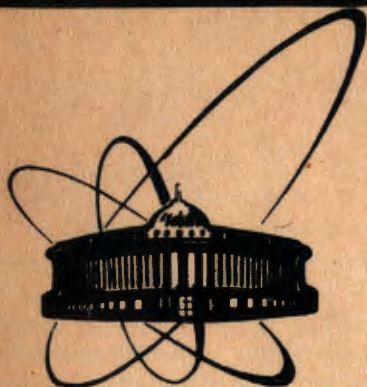


88-390



сообщения
объединенного
института
ядерных
исследований
дубна

P14-88-390

А.М.Балагуров, В.И.Горделий, Г.Клозе*

ВЛИЯНИЕ ДИЭФИРА
ГЕКСИЛФОСФОНОВОЙ КИСЛОТЫ PAV_6
НА СТРУКТУРУ ЖИДКОКРИСТАЛЛИЧЕСКИХ
ЛИПИДНЫХ МЕМБРАН

* Университет им.К.Маркса, Лейпциг, ГДР

1988

1. ВВЕДЕНИЕ

Воздействие диэстеров фосфоновой кислоты на физические свойства мембран изучалось в работах^{/1-5/}. В^{/3/} было установлено, что в униламеллярных небольших везикулах эстеры встраиваются предпочтительно во внешний монослой мембраны, до относительно больших количеств сохраняют ламеллярную фазу и частично ориентируются в плоскости бислоя. В^{/5/} показано, что при добавлении к яичному лецитину (EYL) диэтилового эфира гексилфосфоновой кислоты (PAE₆) общая толщина бислоя уменьшается по сравнению с мембраной из чистого EYL, и этот эффект увеличивается при увеличении гидратации мембраны. В^{/5/} было также установлено, что полярная часть эстера PAE₆ располагается между C₃-и C₄-атомами углеводородных цепей при $\psi = 60\%$ и сдвигается в сторону полярной головы молекулы, располагаясь в области C₁-атома при $\psi = 97\%$. Гидратационная способность липидных мембран из EYL + PAE₆ значительно возрастает.

В данной работе методом дифракции нейтронов изучается влияние химически близкого по составу к PAE₆ диэстера гексилфосфоновой кислоты PAB₆ на структуру мембран из общей липидной фракции яичного желтка (PL). PAB₆ (химическая формула C₆H₁₁P(O)(OC₄H₉)₂) отличается от PAE₆ наличием двух дополнительных гидрофобных CH₂-групп в каждой из эфирных частей молекул.

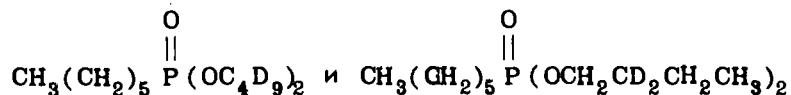
Целью работы является определение параметров липидного бислоя и локализация эстеров и воды в присутствии больших количеств PAB₆/мольное отношение 2:1/. Для этого используется методика разностного фурье-синтеза^{/6,7/}. Кроме того, проведено сравнение этих параметров с аналогичными для системы EYL + PAE₆ /2:1/.

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Полная липидная фракция яичного желтка /далее PL/ извлекалась по известному методу^{/8/}, ее состав проверялся с помощью ³¹P - ЯМР и тонкослойной жидкостной хроматографии /пластины HPTLC, Merck/. Молярное отношение фосфотидилхолин : фосфотидилэтаноламин составляло 3,2 : 1. Содержание сфингомиелина,

фосфотидилинозитола, лизофосфотидилхолина, лизофосфотидилэтноламина и нейтральных липидов в сумме составляло около 5 мол. %.

С целью определения положения эстера PAB_6 в мембране использовались дейтерий-меченные молекулы



/далее обозначаются $\text{PAB}_6\text{-D}_{18}$ и $\text{PAB}_6\text{-D}_4$ соответственно/, синтезированные в Техническом университете г. Дрездена. Их чистота контролировалась методами ^1H - и ^{31}P -ЯМР-спектроскопии.

PL и $\text{PAB}_6\text{-D}_{18}$ /или $\text{PAB}_6\text{-D}_4$ / растворялись в этаноле /5%-раствор/ в мольном соотношении 2:1. Около 0,2 мл этого раствора наносилось на полированную кварцевую пластину /площадь $\sim 6 \text{ см}^2$ / и растворитель медленно испарялся при температуре $T = 45^\circ\text{C}$, как описано в работе /9/. Количество образующихся при этом бислоев составляет $\sim 3 \cdot 10^8$. Мозаичность распределения мультислойной структуры была около 3° /ширина распределения на половине высоты/. Образцы помещались в алюминиевый контейнер, а определенное содержание воды в образце задавалось относительной влажностью паров воды над насыщенными растворами солей. Для установления равновесия образец выдерживался при заданной влажности 2-3 часа. Измерения проведены при трех значениях относительной влажности $\psi = 15\%$, $\psi = 60\%$ и $\psi = 97\%$ при температуре $T = 22^\circ\text{C}$. Для определения фаз структурных факторов и распределения воды в мембранах измерения дифракционных спектров проводились при относительной влажности соответственно $\psi = 15\%$ и $\psi = 97\%$ последовательно в парах H_2O , D_2O и смеси $\text{H}_2\text{O}:\text{D}_2\text{O}$ /мольное отношение 1:1/.

Измерения дифракционных спектров проведены на нейтронном дифрактометре ДН-2 с одномерным позиционно-чувствительным детектором на импульсном реакторе ИБР-2 /ЛНФ ОИЯИ/ /10/. Интегральный поток на образце составлял $1,3 \cdot 10^7 \text{ см}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$. Средний угол рассеяния равнялся $2\theta = 16^\circ$. Первые пять порядков брэгговских дифракционных отражений можно было регистрировать за $1 \div 3$ ч со статистической точностью не хуже 3%, /6 \div 8/ порядки отражения имели значительную меньшую интенсивность.

При обработке нейтронограмм выполнялась нормировка на эффективный спектр нейтронов, после чего нейтронограмма переводилась в шкалу межплоскостных расстояний. Положение 1-го порядка дифракционного отражения в этой шкале непосредственно дает период бислоя. При переходе от интегральных интенсивностей пиков к структурным факторам учитывался только множитель Лоренца в виде d^4 . Фактор поглощения не учитывался, т.к. при

$2\theta > 10^\circ$ и толщине образца $5 \cdot 10^{-3} \text{ см}$ он отличается от единицы не более чем на 1%.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ ЭКСПЕРИМЕНТОВ И ОБСУЖДЕНИЕ

На рис.1. показаны дифракционные спектры от образцов при относительной влажности $\psi = 15\%$, 60% , 97% в парах D_2O и $T = 22^\circ\text{C}$. При $\psi = 60\%$ /рис.1б/ образец содержит две фазы с положением рефлексов $d = 48,1 \pm 0,2 \text{ \AA}$ и $41,9 \pm 0,2 \text{ \AA}$. В соответствии с ^3P -ЯМР последняя фаза является гексагональной. При повышении влажности / $\psi = 97\%$ / наблюдается только одна (L_α) фаза-

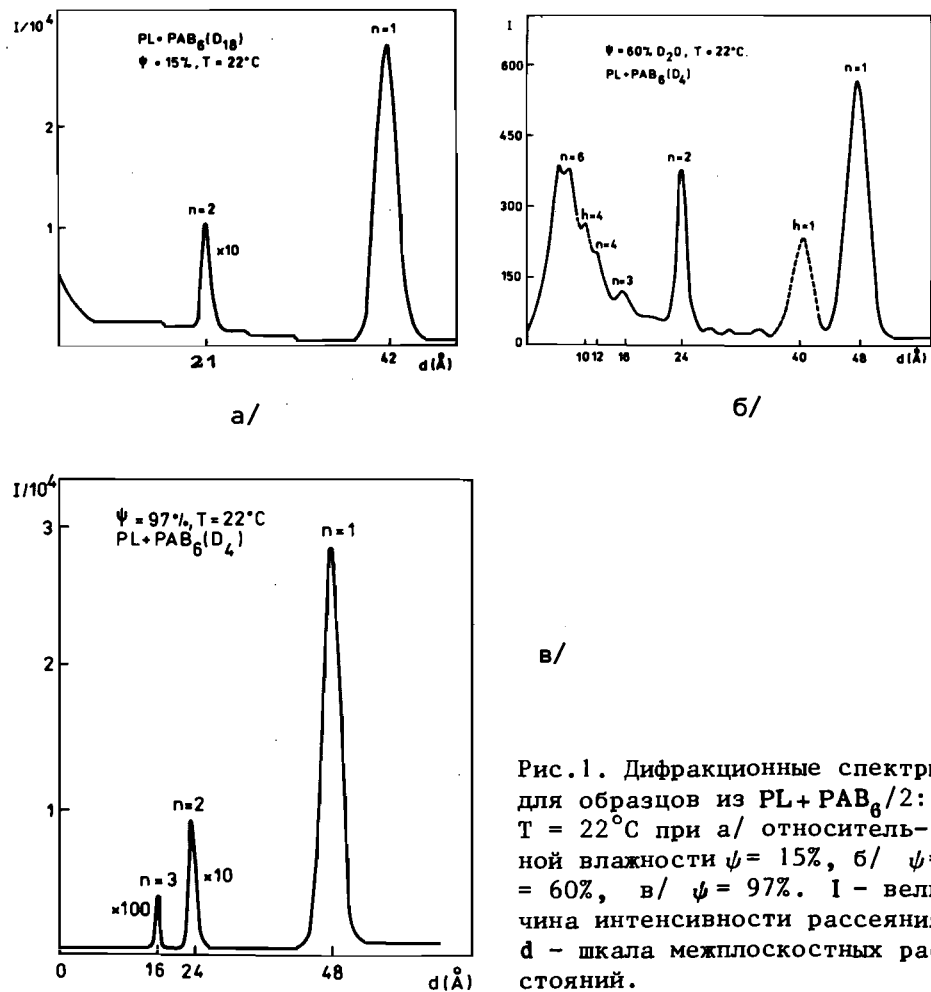


Рис.1. Дифракционные спектры для образцов из $\text{PL} + \text{PAB}_6/2:1/$, $T = 22^\circ\text{C}$ при а/ относительной влажности $\psi = 15\%$, б/ $\psi = 60\%$, в/ $\psi = 97\%$. I - величина интенсивности рассеяния, d - шкала межплоскостных расстояний.

за с $d = 48,1 \text{ \AA}$ /рис.1в/. При малой влажности $\psi = 15\%$ /рис.1а/ наблюдаются две фазы с $d = 41,9 \pm 0,2 \text{ \AA}$ и с $d = 62,0 \pm 0,2 \text{ \AA}$, причем объем последней фазы в образце значительно меньше объема первой фазы, и дифракционный спектр от фазы с $d = 62,0 \text{ \AA}$ практически не виден в масштабе рис.1а на фоне спектра от фазы с $d = 41,9 \text{ \AA}$.

На рис.2 представлена зависимость положения рефлекса фазы с $d = 41,9 \text{ \AA}$ при $T = 22^\circ\text{C}$ от температуры. Относительная влажность ψ задавалась насыщенным раствором LiCl и, как видно из рисунка, мало изменяется в диапазоне изменения температуры. Как следует из рис.2, ход зависимости периода повторяемости от температуры $d(T)$ /прямая 1/ параллелен ходу зависимости $\psi(T)$ /прямая 2/. Существенно здесь отметить, что зависимость $d(T)$ коррелирует именно с $\psi(T)$, а не с давлением насыщения паров $P_H(T)$ /кривая 3/.

Для определения положения эстера в бислое при $\psi = 97\%$ проводился совместный анализ дифракционных данных, полученных на образцах, содержащих частично дейтерированные $\text{PAB}_6\text{-D}_{18}$ и $\text{PAB}_6\text{-D}_4$ эстеры. Фазы /знаки/ структурных факторов определялись из сравнения их модулей при $\text{H}_2\text{O-D}_2\text{O}$ обмене.

На рис.3 приведены зависимости структурных факторов от содержания D_2O для образцов из $\text{PL+PAB}_6\text{-D}_4$ /2:1/ при $\psi = 97\%$.

Как и должно быть для centrosymmetricных структур, наблюдается линейная зависимость структурных факторов от степени замещения H_2O на D_2O . Это также означает, что экстинкцией в данном случае можно пренебречь. После определения знаков и модулей структурных факторов выполнялся фурье-синтез, т.е. вычислялась проекция распределения плотности амплитуды рассеяния нейтронов на направление, перпендикулярное плоскости бислоя /далее - "профиль плотности"/:

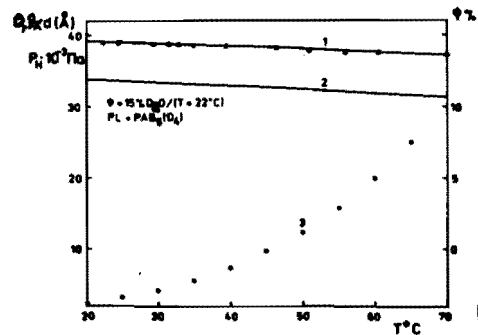


Рис.2. Зависимость периода повторяемости d /левая шкала/ от температуры /кривая 1/. Аналогичные зависимости для относительной влажности ψ - кривая 2 /правая шкала/ и давления насыщенных паров P_H /кривая 3/.

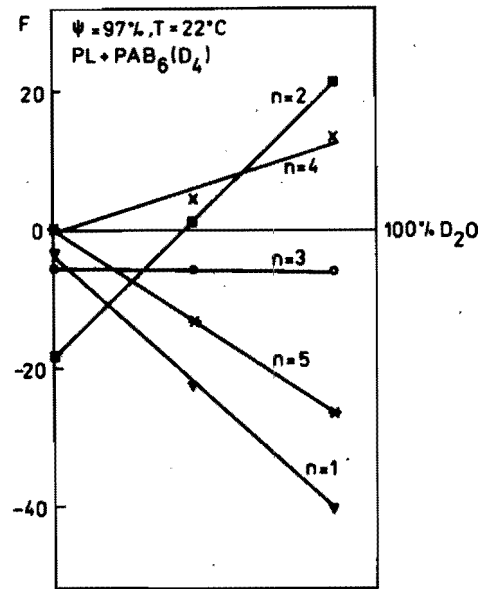
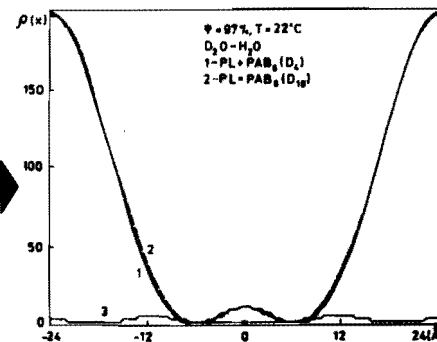


Рис.4. Распределение воды в исследовавшихся образцах при $\psi = 97\%$ /кривые 1 и 2/. Кривая 3 - уровень экспериментальных ошибок. Плотность амплитуды рассеяния - в относительных единицах.

Рис.3. Зависимость структурных факторов от содержания D_2O для образца из $\text{PL+PAB}_6\text{-D}_4$ при $\psi = 97\%$ и $T = 22^\circ\text{C}$.



$$\rho(x) = \sum_h F(h) \cdot \cos(2\pi xh/d), \quad /1/$$

где h - номер порядка отражения, d - период бислоя. Разностные фурье-синтезы позволяют построить распределения плотности воды и дейтерированных частей молекул эстеров:

$$\rho_W(x) = \sum_h (F_{\text{D}_2\text{O}}(h) - F_{\text{H}_2\text{O}}(h)) \cdot \cos(2\pi xh/d) \quad /2/$$

и

$$\rho_D(x) = \sum_h (F_{\text{D}_{18}}(h) - F_{\text{D}_4}(h)) \cdot \cos(2\pi xh/d), \quad /3/$$

где $F_{\text{D}_{20}}$ и $F_{\text{H}_2\text{O}}$ - структурные факторы для образца в парах D_2O и H_2O соответственно, а $F_{\text{D}_{18}}$ и F_{D_4} - структурные факторы для

образцов с PAE_8-D_{18} и PAE_8-D_4 соответственно при одной и той же ψ . При построении p_D приведение структурных факторов $F_{D_{18}}$ и F_{D_4} разных образцов в одну и ту же шкалу выполнялось с помощью нормировки на распределение воды, которое предполагалось одинаковым в обоих образцах. Разностные профили p_W и p_D с точностью до постоянного коэффициента соответствуют распределению воды и дейтерированной молекулярной группы эстера в мембране. Кроме того, зная /1/ и /2/ или /1/, /2/ и /3/, для образцов с эстером можно построить $p_L(x)$ -распределение плотности липида. На рис.4 показаны распределения воды при $\psi = 97\%$ для образцов с PAE_8-D_{18} и PAE_8-D_4 . Совпадения кривых распределения для двух образцов и малая величина экспериментальных ошибок /кривая 3 на рис.4/ свидетельствуют о надежности полученных результатов. Фурье-профили плотности амплитуды рассеяния нейтронов для воды и бислоя представлены на рис.5, из которого видно, что вода достаточно глубоко проникает в область бислоя. На рис.6 приведены профили-плотности для образцов из PL+

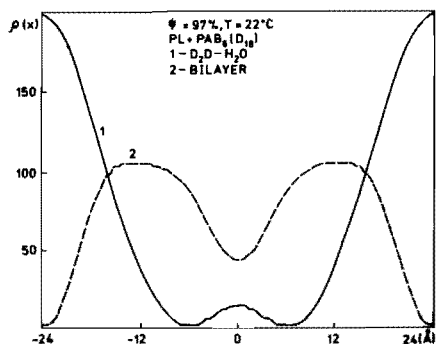
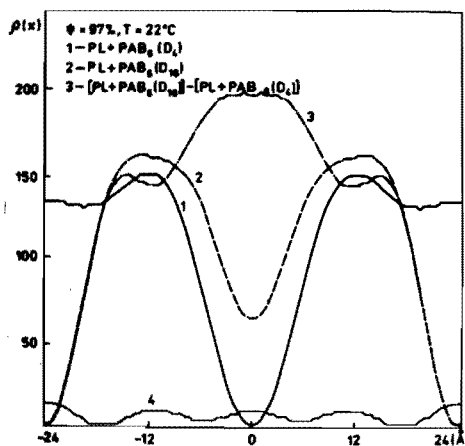


Рис.5. Распределение плотностей амплитуды рассеяния при $\psi = 97\%$, $T = 22^\circ C$ для воды - кривая 1 и бислоя - кривая 2 для образца $PL+PAE_8-D_{18}/2:1/$.

Рис.6. Профили-плотности амплитуды рассеяния при $\psi = 97\%$ H_2O , $T = 22^\circ C$ для образцов из: 1 - $PL+PAE_8-D_4$; 2 - $PL+PAE_8-D_{18}$. Кривая 3 - разностный фурье-профиль, соответствующий распределению эстера PAE_8 в мембране. Кривая 4 - уровень экспериментальных ошибок. По оси ординат относительный масштаб. Кроме того, начало отсчета /"0"/ по оси ординат смещено для всех кривых.



+ PAE_8-D_{18} и $PL+PAE_8-D_4$ при $\psi = 97\%$ /в парах H_2O / и разностный фурье-профиль /кривая 3/, соответствующий распределению эстера PAE_8 в мембране. Фурье-профили позволяют определить глубину проникновения воды в мембрану - l_W , количество молекул воды на молекулу липида - n_W/n_L , толщину бислоя мембран $d_L^{5,6/}$. Эти данные приведены в таблице.

Таблица

Образец	$\psi/\%$	Фаза	$d(\text{Å})$	$d_L(\text{Å})$	$l_W(\text{Å})$	n_W/n_L
$PL+PAE_8$	97	L_α	$48,1 \pm 0,2$	34 ± 1	12	13 ± 1

Распределение PAE_8 в мембране /рис.6/ аналогично распределению полностью гидрофобной молекулы гексана /11/, для которого можно выделить три характерных области: 1 - гидрофобные молекулы практически отсутствуют в той части мембраны, где расположена вода; 2 - определенное количество молекул расположено в полярной области мембраны; 3 - наибольшее число молекул расположено в области углеводородных цепей липидов /11/. С другой стороны, это распределение значительно отличается от распределения эстеров PAE_8 в мембране, полярные группы которых расположены в районе карбонильных групп липидов, в центре бислоя практически нет эстеров /5/. Это означает, что в случае PAE_8 гидрофобные взаимодействия значительно сильнее, чем для PAE_8 . Свободная энергия гидрофобного взаимодействия может быть оценена как энергия переноса данного соединения из воды в какую-либо неводную фазу /в том числе и в жидкую фазу углеводородных цепей липидов /12/. Свободная энергия ΔG переноса неразветвленной углеводородной цепи из воды в неполярный растворитель возрастает по абсолютной величине на каждую добавочную CH_2 -группу в среднем на $\Delta G_{CH_2} = 3,4-4,2$ кДж/моль /12/. Молекула PAE_8 отличается от PAE_8 только тем, что имеет в каждой из двух эфирных групп на два CH_2 звена больше. Таким образом, предположив неразветвленность углеводородных цепей молекул PAE_8 и PAE_8 , можно оценить соотношение коэффициентов распределения этих молекул между двумя фазами: водной и фазой углеводородных цепей липидов. Это соотношение равно

$$K(PAE_8)/K(PAE_8) \sim \exp(4\Delta G_{CH_2}/RT) = 10^3.$$

Различие в величинах коэффициентов распределения на три порядка и приводит к существенному отличию фурье-профилей распределения PAE_8 и PAE_8 .

ВЫВОДЫ

Таким образом, при добавлении к PL эстера PAB_6 в соотношении 2:1 при относительной влажности соответственно $\psi = 15\%$ и $\psi = 60\%$ / $T = 22^\circ\text{C}$ / наблюдаются по две фазы с различными постоянными решетки, устойчивыми в широком интервале температур. При $\psi = 97\%$ наблюдается только одна (L_α) фаза с $d = 48,1 \text{ \AA}$. Молекулы PAB_6 распределены в основном в липидной области, причем в центральной - углеводородной /гидрофобной/ - части мембраны величина плотности распределения максимальна. Такое распределение существенно отличается от распределения молекул PAE_6 в мембране из яичного лецитина. Различие в местоположении эстеров PAB_6 и PAE_6 в мембране может объясняться значительно большей гидрофобностью PAB_6 , что подтверждается оценкой величины отношения коэффициентов распределения PAB_6 и PAE_6 в системе вода - углеводородная часть мембраны, равной $\approx 10^3$. Именно поэтому распределение PAB_6 в мембране практически аналогично таковому для полностью гидрофобных молекул гексана [11].

Авторы благодарят Б.Кёнига за помощь в проведении измерений, В.Г.Ивкова и Л.С.Ягужинского за полезные обсуждения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Klose G. et al. Seventh School Proceedings, Poland, 1984, p.185.
2. Bayerl Th. et al. Biochem. Biophys. Acta, 1985, 812, p.437.
3. Hentchel M., Klose G. Biochem. Biophys. Acta, 1985, 812, p.447.
4. Klose G. et al. Chem. Phys. Lipids, 1986, 41, p.293.
5. Балагуров А.М., Горделий В.И., Клозе Г. Сообщение ОИЯИ, P14-87-804, Дубна, 1987.
6. Worchester D.L. Trans. Amer. Cyst. Assoc., 1983, 19, p.37.
7. Балагуров А.М., Горделий В.И. Сообщение ОИЯИ, P14-86-644, Дубна, 1986.
8. Nanahan D.J., Turner M.V., Jayko M.E. J. Biol. Chem., 1951, 192, p.623.
9. Балагуров А.М., Горделий В.И., Ягужинский Л.С. Биофизика, 1986, вып.31, с.31.
10. Балагуров А.М., и др. ОИЯИ 3-84-291, Дубна, 1984.
11. King G.I., Chao M., White N. In: "Neutrons in Biology" /Ed. by Schoenborn V.P./, Plen. Press, New York and London, 1984, p.159.
12. Джекс В. Катализ в химии и энзимологии. И.: Мир, 1972.

Рукопись поступила в издательский отдел
1 июня 1988 года.

Балагуров А.М., Горделий В.И., Клозе Г.
Влияние диэстера гексилфосфоновой кислоты PAB_6
на структуру жидкокристаллических липидных мембран

P14-88-390

На нейтронном дифрактометре проведены эксперименты по изучению влияния диэстера гексилфосфоновой кислоты (PAB_6) на структуру модельной липидной мембраны из общей липидной фракции яичного желтка PL /модельное соотношение $\text{PL} + \text{PAB}_6 = 2:1$ /. Установлено одновременное существование двух фаз с существенно отличающимися постоянными решетки при относительных влажностях $\psi = 15\%$ и $\psi = 60\%$ / $T = 22^\circ\text{C}$ /. При $\psi = 97\%$ наблюдается только одна (L_α) фаза с $d = 48,1 \text{ \AA}$. С использованием дейтерий-меченного эстера и метода разностного фурье-синтеза определены распределения эстера и воды, а также другие структурные параметры мембраны. Показано, что молекулы PAB_6 распределены в основном в липидной области, причем в центральной-углеродной /гидрофобной/ части мембраны величина плотности распределения максимальна.

Работа выполнена в Лаборатории нейтронной физики ОИЯИ.

Сообщение Объединенного института ядерных исследований. Дубна 1988

Перевод О.С.Виноградовой

Balagurov A.M., Gordel'ij V.I., Klose G.
The Influence of Hexane Phosphonic Acid Diester PAB_6
on the Structure of Liquid Crystal Lipid Membranes

P14-88-390

The investigation of the influence of the hexane phosphonic acid diester / PAB_6 / on the model lipid membrane structure from a total lipid fraction of egg /PL/ molar relation of $\text{PL} + \text{PAB}_6$ is 2:1/ has been performed with a neutron diffractometer. The two phase coexistence with a significant difference in the lattice constants at relative humidities $\psi = 15\%$ and 60% / $T = 22^\circ\text{C}$ /. Only one L_α -phase with $d = 48.1 \text{ \AA}$ is observed at $\psi = 97\%$. Using the deuterium labelled esters and the Fourier difference synthesis method, the distribution of PAB_6 and water, and other structure parameters of membranes were determined. It is shown that the molecules of PAB_6 are mainly distributed in the lipid region with maximum value of density distribution in the central carbon /hydrophobic/ part of membrane.

The investigation has been performed at the Laboratory of Neutron Physics, JINR.

Communication of the Joint Institute for Nuclear Research. Dubna 1988