрическое определение Т.ф.п. проводили на дифференциальном сканирующем калориметре DSC-910 (Du Pont, США).

Авторы выражают благодарность Э. Е. Нифантьеву и Д. А. Предводителю (МГПИ им. В. И. Ленина) за предоставленный тиофосфатидилхолин.

ЛИТЕРАТУРА

1. Lee A. G. (1977) *Biochim. et biophys. acta*, **472**, 237—281.
2. Lee A. G. (1975) *Prog. Biophys. Molec. Biol.*, **29**, 3—56.
3. Cronan J. E., Gelmann E. P. (1975) *Bact. Rev.*, **39**, 232—256.
4. Steir A., Sackmann E. (1973) *Biochim. et biophys. acta*, **311**, 400—408.
5. Lee A. G. (1976) *Nature*, **262**, 545—548.
6. de Kruijff B., Cullis P. R., Radda G. K. (1975) *Biochim. et biophys. acta*, **406**, 6—20.
7. Snyder F. (1972) *Ether lipids, chemistry and biology*. Acad. Press, New York — London.
8. Чупин В. В., Василенко И. А., Меркушкин Г. И., Серебренникова Г. А., Евстигнеева Р. П. (1979) *Биоорг. химия*, **5**, 1515—1519.
9. Ladbroke V. D., Chapman D. (1969) *Chem. Phys. Lipids*, **3**, 304—356.
10. Mabrey S., Sturtevant J. M. (1976) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **73**, 3862—3865.
11. de Kruijff B., Demel R. A., van Deenen L. L. M. (1972) *Biochim. et biophys. acta*, **255**, 331—347.
12. Linden C. D., Wright K. L., McConnell H. M., Fox C. F. (1973) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **70**, 2271—2275.
13. Op den Kamp J. A. F., Kauerz M. Th., van Deenen L. L. M. (1975) *Biochim. et biophys. acta*, **406**, 169—177.
14. Ruyschaert J. M., Tenenbaum A., Berliner C., Delmelle M. (1977) *FEBS Lett.*, **81**, 406—410.

15. Grant C. W. M., Wu S. H., McConnell H. M. (1974) *Biochim. et biophys. acta*, **363**, 151-158.
16. Humphries G. M. K., McConnell H. M. (1975) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **72**, 2483-2487.
17. Brulet P., McConnell H. M. (1976) *J. Amer. Chem. Soc.*, **98**, 1314-1318.
18. Нифантьев Э. Е., Предводителев Д. А., Аларкон Х. Х. (1977) *Бюл. изобр.* № 39. Авт. свид. 577211 от 25.06.1975; Нифантьев Э. Е., Предводителев Д. А., Аларкон Х. Х. (1978) *Бюл. изобр.* № 38, Авт. свид. 586643 от 16.04.1976.
19. Bystrov V. F., Shapiro Yu. E., Viktorov A. V., Barsukov L. I., Bergelson L. D. (1972) *FEBS Lett.*, **25**, 337-338.
20. Сропан J. Е., Gelmann E. P. (1975) *Vact. Rev.*, **39**, 232-256.
21. Василенко И. А., Серебренникова Г. А., Евстигнеева Р. П. (1976) *Биооргани. химия*, **2**, 75-77.
22. Розин А. Э., Гудкова С. Ф., Серебренникова Г. А., Евстигнеева Р. П. (1975) *Ж. орган. химии*, **11**, 2308-2311.
23. Чебышев А. В., Серебренникова Г. А., Евстигнеева Р. П. (1977) *Биооргани. химия*, **3**, 1362-1370.

Поступила в редакцию
29.X.1979

**³¹P NMR STUDY ON PHASE TRANSITIONS
IN ONE AND TWO-COMPONENT PHOSPHATIDYLCHOLINE MEMBRANES**

CHUPIN V. V., VASILENKO I. A., SEREBRENNIKOVA G. A.,
EVSTIGNEEVA R. P.

M. V. Lomonosov Institute of Fine Chemical Technology, Moscow

In membranes composed of phosphatidylcholines having ester and ether linkages the phase transitions of hydrocarbon chains were monitored by ³¹P NMR spectroscopy. A potency of this technique for studying the lateral phase separation in binary phosphatidylcholine membranes was demonstrated.