



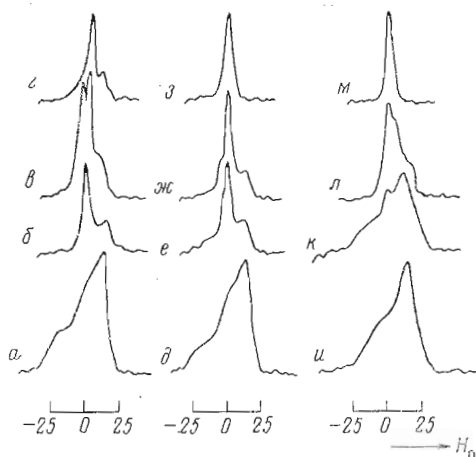
УДК 547.915.5.07:577.352.27:577.152.314

ВЛИЯНИЕ МЕТАБОЛИТОВ ФОСФОЛИПИДОВ НА СТРУКТУРУ
МОДЕЛЬНЫХ МЕМБРАН*Сорокоулова Г. М., Василенко И. А., Швец В. И.**Московский институт тонкой химической технологии им. М. В. Ломоносова**Селищева А. А.**Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова,
биологический факультет**Боровягин В. Л.**Институт биофизики Академии наук СССР, Пущино, Московской области*

Методом спектроскопии ^{31}P -ЯМР и электронной микроскопии (замораживание – скальвание) изучено влияние 1,2-диацилглицеринов (1,2-дипальмитоил-*rac*-глицерина, 1-пальмитоил-2-олеоил-*rac*-глицерина, 1,2-диолеоил-*rac*-глицерина, а также природных 1,2-диацил-*sn*-глицеринов) на структуру модельных мембран, состоящих из фосфатидилхолина и смесей фосфатидилхолин – фосфатидилэтаноламин и фосфатидилхолин – фосфатидилинозит. Показано, что с 1,2-диацилглицеринами связано возникновение сильно изогнутых участков в бислойных липидных мембранах, которые образуют складки и внутримембранные частицы и вызывают появление изотропных сигналов в спектрах ^{31}P -ЯМР.

Исследования организации фосфолипидов в модельных мембранах, проведенные методами электронной микроскопии, спектроскопии ^{31}P -ЯМР и ^2H -ЯМР в течение последних лет показали, что в модельных мембранах, содержащих смесь фосфолипидов, существуют участки с небислойной упаковкой фосфолипидов, в которых либо молекулы движутся изотропно (изотропная фаза), либо осуществляется гексагональная организация липидов (гексагональная фаза). Последняя может быть представлена так называемым гексагональным комплексом (бимолекулярный слой липидов, имеющий трубчатую гексагональную упаковку) и обращенной гексагональной упаковкой липидов – H_{II} -фазой [1]. Организация различных фосфолипидов в мембране, а следовательно, и характер их спектров ЯМР могут быть обусловлены многими факторами, например добавлением ионов Ca^{2+} [1–4], изменениями pH, температуры [4–6], изменением состава жирных кислот одного и того же фосфолипида [6, 7], а также стимуляцией перекисного окисления липидов [4]. Влияние этих факторов подробно изучено для ряда смесей фосфолипидов. Однако практически отсутствуют данные о влиянии метаболитов фосфолипидов, образующихся под действием фосфолипаз C, на структуру мембран. В настоящее время возник интерес к свойствам и функциям одного из продуктов реакции фосфолипазы C с фосфолипидами, а именно 1,2-диацилглицеринов. Этот интерес обусловлен тем, что, согласно последним данным [8–12], 1,2-диацилглицерины могут рассматриваться как возможные сигнальные вещества наряду с циклическими нуклеотидами и ионами Ca^{2+} . Для ряда животных и растительных тканей показано, что 1,2-диацилглицерины необходимы для функционирования Ca^{2+} -зависимой протеинкиназы, активируемой фосфолипидами [11]. Содержание 1,2-диацилглицеринов в мембранах невелико [12], но их концентрация, по-видимому, должна возрасть при активации реакции, называемой фосфатидилинозитным ответом клетки, характерной для широкого ряда возбудимых тканей. Суть этого явления заключается в том, что при активации некоторых (адренергических и мускариновых) рецепторов клеточной поверхности наблюдается увеличение скорости циклического распада и синтеза фосфоинозитидов, на одной из стадий которого

Рис. 1. Спектры ^{31}P -ЯМР (38–40° С) дисперсии фосфатидилхолина в смеси с 1,2-дипальмитоил-*гас*-глицерином в соотношении (моль/моль) 9:1 (а), 8:2 (б), 7:3 (в), 1:1 (г), в смеси с 1,2-диолеоил-*гас*-глицерином в соотношении 9:1 (д), 8:2 (е), 7:3 (ж), 1:1 (з), в смеси с 1-пальмитоил-2-олеоил-*гас*-глицерином в соотношении 9:1 (и), 8:2 (к), 7:3 (л), 1:1 (м)



образуются 1,2-диацилглицерины. Увеличение концентрации 1,2-диацилглицеринов в мембране может сопровождаться значительными локальными перестройками в ее структуре, как это следует из данных Охки с соавт. [13]. Эти авторы методом ЭПР-спектроскопии установили, что 1,2-диацилглицерины увеличивают степень разделения фаз в системе фосфатидилхолин — фосфатидилсерин в присутствии ионов Ca^{2+} .

В настоящей работе методом ^{31}P -ЯМР и электронной микроскопии (замораживание — скальвание) изучено действие синтетических (1,2-дипальмитоил-*гас*-глицерин, 1-пальмитоил-2-олеоил-*гас*-глицерин, 1,2-диолеоил-*гас*-глицерин) и природных 1,2-диацил-*sn*-глицеринов на структуру модельных мембран, состоящих из фосфатидилхолина и смесей фосфатидилхолин — фосфатидилэтаноламин и фосфатидилхолин — фосфатидилинозит. Природные 1,2-диацил-*sn*-глицерины получали обработкой фосфатидилхолина и фосфатидилинозита различными по специфичности фосфолипазами С.

Метод ^{31}P -ЯМР, используемый для изучения полиморфизма фосфолипидов, позволяет получить информацию о структуре фосфолипидных агрегатов в воде, не оказывая при этом возмущающих воздействий на объекты исследования [7]. Известно, [4, 6, 7], что водная дисперсия яичного фосфатидилхолина представляет собой ламеллярную структуру, основой которой является бимолекулярный липидный слой, чему соответствует сигнал ^{31}P -ЯМР с анизотропией химического сдвига около -50 м.д., максимумом в более сильном поле и плечом, направленным в слабое поле (рис. 1а, в обзоре [6]).

В данной работе показано, что при введении 1,2-диацилглицеринов в фосфатидилхолиновые липосомы в спектре ^{31}P -ЯМР появляется узкий сигнал, сдвинутый в слабое поле относительно максимума анизотропного сигнала, соответствующего ламеллярной упаковке фосфолипидов (рис. 1б, в, е, ж, к, л). Кроме того, в случае введения в фосфолипидную дисперсию 30% мольных 1,2-диацил-*гас*-глицеринов (рис. 1в, л) виден сигнал, у которого пик находится в более слабом поле по отношению к изотропному сигналу и плечо направлено в сильное поле. Этот сигнал, вероятно, соответствует гексагональной организации липидов. При увеличении количества 1,2-диацилглицеринов в смеси фосфатидилхолин — диацилглицерин до 50% (мольных) вид спектра сильно изменяется: от спектра, соответствующего бислоистой упаковке фосфолипидов в мембране, он переходит к спектру в виде узкого симметричного сигнала (рис. 1г, з, м). Такой сигнал в спектрах ^{31}P -ЯМР дают молекулы фосфолипидов, обладающие способностью к изотропному движению, характерному для небольших фосфолипидных везикул или для участков бислоя с сильно искривленной поверхностью [3, 6].

Электронно-микроскопическое изучение реплик таких суспензий показало, что 1,2-диацилглицерины не вызывают образования фракции мелких мембранных везикул, как в случаях действия ионов Ca^{2+} , перекисного окисления липидов и температуры [4], а вызывают появление характерных

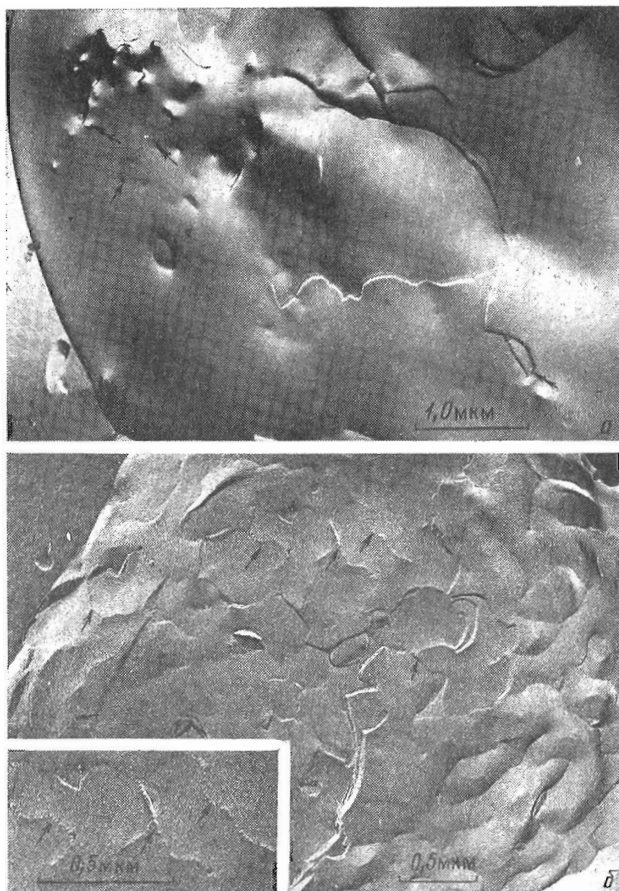


Рис. 2. Платино-углеродная реплика суспензии фосфатидилхолина с 30% 1,2-дипальмитоил-*гас*-глицерина: *a* — замораживание от 20° С; видны складки (двойная стрелка) и внутримембранные частицы (одиночная стрелка) в крупных мультислойных липосомах; *б* — суспензия прогрета до 55° С и заморожена от 20° С; видны внутримембранные частицы с характерным узором распределения (стрелка)

складок и внутримембранных частиц со случайным распределением на гидрофобных поверхностях (рис. 2*a*). В случае прогрева тех же суспензий до 55° С образуются внутримембранные частицы с определенным узором распределения (рис. 2*б*, вставка). Аналогичные результаты были получены при введении 1,2-диацилглицеринов в системы фосфатидилхолин — фосфатидилэтаноламин и фосфатидилхолин — фосфатидилинозит.

В экспериментах без дополнительного прогрева суспензий появление изотропного сигнала в спектрах ^{31}P -ЯМР, несомненно, обусловлено образованием складок и внутримембранных частиц, представляющих собой участки мембраны с измененной геометрией бимолекулярного слоя липидов.

Известно, что биологические мембраны являются многокомпонентными системами, состоящими из различных липидов и белков. Основную часть мембранных липидов составляют, как правило, фосфолипиды. Ранее было показано, что в мембране наряду с фосфолипидами, образующими бислои, присутствуют и фосфолипиды, не склонные образовывать бислои, например фосфатидилэтаноламины [14]. В предлагаемой работе было изучено влияние 1,2-диацилглицеринов на смесь фосфатидилхолина и фосфатидилэтаноламина (молярное соотношение 1:2). Форма и параметры спектра этой смеси соответствуют спектрам ^{31}P -ЯМР фосфолипидов, имеющих гексагональную структуру. Присутствие фосфатидилхолина в гидратированной липидной системе, содержащей фосфатидилэтаноламин, оказывает стабилизирующее действие на бислои, но в спектре ^{31}P -ЯМР еще сохраняется узкий сигнал, присущий изотропной фазе. При добавлении к смеси 1,2-диацилглицеринов (30% молярных) форма спектра изменяется

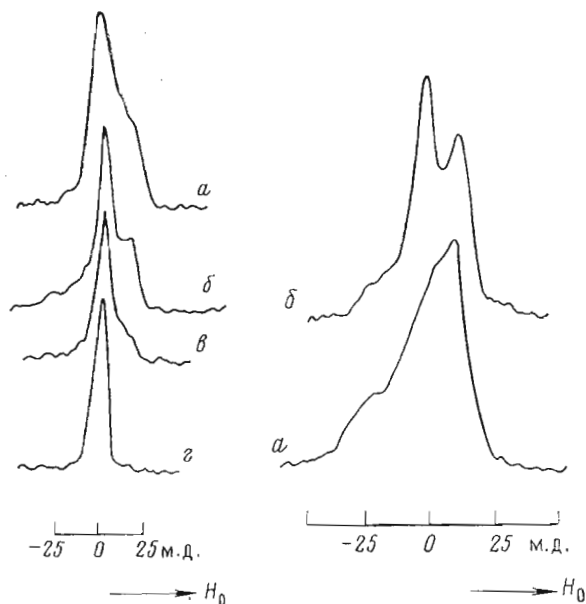


Рис. 3

Рис. 4

Рис. 3. Спектры ^{31}P -ЯМР фосфолипидных дисперсий, содержащих фосфатидилэтаноламин (а), фосфатидилэтаноламин в смеси с фосфатидилхолином (1:2 моль/моль) (б), ту же смесь в присутствии 0,3 моль/моль 1,2-диолеоил-*rac*-глицерина (в) и 1,2-дипальмитоил-*rac*-глицерина (г)

Рис. 4. Спектры ^{31}P -ЯМР фосфолипидных мембран, содержащих смесь фосфатидилинозита и фосфатидилхолина (3:7 моль/моль) (а), и той же смеси после обработки фосфолипазой С (б)

(рис. 3): он превращается в узкий симметричный сигнал, т. е. количество липидов,двигающихся более изотропно, чем в бислое, возрастает. Это позволяет сделать вывод, что фосфатидилэтаноламин, по-видимому, усиливает дестабилизирующее действие 1,2-диацилглицеринов на мембрану.

В работах [12, 13, 15, 16] найдено, что 1,2-диацилглицерины являются метаболитами фосфатидилипозитов и образуются в результате действия специфической фосфолипазы С на фосфатидилинозит. В настоящей работе при исследовании влияния 1,2-диацилглицеринов на структуру модельных фосфолипидных мембран использовались синтетические 1,2-диацилглицерины. Для синтеза их нами был использован метод, основанный на применении трифенилсильбильной защитной группы [17]. 1,2-Диацилглицерины вводили в фосфолипидные мембраны, либо добавляя их к раствору фосфолипидов в хлороформе с последующим упариванием растворителя и диспергированием липидов в воде, либо обрабатывая модельные мембраны, состоящие из фосфатидилхолина или смеси фосфатидилхолин — фосфатидилинозит (30% мольных фосфатидилинозита), различными по специфичности фосфолипазами С, что моделировало появление диацилглицеринов в биологических мембранах. Специфическая к фосфатидилинозиту фосфолипаза С расщепляла его, по данным ТСХ, почти полностью, т. е. полученная смесь липидов содержала около 30% диацилглицеринов, а для неспецифической фосфолипазы С были подобраны с помощью ТСХ такие условия, при которых образовывалось около 30% мольных 1,2-диацил-*sn*-глицеринов. Жирнокислотный состав природных 1,2-диацил-*sn*-глицеринов соответствовал жирнокислотному составу исходных, обрабатываемых фосфолипазами С фосфолипидов (фосфатидилхолина и фосфатидилинозита) [18]. Полученную после ферментативного гидролиза смесь диглицеридов и нерасщепленных фосфолипидов экстрагировали хлороформом и из них готовили водную дисперсию липидов. Методом ^{31}P -ЯМР исследовали липидные дисперсии после обработки их ферментами. В спектре ^{31}P -ЯМР этих дисперсий появляется узкий сигнал, свидетельствующий об изотропном движении фосфолипидных молекул (рис. 4б).

В результате выполненных исследований показано, что 1,2-диацилглицерины вызывают появление сильно изогнутых участков в бислоиных липидных мембранах, которые образуют складки и внутримембранные частицы, но эти результаты не следует непосредственно относить к биологическим мембранам, так как содержание 1,2-диацилглицеринов в клеточных мембранах очень мало. Однако можно предположить, что малые локальные изменения содержания диацилглицеринов могут иметь место и в биологических мембранах, например при гидролизе фосфатидил-инозита.

Экспериментальная часть

Использованы хроматографически чистые липиды: фосфатидилхолин и фосфатидилэтаноламин, выделенные из яичных желтков [19, 20], фосфатидилинозит из пекарских дрожжей, полученный по методу [21].

При ферментативном гидролизе фосфолипидов использовали неспецифическую фосфолипазу С (КФ 3.1.4.3, Boehringer, ФРГ) в виде суспензии в 3,2 М сульфате аммония (рН 6,0) и специфическую к фосфатидилинозиту фосфолипазу С (КФ 3.1.4.2), выделенную по методу [22].

ТСХ проводили на силуфоле UV-254 в системе эфир — гексан (1 : 1) (А) и на силикагеле L5/40 (Chemapol, ЧССР), импрегнированном оксалатом калия, в системе хлороформ — метанол — 4 н. NH_4OH (9 : 7 : 2) (Б).

Спектры ^{31}P -ЯМР были получены на импульсном фурье-спектрофотометре Bruker WP-60 (ФРГ) с рабочей частотой 60 и 24,28 МГц соответственно.

Для электронно-микроскопического исследования образцы замораживали в жидком пропане при -190°C , переносили их в жидкий азот, скалывали и напыляли при -160°C в вакууме около 10^{-5} Па в усовершенствованной напылительной установке JEE-4B (Jeol, Япония). Платиновые реплики отмывали смесью азотной и хромовой кислот, промывали в дистиллированной воде и просматривали в электронных микроскопах JEM-100B и JEM-17A (Jeol, Япония) при увеличениях от 7 000 до 25 000.

При исследовании полиморфных превращений фосфолипидов с помощью ^{31}P -ЯМР неозвученные водные дисперсии получали механическим диспергированием 150—200 мг фосфолипида в 2 мл D_2O .

1,2-Диацил-*rac*-глицерины вводили в фосфолипидные липосомы следующим образом: раствор 120—150 мг фосфолипида и соответствующего количества 1,2-диацилглицерина упаривали, добавляли 2 мл D_2O и механически встряхивали.

Для проведения ферментативного гидролиза фосфолипидную дисперсию в 50 мМ буферном растворе трис-малеат, содержащем 80 мМ KCl и 0,5 мМ CaCl_2 (рН 6,8), инкубировали с различными по специфичности фосфолипазами С в течение 15 мин при 37°C и перемешивании, образовавшуюся при расщеплении смесь диглицеридов и нерасщепленных фосфолипидов выделяли центрифугированием (16 000 г, 20 мин) или экстракцией хлороформом, при которой фосфаты инозита или холина находились в водной фазе. Образование 1,2-диацил-*sn*-глицеринов обнаруживали с помощью ТСХ в системе А.

1,2-Дипальмитоил-*rac*-глицерин. К раствору 4,0 г 1-О-пальмитоил-*rac*-глицерина (т. пл. $77-79^\circ\text{C}$, R_f 0,15 (А)) [23] в 60 мл безводного CCl_4 и 20 мл безводного пиридина прибавляли при перемешивании (30 мин, 20°C) 3,5 г трифенилхлорсилана, перемешивали 1 ч при 20°C . Образование промежуточного 1-О-пальмитоил-3-О-трифенилсилил-*rac*-глицерина контролировали с помощью ТСХ; R_f 0,64 (А). К реакционной смеси прибавляли 6,0 г хлорагидрида пальмитиновой кислоты (15 мин, 20°C), перемешивали 1 ч при 50°C . Образование 1,2-дипальмитоил-3-О-трифенилсилил-*rac*-глицерина контролировали с помощью ТСХ; R_f 0,85 (А). Реакционную массу фильтровали через 30 г Al_2O_3 (II степени активности). Осадок и слой сорбента промывали 500 мл CCl_4 . Фильтрат упаривали, добавляли 80 мл ацетона, 3 мл воды, 3 мл пиридина, 3,0 г кислого фтористого аммония. Смесь кипятили 30—40 мин до полного снятия трифенил-

силильной защитной группы. Реакционную массу обрабатывали 300 мл воды и 600 мл эфира, эфирный слой отделяли, сушили, упаривали, остаток хроматографировали на колонке с 100 г силикагеля. Вещество элюировали смесью петролейный эфир – эфир, 3:1. Выход 5,2 г (72,8%), R_f 0,65 (A), т. пл. 63–64° С.

1-О-Пальмитоил-2-О-олеоил-гас-глицерин и 1,2-диолеоил-гас-глицерин были получены аналогично. Строение полученных диглицеридов было подтверждено данными ИК- и ПМР-спектров.

ЛИТЕРАТУРА

1. Borovjagin V. L., Vergard J., McIntosh Th. J. J. Membrane biology, 1982, v. 69, № 3, p. 199–241.
2. Cullis P. R., Verwey A. J., Ververgaert P. H. J. Th. Biochim. et biophys. acta, 1978, v. 513, № 1, p. 11–20.
3. Wieslander A., Ulmius J., Lindblom G., Fontell K. Biochim et biophys. acta, 1978, v. 512, № 2, p. 241–253.
4. Borovjagin V. L., Vasilenko I. A. Anat. Record., 1981, v. 199, № 3, p. 32–37.
5. Jacobs R. E., Oldfield E. Progress in NMR spectroscopy, 1981, v. 41, № 2, p. 113–136.
6. Cullis P. R., de Kruijff B. Biochim. et biophys. acta, 1978, v. 507, № 1, p. 207–218.
7. Seelig J. Biochim. et biophys. acta, 1978, v. 515, № 1, p. 105–140.
8. Nozawa Y., Iida H., Fukushima H., Ohki K., Ohnishi S. Biochim. et biophys. acta, 1974, v. 367, № 1, p. 134–147.
9. Ohki K., Kasai R., Nozawa Y. Biochim. et biophys. acta, 1979, v. 558, № 1, p. 273–281.
10. Kishimoto A., Takai Y., Mori T., Kikkawa U., Nishizuka Y. J. Biol. Chem., 1980, v. 255, № 6, p. 2273–2276.
11. Takai Y., Yamamoto M., Inoue M., Kishimoto A., Nishizuka Y. Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1977, v. 77, № 2, p. 542–550.
12. Mori T., Takai Y., Yu B., Takahashi J., Nishizuka T. J. Biochem., 1982, v. 91, № 2, p. 427–431.
13. Ohki K., Sekiya T., Yamauchi T., Nozawa Y. Biochim. et biophys. acta, 1981, v. 644, № 2, p. 165–174.
14. De Kruijff B., Verwey A. J., van Echteld C. J. A., Gerritsen W. J., Mombers C., Noordam P. C., de Gier J. Biochim. et biophys. acta, 1979, v. 555, № 1, p. 200–209.
15. Bell R. L., Majerecs P. W. J. Biol. Chem., 1980, v. 255, № 5, p. 1790–1792.
16. Billah M. M., Lapetina E. G., Guatrecasas P. J. Biol. Chem., 1980, v. 255, № 19, p. 10227–10231.
17. Василенко И. А., Серебренникова Г. А., Евстигнеева Р. П. Биоорг. химия, 1975, т. 1, № 1, с. 56–60.
18. Бергельсон Л. Д., Дятловицкая Э. В., Мологковский Ю. Г., Баграков С. Г., Барсуков Л. И., Проказова Н. В. Препаративная биохимия липидов. М.: Наука, 1981, с. 110, 186.
19. Швець В. Г., Сенников Г. А., Гольбець І. І., Орлова Г. Л., Краснопольский Ю. М. Фармацевт. ж., 1977, № 4, с. 79–81.
20. Comfurius P., Zwaal R. F. A. Biochim. et biophys. acta, 1977, v. 488, № 1, p. 36–42.
21. Trevelyan W. E. J. Lipid Res., 1966, v. 7, № 2, p. 445–447.
22. Hirasawa Y., Irvine K. Eur. J. Biochem., 1981, v. 120, № 1, p. 53.
23. Buchnea D. Lipids, 1971, v. 6, № 3, p. 734–739.

Поступила в редакцию
30.XI.1982
После доработки
15.II.1983

THE INFLUENCE OF PHOSPHOLIPID METABOLITES ON THE STRUCTURE OF MODEL MEMBRANES

SOROKOUMOVA G. M., VASILENKO I. A., SHVETS V. I.,
SELISHCHEVA A. A., BOROVYAGIN V. L.

*M. V. Lomonosov Institute of Fine Chemical Technology, Moscow;
Biology Department, M. V. Lomonosov Moscow State University, Moscow;
Institute of Biological Physics, Academy of Sciences of the USSR,
Pushchino*

The influence of 1,2-diacylglycerols on the structure of model membranes made of phosphatidylcholine or phosphatidylcholine – phosphatidylethanolamine and phosphatidylcholine – phosphatidylinositol mixtures was studied by ^{31}P NMR and freeze-fracture technique. It was shown that 1,2-diacylglycerols (1,2-dipalmitoyl-*rac*-glycerol, 1-palmitoyl-2-oleoyl-*rac*-glycerol, 1,2-dioleoyl-*rac*-glycerol and also naturally occurring 1,2-diacyl-*sn*-glycerols) induced in the lipid bilayer markedly curved regions with concomitant formation of the folds and intramembrane particles. This process is accompanied by the appearance of isotropic signals in the ^{31}P NMR spectra.