



УДК 547.953.2'467.3.04

ИЗУЧЕНИЕ ЛИПИД-ЛИПИДНЫХ  
И ЛИПИД-БЕЛКОВЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ В МЕМБРАНАХ  
С ПРИМЕНЕНИЕМ ФОСФОЛИПИДОВ, СОДЕРЖАЩИХ  
ФОТОРЕАКТИВНЫЕ ГРУППИРОВКИ

3\*. СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ СПОСОБНОСТИ ФОТОМЕЧЕННЫХ  
ФОСФАТИДИЛХОЛИНОВ К ОБРАЗОВАНИЮ КОВАЛЕНТНЫХ  
МЕЖМОЛЕКУЛЯРНЫХ СВЯЗЕЙ В ЛИПОСОМАХ  
В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ПОЛОЖЕНИЯ ФОТОМЕТКИ В МОЛЕКУЛЕ ЛИПИДА

*Циренца М. Л., Ушаков А. П.*

*Институт биоорганической химии им. М. М. Шелякина  
Академии наук СССР, Москва*

Изучена зависимость выхода продуктов липид-липидной сшивки от положения фотометки в молекуле липида при фотолизе азидоформилсодержащих фосфатидилхолинов в липосомах. Количественное определение продуктов сшивки в фотолизате проводилось методом ГЖХ.

Проблема изучения гидрофобных липид-белковых взаимодействий в мембранах с использованием фотомеченных фосфолипидов была впервые сформулирована в 1975 г. [2]. Однако реализация предложенного подхода связана с большими трудностями и требует решения целого ряда методических проблем, начиная с выбора фотореактивных группировок и синтеза соответствующих липидов и кончая анализом продуктов фотолиза. Поэтому прямое доказательство образования межмолекулярных сшивок под действием УФ-света даже в наиболее простых мембранных системах — липосомах — было получено совсем недавно [3, 4].

Независимо от того, какие конкретные задачи решаются в экспериментах с использованием фотомеченного фосфолипида, всегда желательно, чтобы выход продуктов межмолекулярной сшивки был максимальным. Этот выход определяется природой фотореактивной группировки. С другой стороны, он должен зависеть от пространственного расположения фотореактивной группы в молекуле фосфолипида. Однако вопрос о влиянии размещения фотометки в молекуле фосфолипида на выход продуктов сшивки при фотолизе в литературе не обсуждался.

В настоящей работе влияние положения фотометки в *sn*-1- или *sn*-2-ацильной цепи фотомеченного фосфатидилхолина на выход продуктов межмолекулярной сшивки в липосомах исследовали на примере фосфатидилхолинов (I) и (IV), содержащих остаток 12-азидоформилостеариновой кислоты в положениях *sn*-1 и *sn*-2. Влияние положения фото-

\* Сообщение 2 см. [1].



**Количество продуктов межмолекулярной сшивки, образующихся при облучении УФ-светом липосом различного состава**

| Липидный состав липосом                 | $S_2/S_1$<br>(вычислено из хроматограмм) | $K$ ,<br>вычисленное из хроматограмм<br>(см. Приложение) | а %, найдено: |                         |
|---|--|--|---------------|-------------------------|
|   |  |  | методом ГЖХ   | методом гель-фильтрации |
| Липид (I)                               | 0,06                                     | —  | 19            | 26                      |
| Липид (I) + димиристоиллецитин (1 : 1)  | 0,08                                     | 0,56   | 18            | —                       |
| Липид (I) + диэлаидиноиллецитин (1 : 1) | 0,13                                     | 1,46   | 21            | 25                      |
| Липид (II)                              | —  | —  | —             | 45                      |
| Липид (III)                             | 0,19                                     | —  | 53            | —                       |
| Липид (IV)                              | 0,14                                     | —  | 41            | —                       |

тов ROCONHR', освобождающихся при метанолизе продуктов сшивки по типу *b*; *b* — доля продуктов межмолекулярной сшивки, в которой фотомеченная кислота одной молекулы липида ковалентно связана со свободным (без фотометки) ацильным остатком другой молекулы фотомеченного липида. Введение в расчеты параметра *b* необходимо, поскольку методом ГЖХ детектируется сшивка фотомеченной кислоты только с теми ацильными цепями, которые не содержат фотометок. Значение *b*, равное 0,6, характерное для насыщенных липидов (I) — (IV), определяли газохроматографическим анализом продуктов метанолиза облученных УФ-светом смешанных липосом, приготовленных из эквивалентных количеств фотомеченного лецитина и 1-миристоил-2-лауроилфосфатидилхолина. По соотношению площадей пиков ROCONHR', где R' представлено остатками лауриновой и миристиновой кислот, судили о распределении сшивки в положения *sn*-1 и *sn*-2 немеченого липида. Выход продуктов межмолекулярной сшивки в липосомах из чистых насыщенных фотомеченных фосфатидилхолинов (I), (II) и (IV), вычисленный по формуле (1) с использованием найденного таким образом значения *b*, хорошо согласуется с данными, полученными с помощью метода гель-фильтрации. Так, продукты фотоллиза фосфолипид (I) разделяли на колонке с сефадексом LH-20. При этом фракция «димера», т. е. продуктов межмолекулярной сшивки, содержала 26% липидного фосфора (таблица). Для определения выхода внутримолекулярной сшивки фракцию оставшегося «мономерным» фотомеченного липида подвергали метанолизу и анализировали методом ГЖХ. По данным этого анализа, внутримолекулярной сшивке подверглось менее 3% исходного количества фотомеченного липида.

Продукты фотоллиза ненасыщенного фотомеченного липида (II) анализировали только гель-фильтрацией (см. таблицу и рис. 2).

Как видно из таблицы, перемещение фотометки к карбоксильному концу ацильной цепи способствует заметному увеличению выхода межмолекулярной сшивки — ср. липиды (I) и (III). Аналогичный эффект дает переход от фосфатидилхолина с 12-азидоформилоксистеариновой кислотой в положении *sn*-2 к фосфатидилхолину с той же кислотой в положении *sn*-1 (ср. липиды (I) и (IV)). Интересные результаты получены при облучении УФ-светом липосом из непредельных фосфолипидов. Выход продуктов межмолекулярной сшивки в липосомах из чистого лецитина (II) в 2 раза выше, чем для аналогичного насыщенного лецитина (I). Вместе с тем количество продуктов сшивки в липосомах из эквивалентных смесей фотомеченного липида (I) с димиристоилфосфатидилхолином или диэлаидиноилфосфатидилхолином было практически одно и то же и не отличалось от выхода продуктов сшивки при облучении чистого фосфатидилхолина (I).

При фотоллизе смешанных липосом величину *a* вычисляли из урав-

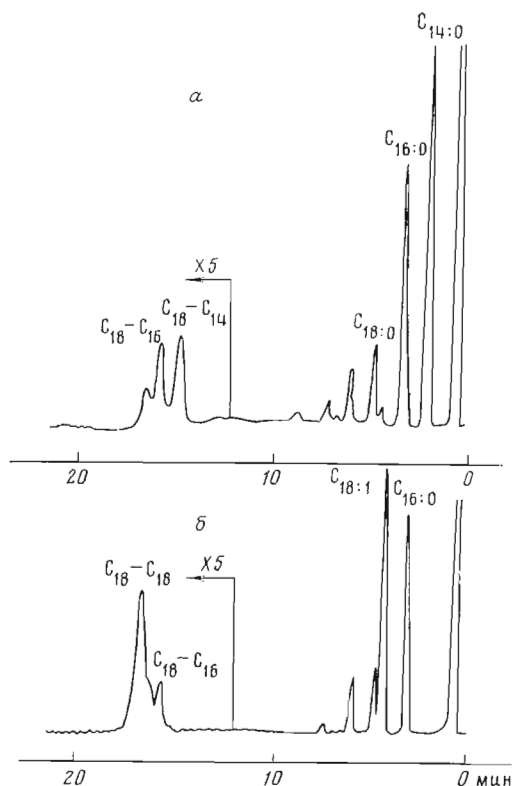


Рис. 1. Типичные газожидкостные хроматограммы смеси фрагментов ROCONHR' и метиловых эфиров кислот, освобождающихся при метанолизе продуктов облучения УФ-светом липосом, приготовленных из: *a* — эквимольной смеси фосфатидилхолина (I) и димиристоилфосфатидилхолина; *b* — эквимольной смеси фосфатидилхолина (I) и диэлаидиноилфосфатидилхолина. Условия ГЖХ см. в «Экспер. части»

нения

$$a = \frac{c(2 + K)}{b(1 + c) + K}, \quad (2)$$

где  $K$  — отношение мольных количеств продуктов сшивки фотомеченного липида с липидом без фотометки ( $\Phi \cdot \text{Н}\Phi$ ) к мольному количеству продуктов сшивки между молекулами фотомеченного липида ( $\Phi \cdot \Phi$ ). Величину  $K$  определяли из соотношения площадей соответствующих пиков на газожидкостных хроматограммах продуктов метанолиза облученных липидов.

Таким образом, выход продуктов межмолекулярной сшивки при фотоллизе исследованных азидоформилсодержащих фосфатидилхолинов практически не зависит от степени ненасыщенности пришиваемой молекулы, а определяется положением фотореактивной группировки в молекуле фотомеченного фосфатидилхолина и степенью ненасыщенности ацильной цепи, несущей фотометку, т. е. стерическими факторами.

*Приложение:* вывод формул (1) и (2).

Рассмотрим случай смешанных липосом, содержащих эквимольные количества фотомеченного фосфатидилхолина и фосфатидилхолина без фотометки. Определения параметров  $a$ ,  $b$  и  $K$  даны ранее. Очевидно, что

(1- $a$ ) — доля фотомеченного липида, оставшегося после фотолиза мономерным;

(1- $b$ ) — часть продукта сшивки ( $\Phi \cdot \Phi$ ), где фотомеченная кислота одной молекулы липида ковалентно связана с фотомеченной кислотой другой молекулы фотомеченного липида;

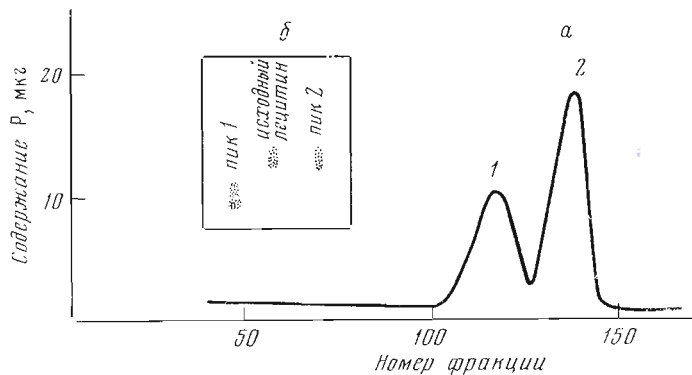


Рис. 2. Разделение продуктов фотоллиза фосфатидилхолина(II) с помощью гель-фильтрации (условия см. в «Экспер. части») (а) и ТСХ в системе хлороформ – метанол – вода, 65 : 25 : 4 (б): пик 1 – фракция продуктов межмолекулярной сшивки; пик 2 – фракция «мономерного» фосфатидилхолина

$K/2$  – отношение количества фотомеченного лецитина в продукте фотоллиза (Ф·НФ) к количеству того же лецитина в продукте (Ф·Ф);

$Ka/(K+2)$  – доля фотомеченного лецитина, связанного в продукте (Ф·НФ), от исходного количества фотомеченного лецитина;

$2a/(K+2)$  – доля фотомеченного лецитина, связанного в продукте (Ф·Ф), от исходного количества фотомеченного лецитина, которую можно представить как сумму продуктов сшивок в положении  $sn-1$  и  $sn-2$  пришиваемой молекулы:

$$2a/(K+2) = 2ab/(K+2) + 2a(1-b)/(K+2).$$

Аналогично:

$Ka/(K+2)$  – количество МЭ кислот-стандартов, освобождающееся при метанолизе продукта (Ф·НФ), в молях;

$ab/(K+2) + 2a(1-b)/(K+2)$  – количество МЭ кислот-стандартов, освобождающееся при метанолизе продукта (Ф·Ф), в молях;

$(1-a)$  – количество МЭ кислот-стандартов, освобождающееся из фотомеченного лецитина, оставшегося после фотоллиза мономерным;

отсюда  $Ka/(K+2) + ab/(K+2) + 2a(1-b)/(K+2) + (1-a)$  – суммарное количество МЭ кислот-стандартов, соответствующее площади пика  $S_1$ .

$ab/(K+2)$  – количество молей фрагмента  $ROCONHR'$ , освобождающееся при метанолизе части продукта (Ф·Ф), где остаток фотомеченой кислоты связан с немеченой ацильной цепью другой молекулы фотомеченного липида;

$Ka/(K+2)$  – количество молей фрагмента  $ROCONHR'$ , освобождающееся при метанолизе продукта фотоллиза (Ф·НФ);

$\left(\frac{Ka + ab}{K + 2}\right) \cdot 2$  – количество фрагмента  $ROCONHR'$ , выраженное в молях входящих в его состав жирных кислот и соответствующее площади  $S_2$ . Пренебрегая разницей в молекулярных весах жирных кислот, входящих в состав фосфолипидов, можно представить отношение площадей хроматографических пиков

$$S_2/S_1 = c = \frac{2a(b + K)}{(2 - ab + K)Q},$$

где  $Q$  – весовой поправочный коэффициент, учитывающий разницу в детектировании фрагментов  $ROCONHR'$  и МЭ кислот-стандартов. В условиях эксперимента  $Q=2$ , в этом случае

$$a = \frac{c(2 + K)}{b(1 + c) + K}. \quad (2)$$

При облучения липосом из чистого фотомеченного липида ( $K=0$ ) выражение (2) принимает вид

$$a = \frac{2c}{b(1 + c)}. \quad (1)$$

## Экспериментальная часть

Синтез фотомеченных фосфатидилхолинов (I)–(IV) описан ранее [4]. Диэлаидиноиллецитин получали ацилированием кадмиевого комплекса глицерофосфохолина ангидридом элаидиновой кислоты в присутствии 4-диметиламинопиридина [6]. Димиристоиллецитин синтезировали аналогично. При получении 1-миристоил-2-лауроил-*sn*-глицеро-3-фосфохолина димиристоиллецитин обрабатывали фосфолипазой A<sub>2</sub>, кадмиевый комплекс лизолецитина ацилировали ангидридом лауриновой кислоты [6]; продукт выделяли препаративной ТСХ на силикагеле. Приготовленные липосом, конструкция кюветы и другие экспериментальные подробности проведения фотолитиза описаны в работе [5]. Фотолитиз распределяли в системе хлороформ–метанол–вода (8:4:3), хлороформный слой отделяли, упаривали досуха и обрабатывали 30 мин 0,1 н. КОН в 98% водном метаноле при 40°С [5]. ГЖХ продуктов метанолиза проводили на колонках (500×4 мм) с 1,5% JXR на хромосорбе W-HP (100–120 меш) при повышении температуры от 130 до 280°С (6°С/мин; хроматограф «Руче 104», модель 64 (Англия)). При расчете хроматограмм площадь пика определяли, умножая высоту пика на его ширину в середине высоты.

Продукты фотолитиза разделяли на колонке с сефадексом LH-20 (100×1,5 см). Скорость подачи растворителя (хлороформ–метанол, 1:1) 12 мл/ч. Объем каждой фракции 0,5 мл.

Содержание фосфора во фракциях определяли по стандартной методике [7].

## ЛИТЕРАТУРА

1. Циренина М. Л., Симонова Т. Н., Колтовая Н. А., Голубева Е. Е., Ушаков А. Н. Изучение липид-липидных и липид-белковых взаимодействий в мембранах с применением фосфолипидов, содержащих фотореактивные группировки. 2. Синтез новых фотореактивных фосфатидилхолинов.— *Биоорг. химия*, 1981, т. 7, № 8, с. 1238–1247.
2. Chakrabarti P., Khorana H. G. A new approach to the study of phospholipid-protein interactions in biological membranes. Synthesis of fatty acids and phospholipids containing photosensitive groups.— *Biochemistry*, 1975, v. 14, № 23, p. 5021–5033.
3. Вавер В. А., Ушаков А. Н., Циренина М. Л. Фотондуцированная межмолекулярная сшивка в липосомах, содержащих лецитин с азидоформильной группировкой в цепи жирной кислоты.— Тезисы доклада на 1-м Советско-Швейцарском симпозиуме «Биологические мембраны. Структура и функции». Тбилиси, 1979, май 23–28, с. 52.
4. Gupta Ch. M., Radhakrishnan R., Gerber G. E., Olsen W. L., Quay S. C., Khorana H. G. Intermolecular crosslinking of fatty acyl chains in phospholipids: Use of photoactivable carbene precursors.— *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1979, v. 76, № 6, p. 2595–2599.
5. Вавер В. А., Ушаков А. Н., Циренина М. Л. Изучение липид-липидных и липид-белковых взаимодействий в мембранах с применением фосфолипидов, содержащих фотореактивные группировки. I. Образование ковалентных липид-липидных связей при облучении УФ-светом модельных мембран.— *Биоорг. химия*, 1979, т. 5, № 10, с. 1520–1530.
6. Gupta C. M., Radhakrishnan R., Khorana H. G. Glycerophospholipid synthesis: improved general method and new analogs containing photoactivable groups.— *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1977, v. 74, № 10, p. 4315–4319.
7. Gerlach E., Deuticke B. Simple microdetermination of phosphate by paper chromatography.— *Biochem. Z.*, 1963, B. 337, № 4, S. 477–479.

Поступила в редакцию 26.1.1981

## STUDIES ON LIPID-LIPID AND LIPID-PROTEIN INTERACTIONS IN MEMBRANES USING PHOSPHOLIPIDS CONTAINING PHOTOREACTIVE GROUPS. 3. A COMPARISON OF PHOSPHATIDYLCHOLINE ABILITY TO FORM INTERMOLECULAR CROSSLINKS IN LIPOSOMES DEPENDING ON THE POSITION OF PHOTOREACTIVE GROUP

TSYRENINA M. L., USHAKOV A. N.

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

The yield of products with intermolecular crosslinks was found to be 40% or 20% for UV-irradiated lecithins bearing the azidoformate group in *sn*-1 or *sn*-2 acyl chains, respectively. The quantitation was achieved by gas-liquid chromatography.