



УДК 543.426+547.39

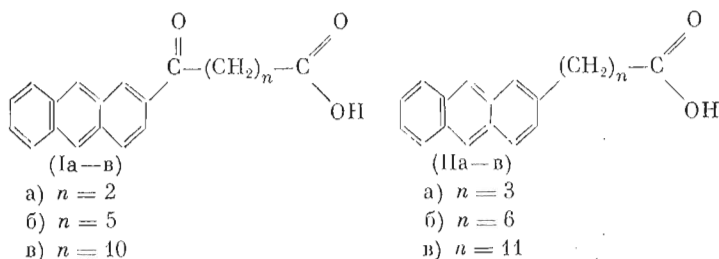
**ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЕ ЗОНДЫ — ПРОИЗВОДНЫЕ ЖИРНЫХ КИСЛОТ
ГЛУБИНА ПОГРУЖЕНИЯ ХРОМОФОРА В ЛИПИДНЫЙ БИСЛОЙ***Добрецов Г. Е., Спирин М. М., Чекрыгин О. В.,
Владимиров Ю. А.**2-й Московский государственный медицинский институт им. Н. И. Пирогова**Каплун А. П., Башарули В. А., Швец В. И.**Московский институт тонкой химической технологии им. М. В. Ломоносова*

Показано, что локализацию флуоресцирующих веществ в липидном бислое можно определить путем измерения эффективности переноса энергии с этих веществ на специально подобранные флуоресцентные зонды с известной локализацией в мембране. С помощью этого приема определена глубина погружения в липидный бислой хромофорных групп для ряда ω -(2-антрил)- и ω -(2-антроил)карбоновых кислот с различной длиной углеводородной цепи. В случае (2-антрил)карбоновых кислот флуорофор погружается на максимально возможную глубину, равную длине углеводородной цепочки в трансoidalной конформации. Для (2-антроил)карбоновых кислот глубина погружения флуорофора зависит от его расстояния до карбоксильной группы молекулы: при большей длине углеводородной цепи антроильная группа погружается в глубь мембраны, а при короткой остается у поверхности липидного бислоя.

При исследовании липидных мембран флуоресцентными или спиновыми зондами возникает необходимость поместить зонд в липидном бислое на заданной глубине. Первый флуоресцентный зонд, синтезированный с этой целью Ваггонером [1], а также все синтезированные впоследствии флуоресцентные зонды представляли собой производные жирных кислот. Карбоксильная группа или полярная головка фосфолипида служили «поплавком», закрепляющим один конец молекулы такого зонда на поверхности липидного слоя. Углеводородная цепь зонда предположительно должна была ориентироваться параллельно цепям молекул фосфолипидов. К ней в различных положениях присоединяли флуорофор, причем предполагалось, что глубина его погружения в липид должна соответствовать длине «спейсера», т. е. участка углеводородной цепи между хромофорной и карбоксильной группами. Однако проверить подобные предположения довольно трудно, так как до сих пор не существует прямого метода, который позволил бы измерить глубину погружения хромофоров в липидный бислой. Поэтому для решения этой задачи использовался целый ряд косвенных данных (обзор соответствующих исследований см. [2-4]).

Вместе с тем известно, что расстояние от любой флуоресцирующей молекулы до некоторой поверхности может быть определено путем измерения переноса энергии [5-7]. Для этого необходимо только подобрать соответствующие зонды — акцепторы энергии, располагающиеся на этой поверхности или на известном расстоянии от нее. Этот прием можно было бы использовать для любых молекул, которые имеют флуоресцирующие

группы и взаимодействуют с мембранами. В данной работе мы попытались с помощью этого принципа определить глубину погружения в липосомальную мембрану ряда новых зондов [3, 4], имеющих различную длину «спейсера» и содержащих в качестве флуорофоров антроильную (Ia–в) или антрильную (IIa–в) группы [3, 4]:



Как показано нами ранее [7], перенос энергии с точечного зонда – донора на две параллельные плоскости, на которых расположены акцепторы, описывается следующими выражениями:

$$F(t) = F(0) \exp(-t/\tau_0 - cI),$$

где $F(t)$ и $F(0)$ – интенсивность флуоресценции донора в моменты времени $t > 0$ и $t = 0$ соответственно; τ_0 – время затухания флуоресценции донора в отсутствие акцептора, c – концентрация акцепторов на плоскостях (см^{-2}). Вся геометрия системы влияет только на величину интеграла переноса энергии (I). Согласно работе [7],

$$I = I_1 + I_2,$$

$$I_1 = 2\pi \int_{|X|}^{\infty} E(t, R) R dR; \quad I_2 = 2\pi \int_{|X-d|}^{\infty} E(t, R) R dR,$$

где X – расстояние от донора до одной из плоскостей, d – расстояние между плоскостями. Функция $E(t, R)$ равна

$$E(t, R) = 1 - \exp[-(t/\tau_0) (R_0/R)^6],$$

где R_0 – критическое расстояние переноса энергии для данной пары донор – акцептор. Тушение стационарной флуоресценции донора в результате переноса энергии описывается выражением

$$F/F_0 = (1/\tau_0) \int_0^{\infty} F(t) dt,$$

где F_0 и F – интенсивность стационарной флуоресценции доноров в отсутствие и в присутствии акцепторов соответственно.

Зонды (Ia–в) флуоресцируют в области 380–420 нм, а зонды (IIa–в) – в области 440–480 нм [4]. Чтобы определить их локализацию в липидном бислое, необходимо подобрать такой акцептор, на который мог бы происходить перенос энергии с этих зондов. В качестве акцептора мы выбрали 4-диметиламинохалкон (ДМХ), спектр поглощения которого находится как раз в области 380–480 нм [8]. Кроме того, известно, что ДМХ связывается с поверхностным слоем мембраны [2]. По спектрам можно рассчитать критическое расстояние (R_0) переноса энергии [9], которое для пары 2-антрильный флуорофор → ДМХ составляет 39,2 Å, а для пары 2-антроильный флуорофор → ДМХ – 37,5 Å.

Если к липосомальной мембране, в которую встроен зонд (IIб), добавить ДМХ, то интенсивность флуоресценции донора (IIб) снижается. Причиной тушения флуоресценции зонда является перенос части его энергии

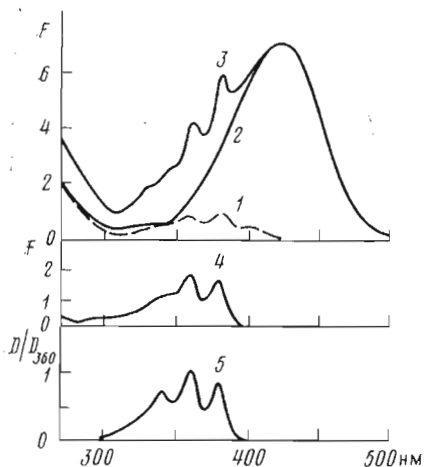


Рис. 1

Рис. 1. Перенос энергии с донора (IIб) на акцептор (ДМХ) в составе фосфолипидной липосомальной мембраны. 1, 2, 3 — спектры возбуждения флуоресценции ω -(2-антрил)энантовой кислоты (IIб), ДМХ и смеси донора (IIб) и ДМХ соответственно; 4 — разность между кривой 3 и суммой кривых 1 и 2; 5 — спектр поглощения ω -(2-антрил)энантовой кислоты (IIб). Концентрация (IIб) 10 мкМ, ДМХ 2 мкМ, липосом 1 г/л

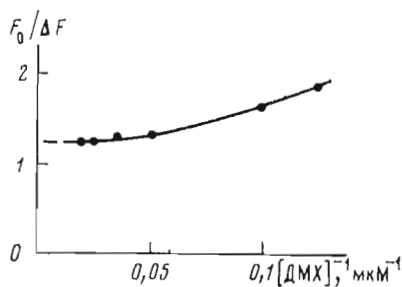


Рис. 2

Рис. 2. Определение вклада флуоресценции молекул зонда (IIб), связанных с липосомами, в его общую флуоресценцию. F_0 и F (здесь и на других рисунках) — интенсивность флуоресценции донора в отсутствие и присутствии акцептора (здесь ДМХ) соответственно; $\Delta F = F_0 - F$; концентрация липосом 1 г/л; $\lambda_{\text{возб}}$ 340 нм, $\lambda_{\text{фл}}$ 387 нм

на ДМХ. Действительно, одновременно с тушением флуоресценции донора (IIб) происходит рост флуоресценции акцептора (ДМХ), о чем свидетельствует появление в спектре возбуждения флуоресценции акцептора полосы поглощения донора (рис. 1). Аналогично было показано, что с зондов (Iб, в и IIв) также происходит перенос энергии на ДМХ в составе липосом.

Поскольку акцептор тушит флуоресценцию только тех молекул донора, которые связаны с мембраной, путем экстраполяции концентрации акцептора к бесконечности можно определить вклад связанных молекул донора в общую флуоресценцию (рис. 2). В случае соединения (IIб) флуоресценция связанных молекул составляет 83% всей флуоресценции (рис. 2), для его более длинного аналога (IIв) — 98%. Для антроильных зондов (Iб) и (Iв) эту величину определять не обязательно, поскольку флуоресценция в области 440 нм обусловлена только связанными с мембраной молекулами [4].

Степень тушения флуоресценции ω -(2-антрил)лауриновой кислоты (IIв) зондом ДМХ, пересчитанная в логарифмические координаты, представлена на рис. 3а. Если бы донор и акцептор находились в одной плоскости, эта зависимость соответствовала бы прямой линии [7]. Явное отклонение от прямой на рис. 3а свидетельствует о том, что зонд — донор (IIв) и акцептор (ДМХ) находятся в разных плоскостях. Теоретический расчет показывает (рис. 4), что, чем больше расстояние между плоскостями, в которых расположены доноры и акцептор, тем больше кривизна [7]. Кривизна может быть оценена с помощью параметра $c_{1,s}/c_{0,9}$ (рис. 4), который для пары донор (IIв) — акцептор (ДМХ) равен $2,53 \pm 0,10$ (рис. 3). Это соответствует максимальному удалению (X) доноров от плоскости с акцепторами, т. е. $X = d/2$, где d — толщина липидного бислоя. Полагая $d = 40 \text{ \AA}$, получим $X = 20 \pm 4 \text{ \AA}$. Таким образом, хромофорная группа зонда (IIв) расположена примерно в середине липидного бислоя. Для этого углеводородная цепь должна быть практически полностью вытянута, так

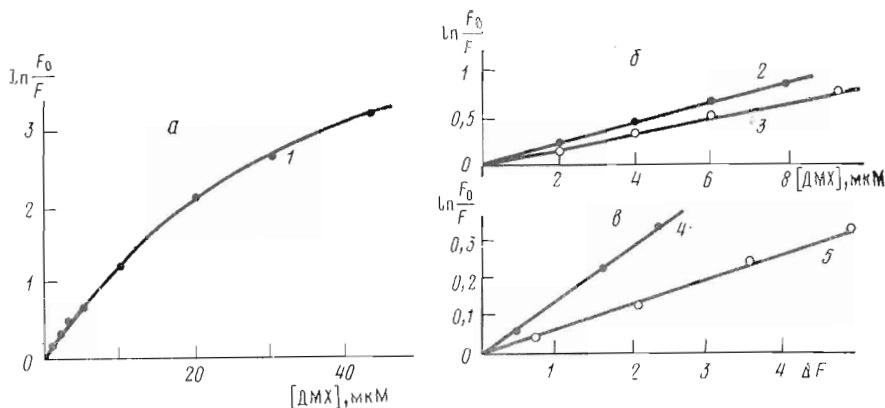


Рис. 3. Тушение флуоресценции зондов-доноров зондами-акцепторами для донорно-акцепторных пар: (IIb) → ДМХ (1), (Iv) → ДМХ (2), (Ib) → ДМХ (3), (Iv) → (Iv) (4), (Ib) → (Ib) (5). $\Delta F = (F_{500} - F_{552})$ — величина, пропорциональная концентрации связанных с мембраной зондов (Ib) и (Iv)

как максимальное расстояние между карбоксильной группой и серединой антраценового флуорофора — около 18 \AA . Другими словами, в случае зонда (IIb) наблюдается погружение его в липидный бислой на максимально возможную глубину.

Если этот вывод сделан верно, то, как показывает теоретический расчет [7], начальный участок кривой на рис. 3а должен иметь наклон $d[\ln(F_0/F)]/d[\text{сл}R_0^2] = 1,38$. Считая площадь поверхности бислоя, приходящуюся на одну молекулу лецитина, равной $62,7\text{ \AA}^2$ [10], получаем наклон $1,54 \pm 0,04$, который отличается от теоретической величины лишь на 12%. Эта разница кажется неправдоподобно малой: ведь теоретическая величина получена в результате расчетов по трем приближенным моделям, а экспериментальная включает в себя все погрешности определения концентраций, удельной поверхности липида и измерений флуоресценции.

Молекула зонда (IIb) короче молекулы (IIv) на фрагмент $-(\text{CH}_2)_5-$, что соответствует $\sim 6\text{ \AA}$. Поэтому максимальное погружение зонда (IIb) в мембрану не превысит 12 \AA . Теоретический расчет показывает, что наклон кривой тушения будет на 3% ниже, чем для соединения (IIv), если флуорофор (IIb) погружен на 12 \AA , и на 18%, если он не погружен и находится на поверхности. Экспериментальная величина наклона равна $1,48 \pm 0,03$ и свидетельствует о том, что зонд (IIb) также погружается в липидный бислой на максимально возможную глубину ($\sim 12\text{ \AA}$).

Наклоны кривых тушения 2-антроилсодержащих зондов (Ib) и (Iv) значительно различались (рис. 3б). Вместе с тем между соединениями (Ia) и (Ib) не было достоверной разницы. По-видимому, флуорофор зонда (Iv) погружен на максимально возможную глубину, тогда как флуоресцирующие хромофоры зондов (Ia) и (Ib) локализируются около поверхности липидного бислоя. Этот вывод подтверждается опытом по переносу энергии в парах донор (IIv) → акцептор (Iv) и донор (IIb) → акцептор (Ib) (рис. 3в): флуорофор зонда (Iv) погружен в середину бислоя, поэтому в ней создается двойная концентрация акцептора (эти хромофоры опущены с двух поверхностей бислоя); следовательно, эффективность переноса энергии возрастает по сравнению со случаем, когда в качестве акцептора выступает соединение (Ib).

На основании полученных данных можно представить локализацию зондов (Ia—v) и (IIa—v) в фосфолипидной мембране (рис. 5). Зонды с длинным «спейсером» располагаются вдоль углеводородных цепей фосфолипидов, таким образом, что углеводородные цепи зондов принимают конформацию, близкую к трансoidной. Однако если длина цепи 2—5 CH_2 -групп, гидрофильная карбоксильная группа ω -(2-антроил)карбоновых

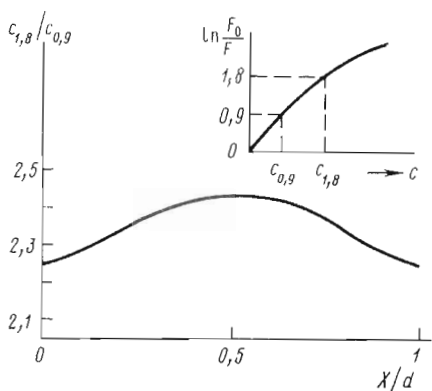


Рис. 4. Кривизна кривых, описывающих тушение флуоресценции доноров акцепторами в результате переноса энергии. Акцепторы расположены на двух параллельных плоскостях, разделенных расстоянием d . Доноры находятся между этими двумя плоскостями на расстоянии X от одной из них. $c_{1,8}$ и $c_{0,9}$ — плотность акцепторов на плоскости (см^{-2}), при которой $\ln(F_0/F)$ равен соответственно 1,8 и 0,9. На угловом рисунке — схема, поясняющая смысл величин $c_{1,8}$ и $c_{0,9}$

кислот (Ia) и (Iб) не дает возможности антраценовому флуорофору погрузиться на предельную глубину, удерживая его около поверхности мембраны. Сам антраценовый флуорофор ориентируется, вероятно, параллельно углеводородным цепям, как это наблюдалось в других модельных системах [11].

Строго говоря, определение расстояния между донором и акцептором не есть то же самое, что определение глубины погружения флуоресцентного зонда в липидный бислой. С помощью переноса энергии измеряется лишь среднее расстояние между донорами и акцепторами. Однако если доноры и акцепторы принадлежат к одному классу соединений, например жирным кислотам, то можно думать, что карбоксильные группы тех и других молекул расположены на поверхности бислоя. В этом случае перенос энергии отражает именно глубину погружения флуорофоров. Соответствие между результатами, полученными с разными акцепторами — жирными кислотами и ДМХ, — показывает, что и ДМХ расположен в поверхностном слое мембраны, примерно там же, где карбоксильные группы жирных кислот.

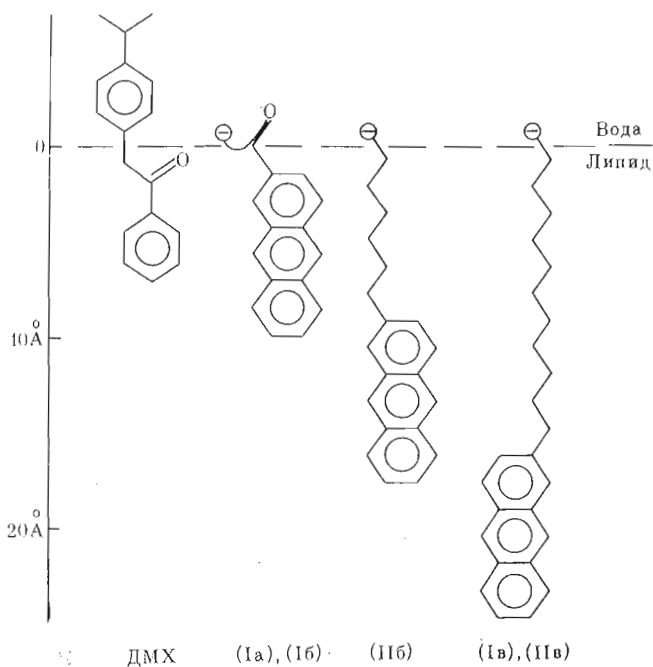


Рис. 5. Локализация флуоресцентных зондов в фосфолипидной мембране из фосфатидилхолина

В заключение необходимо отметить основные факторы, влияющие на величину ошибок в определении степени погружения хромофоров в производные мембраны с помощью данного метода:

а) как отмечено выше, чем точнее известна локализация донора (акцептора), тем меньше погрешность в определении локализации акцептора (донора);

б) точность определения положения донора возрастает, если использовать два типа акцепторов, различающихся глубиной погружения в мембрану;

в) точность возрастает по мере увеличения отношения d/R_0 .

Полученные данные о локализации исследованных зондов (Ia—в) и (IIa—в) в липидной мембране вполне соответствуют тому, что известно о локализации многих других зондов [1, 2]. Поэтому можно думать, что предложенный способ измерения переноса энергии позволит получать адекватные данные о расположении разнообразных флуоресцирующих соединений в мембранах и тем самым явится полезным методом изучения структуры биологических мембран.

Экспериментальная часть

Синтез флуоресцентно меченных кислот (Ia-в) и (IIa-в) описан в работах [3, 12], оптические свойства — в работах [3, 4]. Синтез и оптические свойства флуоресцентного зонда ДМХ рассмотрены в работах [2, 8, 13].

Суммарные фосфолипиды куриных яиц экстрагировали по Фолчу [14]. Фосфатидилхолин получали из суммарных фосфолипидов хроматографией на силикагеле [15]. Липосомы получали согласно [16] путем быстрого впрыскивания одного объема этанольного раствора фосфатидилхолина (28 г/л) в 13 объемов раствора 0,01 М трис-НСl-буфера, рН 7,5 (с. 74 [2]). Характеристики липосом приведены в работе [17].

Флуоресценцию измеряли в плоской кварцевой кювете толщиной 1 мм, расположенной под углом 45° к оптическим осям монохроматоров спектрофлуориметра «Hitachi MPF-4» (Япония) при $23 \pm 2^\circ$ С.

Эффективность переноса энергии между молекулами, расположенными в разных параллельных плоскостях, была теоретически проанализирована в предыдущей работе [7]. Подбор параметров модели, удовлетворяющих экспериментальным данным, проводили на ЭВМ М-4030.

ЛИТЕРАТУРА

1. Waggoner A. S., Stryer L. Fluorescent probes of biological membranes.— Proc. Nat. Acad. Sci., 1970, v. 67, № 2, p. 579—589.
2. Владимиров Ю. А., Добрецов Г. Е. Флуоресцентные зонды в исследовании биологических мембран. М.: Наука, 1980.
3. Капалу А. П., Башарули В. А., Шуккина Л. Г., Швец В. И. Синтез флуоресцентно-меченных жирных кислот с антропильной и антрильной группами.— Биоорг. химия, 1979, т. 5, № 12, с. 1826—1830.
4. Добрецов Г. Е., Спириин М. М., Капалу А. П., Башарули В. А., Бауриин В. В., Кудря Д. П., Швец В. И., Владимиров Ю. А. Флуоресцентные зонды — (2-антрил)- и (2-антроил)-производные жирных кислот.— Рукопись депонирована в ВИНТИ, 1980, № 4816—80 деп.
5. Kuhn H. Interaction of chromophores in monolayer assemblies.— Pure Appl. Chem., 1971, v. 27, № 3, p. 421—438.
6. Kuhn H. Energy migration and photochemistry in monomolecular layers.— In: 6 Intern. Congress Photobiol. Abstr. Bochum, 1972, p. 2.
7. Добрецов Г. Е., Чекрыгин О. В. Анализ синглет-синглетного переноса энергии в мембранах. II. Перенос с точечного белка на флуоресцентный зонд, расположенный на двух поверхностях липидного бислоя.— Рук. деп. в ВИНТИ, 1980, № 4815—80 деп.
8. Dobretsov G. E., Petrov V. A., Vladimirov Yu. A. 4-Dimethylaminochalcone and 3-methoxybenzanthrone as fluorescent probes to study biomembranes. II. Sensitivity of 4-dimethylaminochalcone to water molecules in the surface layer of a membrane.— Studia Biophys., 1978, v. 71, № 3, p. 181—187.

9. Förster Th. Transfer mechanisms of electronic excitation.— Disc. Faraday Soc., 1959, № 27, p. 7–17.
10. Lindmo T., Steen H. B. Flow cytometric measurement of the polarization of fluorescence from intracellular fluorescein in mammalian cells.— Biophys. J., 1977, v. 18, № 2, p. 173–187.
11. Jonas I., Fontell K., Lindblom G., Norden B. Orientation study of probe molecules in lamellar liquid crystalline lipid systems by linear dichroism.— Spectrosc. Lett., 1977, v. 10, № 6, p. 501–506.
12. Каплун А. П., Башарули В. А., Швец В. И. Синтез флуоресцентно-меченных фосфатидилхолинов с остатками 11-(2-антроил)-ундекановой кислоты.— Биоорганическая химия, 1978, т. 4, № 11, с. 1567–1568.
13. Добрецов Г. Е. Флуоресцентные зонды: оптические свойства и взаимодействие с мембранами.— В сб.: Итоги науки и техники. Сер. «Биофизика». М.: ВИНТИ, 1979, т. 11, с. 104–188.
14. Folch J., Lees M., Stanley G. H. S. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues.— J. Biol. Chem., 1957, v. 226, p. 497–509.
15. Новицкая Г. В. Методическое руководство по тонкослойной хроматографии фосфолипидов. М.: Наука, 1972, с. 37–39.
16. Batzri S., Korn E. D. Single bilayer liposomes prepared without sonication.— Biochim. et biophys. acta, 1973, v. 298, № 4, p. 1015–1019.
17. Деев А. И. Применение флуоресцентных зондов для изучения структурных изменений поверхности фосфолипидных мембран. Автореф. дис. на соискание уч. ст. канд. биол. наук. М.: 2-й Моск. медицинский институт, 1975, 18 с.

FLUORESCENT PROBES — FATTY ACIDS DERIVATIVES: DEPTH OF CHROMOPHORE IMMERSION INTO LIPID BILAYER

DOBRETsov G. E., SPIRIN M. M., CHEKRYGIN O. V.,
VLADIMIROV Yu. A., KAPLUN A. P., BASHARULY V. A., SHVETS V. I.

*N. I. Pirogov 2-nd Moscow State Medical Institute, Moscow;
M. V. Lomonosov Institute of Fine Chemical Technology, Moscow*

It was demonstrated that localization of fluorescent compounds in the lipid bilayer may be determined by measuring the efficiency of energy transfer from these compounds onto special fluorescent probes whose localization in membrane is known. By this approach the depth of immersion into lipid bilayer of chromophoric groups was determined for a series of ω -(2-anthryl)- and ω -(2-anthroyl)carboxylic acids varying in the hydrocarbon chain-length. For the former, a fluorophore reaches a maximal depth equal to the length of hydrocarbon chain in transoid conformation. With 2-anthroyl derivatives, this depth depends on the distance between the fluorophore and carboxylic group: anthroyl group enters the membrane at longer hydrocarbon chain-length, and may reside in the lipid bilayer surface at a shorter chain.