

Л. И. БАРСУКОВ, Ю. Е. ШАПИРО, А. В. ВИКТОРОВ,
В. Ф. БЫСТРОВ, член-корреспондент АН СССР Л. Д. БЕРГЕЛЬСОН

ПРОСТРАНСТВЕННАЯ ОРИЕНТАЦИЯ ПОЛЯРНЫХ ГРУПП НА ПОВЕРХНОСТИ ВЕЗИКУЛЯРНЫХ ЛЕЦИТИНОВЫХ МЕМБРАН

Вопрос о пространственной ориентации полярных групп фосфолипидов на поверхности раздела мембрана — вода до сих пор не решен однозначно. При изучении лецитиновых монослоев и водно-лецитиновых систем одни авторы пришли к выводу, что фосфорилхолиновые цепочки ориентированы перпендикулярно поверхности мембраны (¹, ²), другие более вероятной полагают такую ориентацию, при которой эти группировки расположены параллельно поверхности мембраны (³, ⁴). Что же касается конформаций этих цепочек, то до последнего времени, вообще, не существовало метода, который позволял бы изучить их хотя бы косвенно. Можно было только предполагать, что может реализоваться как полностью развернутая конформация с максимальным удалением триметиламмониевой и фосфатной группировок (³), так и свернутая конформация, в которой между этими группами образуется внутримолекулярная солевая связь (¹).

Мы нашли, что пространственная ориентация и предпочтительная конформация полярных группировок на границе раздела мембрана — вода может быть установлена методом спектроскопии я.м.р. с применением гидрофильных парамагнитных меток (например, ионов Pr^{3+} , Eu^{3+} и других лантанидов).

Для исследования пространственного состояния молекул наибольший интерес представляет так называемый псевдоконтактный сдвиг, индуцируемый парамагнитными ионами. Этот сдвиг доминирует для протонов, находящихся от места связывания иона на расстоянии нескольких химических связей. Величина псевдоконтактного сдвига определяется соотношением (⁵)

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

где k — коэффициент, зависящий от температуры и компонент g -тензора магнитной анизотропии; θ — угол, описывающий положение протона относительно оси аксиальной симметрии g -тензора, и r — расстояние протона от иона лантанида. Угловая составляющая $(3 \cos^2 \theta - 1)$ определяет знак псевдоконтактного сдвига: протоны, лежащие в пределах углов от $54,7$ до $125,3^\circ$, должны иметь сдвиги, знак которых противоположен знаку сдвигов, отвечающих протонам с θ от 0 до $54,7^\circ$ и от $125,3$ до 180° .

Мы провели анализ сдвигов, индуцируемых катионами Pr^{3+} и Eu^{3+} в спектрах я.м.р.- ^1H везикулярных лецитиновых мембран* (⁶⁻⁸). В присутствии парамагнитных ионов лантанидов смещается не только интенсивный сигнал от протонов групп $\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ (⁹), но и ряд слабых сигналов, отвечающих протонам группировок POCH_2 , N^+CH_2 , $\text{CH}_2\text{C}=\text{O}$ и $\text{CH}_2\text{CC}=\text{O}$. Интересно отметить, что если сигналы от протонов групп POCH_2 , N^+CH_2 и $\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ холиновой части молекул лецитина смещаются в слабое поле при добавлении Pr^{3+} , то сигналы от протонов групп $\text{CH}_2\text{C}=\text{O}$ и $\text{CH}_2\text{CC}=\text{O}$ жирнокислотных остатков испытывают сдвиг в сильное поле, что в соот-

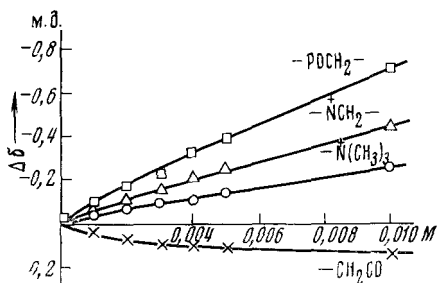
* Образцы приготовлены по методу (⁹). Спектры я.м.р.- ^1H сняты при 30° на спектрометре JEOLCO типа JNM-4H-100 при частоте 100 Мгц. Внешний стандарт для стабилизации — гексаметилдисилоксан.

ветствии с уравнением (1) свидетельствует о нахождении фосфорилхолиновых цепочек и жирнокислотных остатков в разных областях пространственных углов θ . Группировки, сигналы от которых смещаются под действием парамагнитных ионов, образуют полярную область лецитиновой мембраны, непосредственно контактирующую с окружающей водной средой. Напротив, четко наблюдаемые в спектрах сигналы от группировок, находящихся в гидрофобной области

мембраны (CH_3 , $(\text{CH}_2)_n$, $\text{CH}_2\text{C}=\text{C}$, $\text{CH}_2(\text{C}=\text{C})_2$ и $\text{CH}=\text{CH}$), практически не меняют своего положения, откуда следует, что ионы лантанидов локализуются в полярной области мембраны и не входят в ее жирную фазу.

Как и следовало ожидать, сдвиги, индуцируемые парамагнитными ионами лантанидов в спектрах я.м.р. везикулярных лецитиновых мембран, уменьшаются по мере удаления протонов от фосфатных групп (рис. 1). Так, наибольшее смещение испытывает сигнал от протонов группы CH_2 , непосредственно связанной с фосфатным остатком. Сигнал от протонов группировки $\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ смещается меньше всего, а сигнал, отвечающий группе N^+CH_2 , по своему смещению занимает промежуточное положение.

Рис. 1. Зависимость индуцированных сдвигов ($\Delta\delta$) от концентрации $\text{Pr}(\text{NO}_3)_3$ в растворе для сигналов я.м.р.- ^1H везикулярной лецитиновой мембраны (10% дисперсия яичного лецитина в D_2O , обработанная ультразвуком (⁹))



Эти данные показывают, что связывание парамагнитных катионов происходит по фосфатным группировкам молекул лецитина. Качественно подобная картина смещения сигналов в присутствии $\text{Pr}(\text{NO}_3)_3$ наблюдается также в спектре я.м.р.- ^1H водного (D_2O) раствора фосфорилхолинхлорида (Ca^{2+} -соль), представляющего собой фрагмент полярного участка лецитиновой мембраны.

В интервале концентраций $\text{Pr}(\text{NO}_3)_3$ от 10^{-3} М до 10^{-2} М соотношение индуцированных сдвигов $\Delta\delta_{\text{POCH}_2} : \Delta\delta_{\text{N}^+\text{CH}_2} : \Delta\delta_{\text{N}^+(\text{CH}_3)_3}$ остается постоянным и составляет в среднем 1 : 0,66 : 0,35 для водно-лецитиновой дисперсии и 1 : 0,38 : 0,20 для фосфорилхолина. Поскольку величина индуцированного сдвига связана не только с удалением, но и с пространственной ориентацией данной группировки по отношению к парамагнитному центру (см. уравнение (1)), то постоянство отношений $\Delta\delta$ для группировок OCH_2 , N^+CH_2 и $\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ в изученном диапазоне концентраций $\text{Pr}(\text{NO}_3)_3$ позволяет предположить, что взаимное пространственное расположение этих группировок существенно не изменяется при взаимодействии празеодима с фосфатной группой фосфорилхолина и лецитина. Различия в соотношениях $\Delta\delta$ для фосфорилхолина и лецитина могут объясняться либо различными конформациями фосфорилхолиновой цепочки в лецитине и фосфорилхолине, либо различным типом связывания лантанидных ионов этими молекулами. Оказалось, что экспериментально найденные соотношения $\Delta\delta$ для фосфорилхолина и для лецитина наиболее близки к теоретически вычисленным на основании рассмотрения молекулярных моделей только в том случае, если фосфорилхолиновая цепочка находится в максимально развернутой конформации. Но при этом связывание иона лантанида в случае фосфорилхолина должно происходить по трем атомам кислорода фосфатной группы (как показано на рис. 2в), тогда как в случае лецитина в связывании принимают участие только два кислородных атома (см. рис. 2а). При таких условиях вычисленные только по расстояниям, без учета угловой зависимости (уравнение (1)) соотношения $\Delta\delta_{\text{POCH}_2} : \Delta\delta_{\text{N}^+\text{CH}_2} : \Delta\delta_{\text{N}^+(\text{CH}_3)_3}$ равны 1 : 0,37 : 0,27 для фосфорилхолина и 1 : 0,62 : 0,38 для лецитина. Близкое совпадение экспериментально найденных и теоретически

вычисленных соотношений индуцированных сдвигов указывает на то, что вклад углового фактора в величину псевдоконтактного сдвига, по-видимому, существенно не отличается для группировок OCH_2 , N^+CH_2 и $\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$. Действительно, оценка углов θ для протонов этих группировок показывает, что все эти углы близки и лежат в пределах $15\text{--}20^\circ$.

В случае водно-лецитиновой дисперсии найденные соотношения индуцированных сдвигов одновременно указывают на ориентацию фосфорилхо-

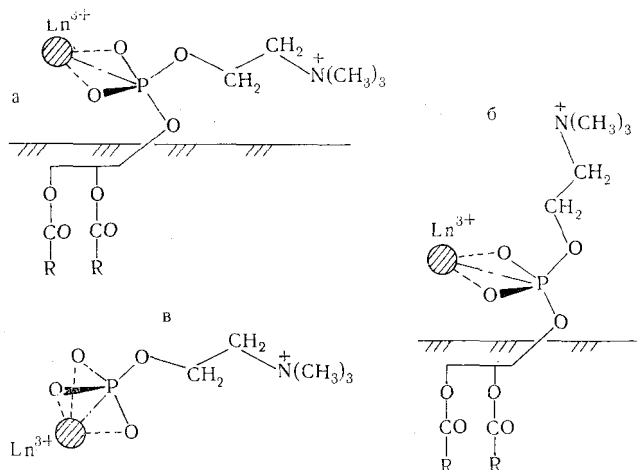


Рис. 2. Пространственное расположение фосфорилхолиновой группировки относительно поверхности мембраны. а — параллельно поверхности; б — перпендикулярно поверхности; в — конформация комплекса фосфорилхолина с ионом лантанида (Ln^{3+}), отвечающая максимальному удалению триметиламмониевой и фосфатной групп

линовой цепочки относительно поверхности мембраны. Расчеты показывают, что при ориентации этой цепочки перпендикулярно поверхности мембраны, как показано на рис. 2б, расстояния между соответствующими протонами и лантанидным ионом изменяются так, что соотношение $\Delta\delta_{\text{OCH}_2} : \Delta\delta_{\text{N}^+\text{CH}_2} : \Delta\delta_{\text{N}^+(\text{CH}_3)_3}$ становится равным $1 : 0,22 : 0,23$. Более того, при этом существенно изменяются углы θ . Так, для протонов $\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ -группы оценка дает $\theta > 60^\circ$. В соответствии с уравнением (1) это означает, что в случае перпендикулярной ориентации фосфорилхолиновой цепочки должен измениться знак индуцированного сдвига сигнала от $\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ -групп подобно тому, как это наблюдается для сигналов от групп $\text{CH}_2\text{C}=\text{O}$ и $\text{CH}_2\text{CC}=\text{O}$ (см. выше). Экспериментально найденное соотношение индуцированных сдвигов в принципе может отвечать также такой перпендикулярной к плоскости мембраны ориентации фосфорилхолиновой цепочки, при которой два атома кислорода фосфатной группы, ответственные за связывание парамагнитных ионов, направлены в сторону гидрофобной части мембраны. Однако рассмотрение моделей показывает, что эта ориентация является стерически невыгодной, и кроме того связывание ионов лантанидов должно быть затруднено из-за экранирования фосфатных групп гидрофобной областью мембраны.

Таким образом, на основании анализа сдвигов, индуцируемых парамагнитными ионами в спектрах я.м.р., можно сделать вывод, что фосфорилхолиновые цепочки на поверхности везикулярной лецитиновой мембраны ориентированы параллельно поверхности мембраны и находятся в полностью развернутой конформации с максимальным удалением фосфатной и $\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ -групп (рис. 2а).

Что стабилизирует подобное пространственное расположение фосфорилхолиновых группировок на поверхности мембраны? Казалось бы, что такая система связей должна обладать достаточно большой конформацион-

ной подвижностью и иметь, по крайней мере, набор из нескольких возможных конформаций и ориентаций. Однако анализ спектров я.м.р. показывает, что даже в молекулах фосфорилхолина, которые, по нашим данным, также находятся в полностью развернутой конформации (рис. 2в), вращение вокруг связей $O-CH_2$ и CH_2-CH_2 заторможено. Об этом свидетельствуют параметры $AA'BB'$ -спектра протонов группировки CH_2-CH_2 фосфорилхолина. Возможно, что для фосфорилхолиновой цепочки максимально развернутая конформация становится энергетически более выгодной из-за сольватирующих эффектов растворителя. Наличие объемных сольватных оболочек заряженных групп фосфорилхолиновой цепочки должно приводить к конформации с максимальным удалением фосфатной и триметиламмониевой групп. В принципе возможна также стабилизация развернутой конформации за счет связывания катиона на фосфатной группе лецитина и фосфорилхолина. Ясно, что и в этом случае положительно заряженная триметиламмониевая группировка должна быть максимально удалена от места связывания катиона лантанида. Однако связывание парамагнитных ионов, вероятно, не сопровождается изменением конформации и ориентации полярных групп на поверхности мембраны, так как соотношение сдвигов $\Delta\delta_{OCH_2} : \Delta\delta_{N^+CH_2} : \Delta\delta_{N^+(CH_3)_3}$, как уже отмечалось выше, не зависит от концентрации парамагнитных солей в широком диапазоне концентраций.

Институт химии природных соединений им. М. М. Шемякина
Академии наук СССР
Москва

Поступило
28 VIII 1972

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ D. O. Shah, J. H. Schulman, J. Lipid Res., 8, 227 (1967). ² H. T. Tien, J. Theoret. Biol., 16, 97 (1967). ³ T. Hanai, D. A. Haydon, J. Taylor, J. Theoret. Biol., 9, 278 (1965). ⁴ M. M. Standish, B. A. Pethica, Trans. Farad. Soc., 64, 113 (1968). ⁵ B. L. Shapiro, J. R. Hlubicek, G. R. Sullivan, J. Am. Chem. Soc., 93, 3281 (1971). ⁶ C. Huang, Biochemistry, 8, 344 (1969). ⁷ Л. Д. Бергелъсон, Л. И. Барсуков и др., ДАН, 194, 708 (1970). ⁸ E. G. Finer, A. G. Flook, H. Hauser, Biochim. et biophys. acta, 260, 49 (1972). ⁹ V. F. Bystrov, N. I. Dubrovina et al., Chem. Phys. Lipids, 6, 343 (1971).