

ЯМР ТА ІЧ-ФУР'Є СПЕКТРОСКОПІЯ ПРОЦЕСІВ ЗЛИТТЯ МЕМБРАН, ІНДУКОВАНИХ ІОНАМИ КАЛЬЦІЮ

Процес злиття ліпосом, сформованих з яйцевого фосфатиділхоліну (ФХ) досліджувався за допомогою ІЧ-Фур'є та ЯМР спектроскопії. Для спостереження за процесом злиття використовувались парамагнітні зсуваючі реагенти (ЗР). Запропоновано експериментальну схему, яка дає можливість одночасно відслідковувати зміни розмірів везикул, змішування їх внутрішніх об'ємів і може бути використана для оцінки динамічних змін у молекулах ліпідів під час процесу злиття мембран. Ті самі зразки досліджувались методом ІЧ-Фур'є спектроскопії для отримання додаткової структурної інформації.

Вступ

Злиття мембран — важливий біологічний процес. При його дослідженні широко застосовують штучні ліпідні мембрани (ліпосоми). Такий підхід дає змогу отримати інформацію про неспецифічні аспекти процесу злиття біомембран, що реалізуються передусім через динамічні зміни у ліпідних молекулах, які функціонують як молекулярні ансамблі. Процеси злиття біологічних мембран опосередковують такі важливі фізіологічні події, як конститутивна секреція, ендцитоз, цитокінез, нейросекреція, ендокринна секреція, злиття генеративних клітин при заплідненні, вірусні інфекції, утворення гігантських клітин при запальних процесах, летальне злиття лімфоцитів, індукованих вірусом імунодефіциту людини тощо.

Запропоновано дві головні гіпотези, що описують механізми злиття мембран — "ліпід-опосередкованого злиття" та "білкового злиття". Перша стверджує необхідність та достатність для злиття лише ліпідного компонента біомембраною. Друга постулює необхідність наявності у складі мембран, що зливаються, певних білкових (пептидних) молекул. Важливо, що феноменологія фізико-хімічної поведінки власне ліпідів під час процесу злиття є універсальною.

Незважаючи на те, що злиття мембран інтенсивно вивчається [1–4], у розумінні цього процесу залишається ще багато нерозв'язаних проблем. Нині застосовують три принципи експериментального дослідження процесу злиття мембран. При реалізації першого з них використовують

методи, в яких визначають зміни (зростання) розмірів везикул. Другий принцип — це спостереження за змішуванням гідрофобних матриксів мембран. Останній принцип ґрунтується на кореляції між процесом злиття та змішуванням внутрішніх об'ємів.

Методи вивчення зміни розміру [5–9] є самими прямими, але вони використовують велику кількість теоретичних наближень і в процесі приготування зразка часто можуть істотно впливати на мембрани. Методи вивчення злиття гідрофобного шару [10–14] надзвичайно чутливі, але значно збуджують об'єкт дослідження, сильно модифікуючи мембрану. Більшість із методів спостереження за перемішуванням внутрішніх об'ємів [15–17] є делікатними, проте багато в чому непрямими. Очевидно, коректні результати можуть бути отримані в результаті використання комбінації трьох вищенаведених принципів дослідження злиття мембран.

Метод ЯМР може бути використано у постановці, в якій реалізуються всі три зазначені принципи на одному й тому самому зразку. Метод є неінвазивним і має можливість використовувати мембрани для спостереження процесу злиття не тільки з макроскопічної точки зору, а й отримати дані з молекулярної структури та динаміки ліпідних молекул у процесі злиття. ^1H , ^{13}C , ^2H ЯМР спектри можуть бути використані для оцінки ліпідної структури і молекулярних властивостей окремих частин ліпідної молекули. ^{14}N і ^{31}P дають можливість отримати подібну інформацію, але тільки для полярних частин фосфоліпі-

дів. У комбінації з іншими методами можна визначити зміни форми/розмірів мембранних утворень та фазові переходи. Те ж саме можна досліджувати на інших ядрах, але в більш екзотичних ситуаціях.

ІЧ-Фур'є спектроскопії також властива перевага неінвазивності, яка підсилена високою чутливістю щодо структурних змін у ліпідних молекулах під час злиття. Два методи можуть застосовуватися разом, що на однаково приготовлених зразках дає можливість отримати додаткову інформацію.

Методи і матеріали

Процес мембранного злиття моделювався за допомогою Ca^{2+} -індукованого злиття середніх за розмірами ліпосом (90–110 нм) з фосфатиділхоліну яєчного жовтка (ФХ) з високим вмістом лізо-форм ліпідів (лізо-ФХ). Застосування високого вмісту лізо-форм у ліпідній суміші призвело до сповільнення процесів злиття, що було вигідно для ІЧ та ЯМР досліджень. Ліпосоми готувались у відповідності з принципами, викладеними в [18]. Розчини ліпідів в органічних розчинниках висушувалися за допомогою роторного випаровувача і гідратувалися H_2O і D_2O , відразу після чого формувалася суспензія мультіламельярних ліпосом інтенсивним перемішуванням. Для отримання суспензії уніламельярних ліпосом вихідна суспензія оброблялася ультразвуком за допомогою ультразвукового диспергатора пестикового чи банного типу. Отримана суспензія центрифугувалася на лабораторній центрифугі при 2000–5000 об./хв з метою осадження великих ліпідних агрегатів та макроскопічних частинок металу з пестика диспергатора. У разі навантаження ліпосом парамагнітними іонами, їх формували у розчинах солі парамагнітних металів у H_2O і D_2O та очищували гел-фільтрацією на колонці з Sephadex-G75. Ліпосоми зберігались при 8 °С протягом доби і використовувались протягом 6–8 годин. Везикули були стабільними з огляду на середній діаметр (у відповідності з даними лазерної кореляційної спек-

троскопії) і зберігали власну замкненість (у відповідності з даними ЯМР) протягом 7 діб.

Характеризація ліпідної суміші

Фосфоліпідні суміші, які використовувались у дослідженнях, були охарактеризовані за допомогою хроматографії. Вміст фосфоліпідів був визначений традиційними методами тонкошарової хроматографії, а жирнокислотний склад було визначено газово-хроматографічно (ГХ) та з використанням ГХ з мас-спектроскопічним детектором. Результати представлені в табл. 1 та табл. 2 відповідно.

Обладнання

ЯМР спектри були зареєстровані на спектрометрі BRUKER CXP-200. ^{31}P спектри було зареєстровано без врахування взаємодії спінів ядер ^{31}P та ^1H .

Розміри частинок визначались методом лазерної кореляційної спектроскопії на оригінальному спектрометрі, сконструйованому і зібраному в Інституті біохімії НАН України (детальний опис див. [19]). Джерелом був He-Ne лазер ($\lambda = 632,8$ нм).

Фур'є-спектри записувались на спектрометрі BRUKER IFS-48. Для деконволюції та обробки спектрів використовувалась програма OPUS 2.2. Всі експерименти проводились при однаковій температурі. Зразки були приготовлені з суспензії свіжих ліпосом і поміщались у прозору в 14 області електромагнітного спектра кювету з CaF_2 .

Результати й обговорення

Застосуваннязсуваючихреагентів. За допомогою ЯМР методу можна визначити хімічний зсув ядра, що залежить від хімічного оточення. При цьому можна розділити сигнали від внутрішнього (I) та зовнішнього (O) моношарів замкненої мембрани при введенні парамагнітних зсуваючих реагентів (SR), які істотно модифікують локальне магнітне поле навколо ядра, з яким вони безпосередньо контактують. Магнітне поле

Таблиця 1. Фосфоліпідний склад яйцевого фосфатиділхоліну

Фосфоліпіди	Склад, %
Фосфатиділхоліни	88,79
Лізо-фосфатиділхоліни	6,75
Сфінгомієліни	3,89
Фосфатиділетаноламіни	0,19

біля ядра буде відрізнитись при наявності парамагнітного йону, що при аплікації SR лише з одного боку замкненої везикули проявиться в розщепленні відповідних ліній в спектрі на дві частини: лінію від ядер, що знаходяться у контакті з парамагнітним йоном та лінію від таких, для яких зазначений контакт відсутній. Після введення парамагнітного йону і отримання розщеплення можна визначити відношення інтегральних інтенсивностей ліній від зовнішнього та внутрішнього моношарів (О/І-параметр). На останній впливає процес злиття мембран. В якості зсуваючих реагентів ми досліджували хлориди і нітрати Pr, Nd, Dy, Ho, Sm, Eu, Er і Y в концентрації від 0,1 до 10 мМ. Зсув протонних та фосфорних резонансів при застосуванні Pr, Dy, Eu та Y надає, очевидно, задовільне розділення сигналів $N(CH_3)_3$ та фосфатних залишків у спектрах. При використанні інших SR псевдоконтактний парамагнітний зсув супроводжується значним уширенням ліній від контактуючих з SR ядер. Для ліпосом, отриманих з яєчного ФХ з

високим вмістом лізо-ФХ, показано, що додавання 5 мМ $Pr(NO_3)_3$ не призводить до повного розділення. Це відбувається через накладання ліній для протону при $\delta = 3,31$ м. ч., який віднесено до окислених аліфатичних протонів. Тільки при концентрації 7,5 мМ і вище лінії стають розділеними.

Метод двох зсуваючих реагентів. На О/І-параметр впливає процес злиття. Так, його зменшення корелює зі зміною фізичних розмірів уніламельярних везикул. Ми використовували О/І параметр, виведений з ^{31}P ЯМР спектрів, час спінграткової релаксації (T_1) для фосфатних груп фосфоліпідів, отриманих з 1H ЯМР і ^{31}P ЯМР спектрів, та діаметр везикул згідно з результатами лазерної кореляційної спектроскопії. Зазначені параметри очевидно корелюють між собою (мал. 1, 2). Наявність такої кореляції дає можливість слідкувати за процесом злиття мембран, вимірюючи параметри спектра ЯМР.

Наведені вище міркування спонукали нас до ідеї розробити методику вивчення злиття мемб-

Таблиця 2. Склад жирних кислот в яйцевому фосфатиділхоліні

Жирні кислоти	Час виходу, хв.	Склад, %
Докозогексаєнова	118,0	0,464
Бетаїнова	90,5	0,267
Арахідонова	87,5	2,409
Генейкозанова	83,5	0,328
Ейкозанова	80,0	0,315
Ліноленова	70,0	13,421
Октадеканова	66,8	28,112
Стеаринова	64,8	17,840
Гептадеканова	57,7	0,340
Палмітолетинова	54,0	4,991
Палмітинова	51,0	29,085
Пентадеканова	43,6	0,107
Міристинова	36,5	0,111
Всього невідомих	109,4;73,1	2,210

ран, яку схематично наведено на мал. 3. Така схема експерименту надала нам можливість одночасно спостерігати за: 1) зміною розмірів везикул (еволюція O/I-параметра); 2) змішання внутрішніх об'ємів ліпосом (перерозподіл інтенсивностей резонансів відрізних моношарів мембран); 3) контролювати стабільність замкненості везикул (абсолютна інтенсивність сигналу від зовнішніх моношарів, за умови непроникнення SR через мембрану, залишається сталою); 4) спостерігати зміни в рухливості окремих частин молекул ліпідів, викликаних додаванням фузо-

гену (вимірювання T^1 для ліній фосфатних залишків (спектри ^{31}P ЯМР), та ліній від $(\text{CH}_2)_n$, CH_3 та $\text{N}(\text{CH}_3)_3$ протонів у спектрах ^1H ЯМР; 5)якісно детектувати агрегацію везикул (у випадку, коли зовнішні сигнали уширюються, але ширина сигналів від внутрішніх моношарів залишається сталою).

Метод Фур'є спектроскопії. Спектри ліпосомної суспензії в H_2O і D_2O (рис. 4) при $\text{pH} = 7,4$ та 27°C фіксувались протягом 0,5 години. Реєстрація одного спектра тривала не більше кількох секунд. Зміни у спектрах за цей час не були зареєстровані. Після додавання CaCl_2 в концентрації 2–10 мМ до вихідного зразка, спектри були за-

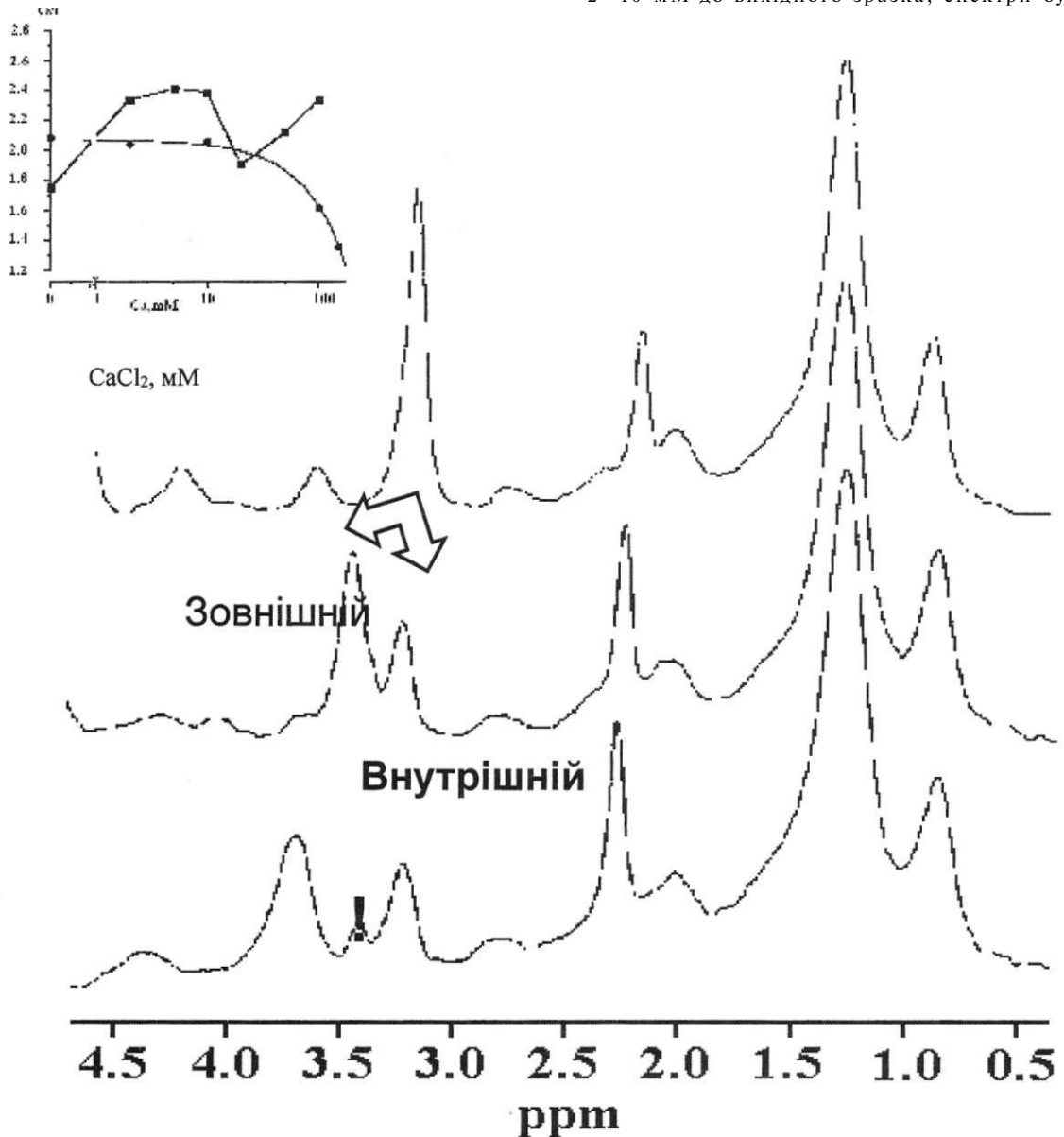


Рис. 1. Зміни у ^1H ЯМР спектрах відповідно до додавання SR. Зверху вниз: ^1H ЯМР спектр везикул з яйцевого лецитину з високим вмістом лізо-ФХ; додавання 5мМ $\text{Pr}(\text{NO}_3)_3$; додавання 7,5 мМ $\text{Pr}(\text{NO}_3)_3$. ! — відмічено ^1H резонанс від окислених аліфатичних груп; стрілки вказують розщеплення резонансу метильних груп у $\text{N}(\text{CH}_3)_3$; на вставці показано зменшення O/I інтегральних інтенсивностей в залежності від концентрації CaCl_2

писані знову. При цьому спостерігався ряд особливостей в області валентних CH_2 ($2850\text{--}2920\text{ см}^{-1}$), $\text{C}=\text{O}$ ($1750\text{--}1720\text{ см}^{-1}$) і деформаційних CH , ($1480\text{--}1420\text{ см}^{-1}$) коливань. Так, смуги CH_2 в області валентних коливань зсуваються на 2 см^{-1} у високочастотну область. Подібна поведінка в вивченні ліпідних фазових переходів

може інтерпретуватись як збільшення вмісту гош-конформерів у вуглеводневих областях ліпідів [20,21]. Також ряд змін спостерігається в смугі $\text{C}=\text{O}$ валентних коливань, що у вихідному зразку знаходилась на 1734 см^{-1} . При наявності кальцію проявляється багатокомпонентна структура смуги $\text{C}=\text{O}$ ($1742,1\text{ см}^{-1}$, $1725,3\text{ см}^{-1}$, $1709,8\text{ см}^{-1}$)

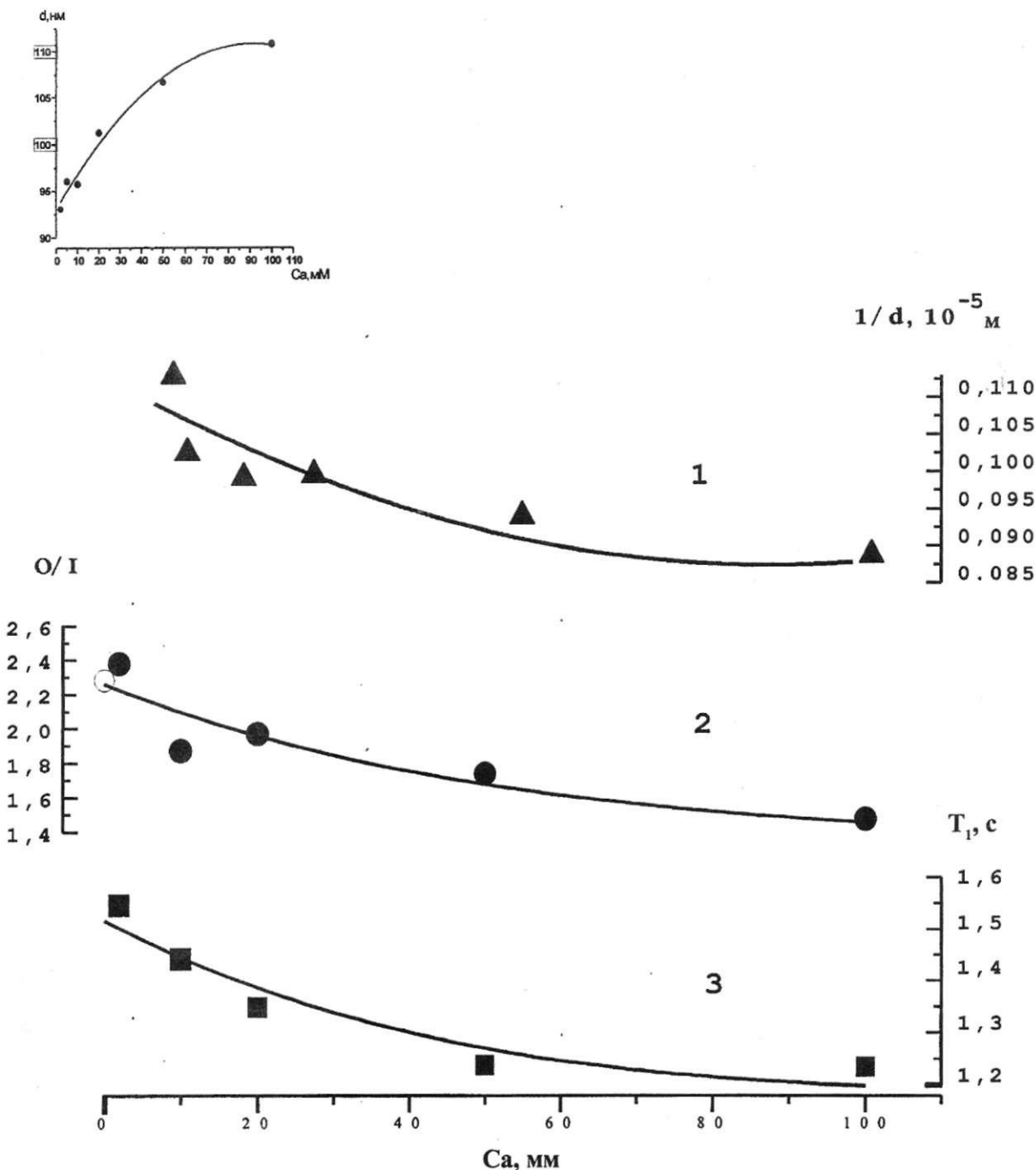


Рис. 2. Зміни розмірів везикул та відповідні зміни ЯМР параметрів в залежності від концентрації CaCl_2 .

1 — $1/d$ (d — діаметр везикул) згідно з лазерною кореляційною спектроскопією (вставка: залежність d від концентрації CaCl_2); 2 — зменшення O/I інтегральних інтенсивностей, розрахованих зі спектрів ^1H -ЯМР;

3 — зміни у значеннях часу спин-граткової релаксації ^{31}P

та її уширення зі збільшенням вкладу низькочастотної складової на $1725,3 \text{ см}^{-1}$ (рис.5). Таку ситуацію можна пояснити збільшенням вкладу воднево-зв'язаних C=O зв'язків [21,22]. Також було зареєстровано зміни у формі смуги деформаційного CH_2 коливання, що може так само бути на-

слідком збільшення неупорядкованості в упаковці ланцюга. Всі спостережувані зміни стають сильнішими зі збільшенням концентрації CaCl_2 і вказують на зміни в вуглеводневих ланцюгах ліпідних молекул, а також на перебудову сітки водневих зв'язків.

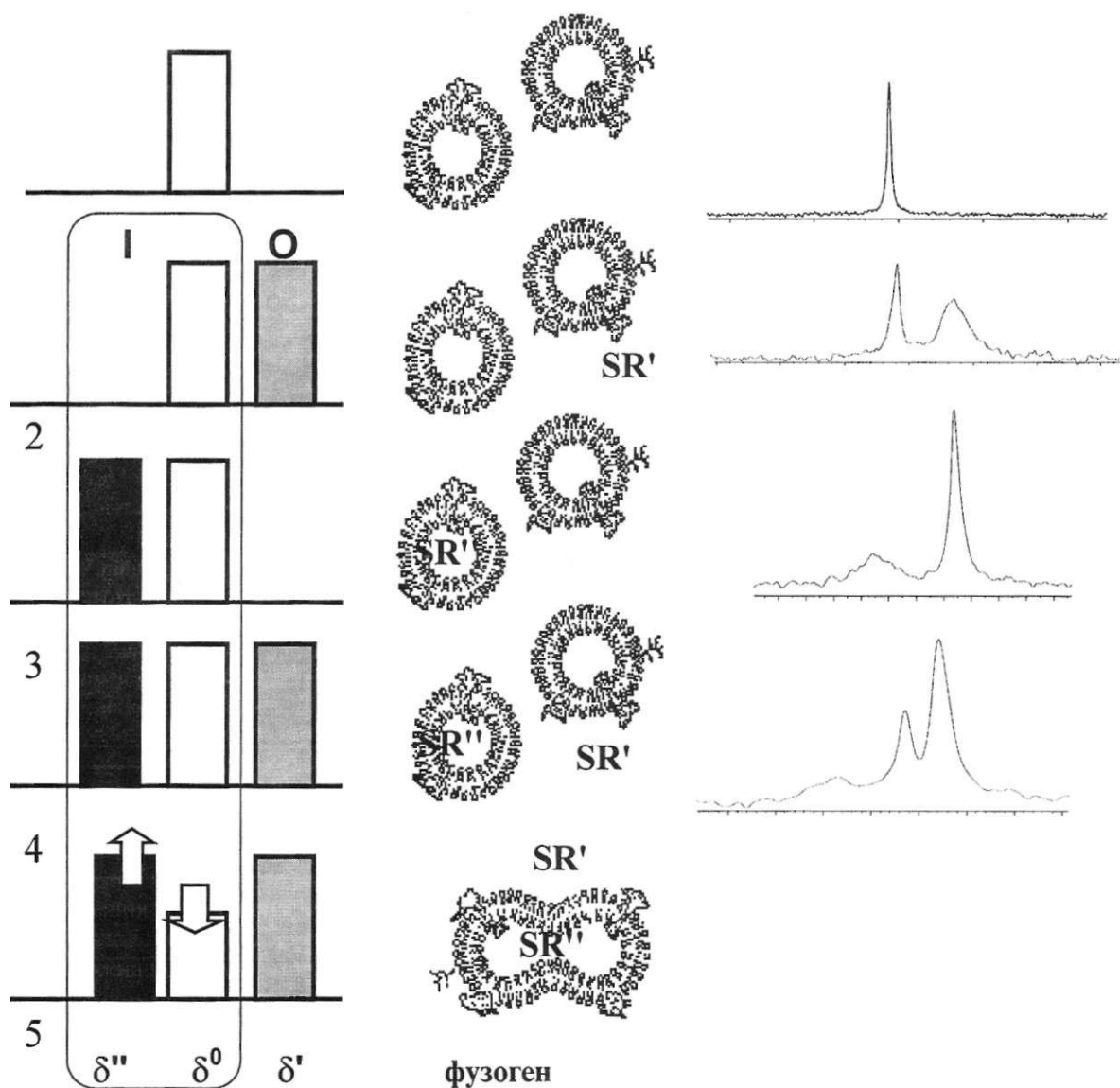


Рис. 3. Принципова схема запропонованого підходу до вивчення злиття мембран.

У лівій колонці показано загальний вигляд експериментальних спектрів, малюнки у середині демонструють вигляд зразків. Однаковим кольором зображено резонансні лінії та моношари, яким вони відповідають. У правій колонці наведено реальні ^{31}P -ЯМР спектри. Згори донизу: 1 — вихідна суспензія везикул; 2— додавання до суспензії першого зсуваючого реагента (Y^{3+}) — SR' ; 3— везикули навантажені другим зсуваючим реагентом (Pr^{3+}) — SR'' , після хроматографічного відмивання парамагнітних іонів ззовні везикул; 4— змішування ліпосом із додаванням першого зсуваючого реагента та ліпосом, навантажених другим зсуваючим реагентом; 5— спостережені тенденції змін відповідно до додавання фузогену (CaCl_2). Спектри для етапів у загальних рисах 4 та 5 відрізняються

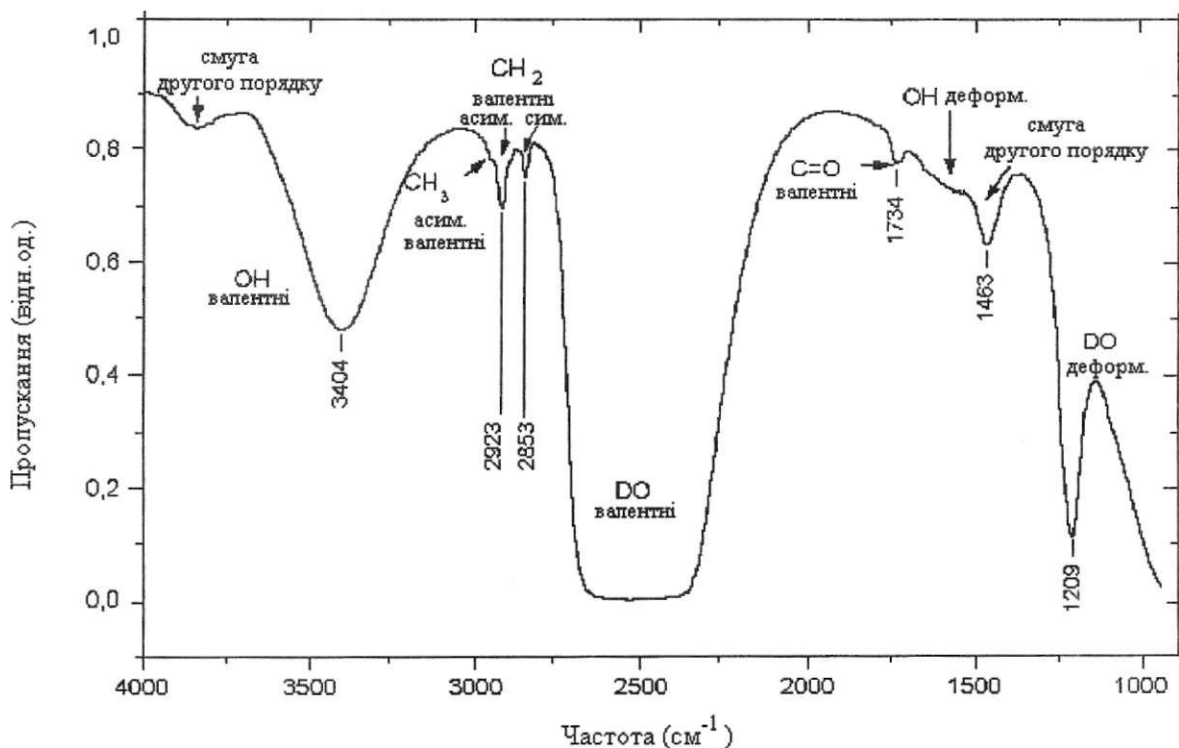


Рис. 4. Спектри ФП-ІЧ суспензій везикул у D₂O та віднесення коливань до молекулярних груп, яким вони відповідають

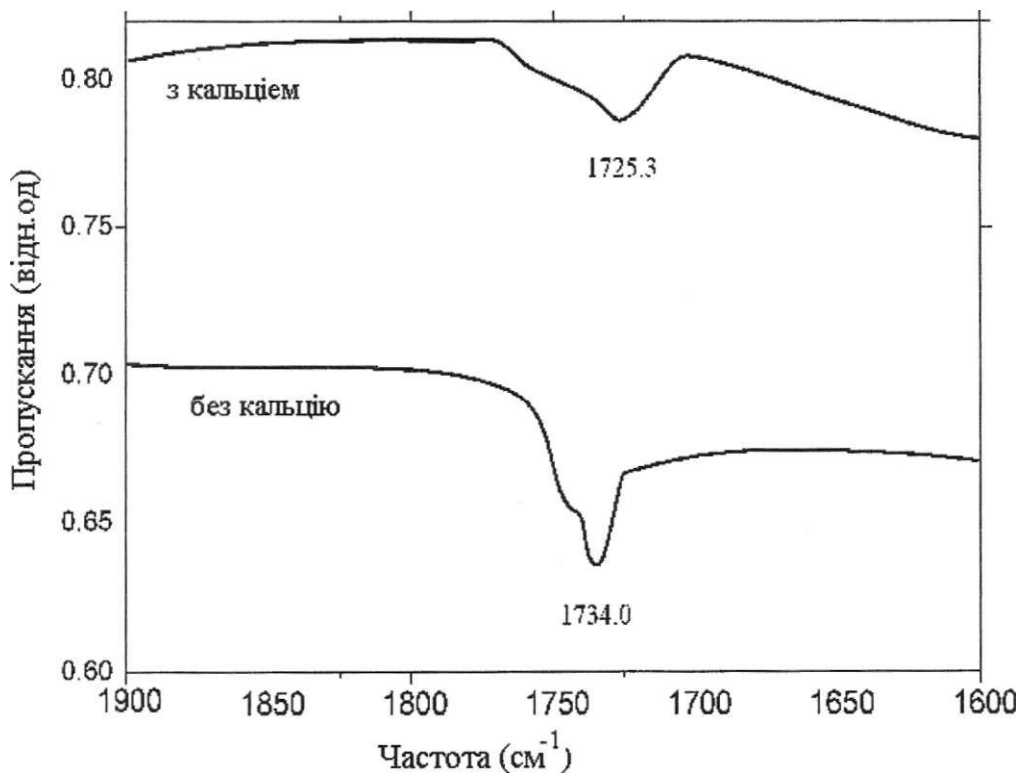


Рис. 5. Трансформація смуги валентного коливання C=O у суспензії везикул у D₂O після додавання фузогену (CaCl₂)

1. Poste G., Allison A. C. Membrane fusion reaction: a theory // *J. Theor. Biol.*— 1971 — Vol. 32.— N 1.— P. 165—184.
2. Verkleij A. J., Leunissen-Bijvelt J., de Kruijff B., Hope M., Cullis P. R. Non-bilayer structures in membrane fusion // In: *Proceedings Ciba Found. Symp.*— 1984.— Vol. 103.— P. 45—59.
3. Düzgüne N. Membrane fusion // *Subcell. Biochem.*— 1985.— Vol. 11.— P. 195—286.
4. Pecheur E. I., Sainte-Man'e J., Bienven E. A., Hoekstra D. Peptides and membrane fusion: towards an understanding of the molecular mechanism of protein-induced fusion // *J. Membr. Biol.*— 1999.— Vol. 167.— N 1.— P. 1—17.
5. Attwood D., Saunders L. A light-scattering study of ultrasonically irradiated lecithin sols // *Biochem. et Biophys. Acta.*— 1965.— Vol. 98 — P. 344—350.
6. Barenholz Y., Gibbes D., Litman B. J., et. al. A simple method for the preparation of homogeneous phospholipid vesicles // *Biochemistry.*— 1977.— Vol. 16.— P. 2806—2810.
7. Olson F., Hunt C. A., Szoka F. C., et. al. Preparation of liposomes of defined size distribution by extrusion through polycarbonate membranes // *Biochem. et Biophys. Acta.*— 1979.— Vol. 557 — P. 9—23.
8. Bugelski P. J., Sowiński J. M., Kirsh R. L. *Liposomes. A practical approach*, (New R. R. C ed.) Oxford: IRL Press, 1989.
9. Payne N. I., New R. R. C. *Liposomes. A practical approach*, (New R. R. C ed.) Oxford: IRL Press,— 1989.
10. Maeda T., Onishi S.-J. Membrane fusion. Transfer of phospholipid molecules between phospholipid bilayer membranes // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*— 1974.— Vol. 60.— P. 1509—1516.
11. Struck D. K., Hoekstra D., Pagano R. E. Use of resonance energy transfer to monitor membrane fusion // *Biochemistry.*— 1981— Vol. 20.— P. 4093—4099.
12. Papahadjopoulos D., Hui S., Vail I. W., Poste G. Studies on membrane fusion. I. Interactions of pure phospholipid membranes and the effect of myristic acid, lysolecithin, proteins and dimethylsulfoxide // *Biochem. et Biophys. Acta.*— 1976,— Vol. 448,— P. 245—264.
13. Miller C., Racker E. Fusion of phospholipid vesicles reconstituted with cytochrome c oxidase and mitochondrial hydrophobic protein // *J. Membrane Biol.*— 1976.— Vol. 26.— P. 319—333.
14. Hoekstra D., Düzgüne N. Lipid mixing assays to determine fusion in liposome systems // *Methods Enzymol.*— 1993.— Vol. 220.— P. 15—32.
15. Hoekstra D., Yaron A., Carmel A., Scherphof G. Fusion of phospholipid vesicles containing a trypsin-sensitive fluorogenic substrate and trypsin: a new method to study membrane fusion activity in a model system // *FEBS Lett.*— 1979.— Vol. 106.— P. 176—180.
16. Wilschut J., Papahadjopoulos D. Ca²⁺-induced fusion of phospholipid vesicles monitored by mixing of aqueous contents // *Nature.*— 1979.— Vol. 281,— P. 690—692.
17. Düzgüne N., Wilschut J. Fusion assays monitoring intermixing of aqueous contents // *Methods Enzymol.*— 1993.— Vol. 220.— P. 3—14.
18. Hauser H. O. The effect of ultrasonic irradiation on the chemical structure of egg lecithin // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*— 1971,— Vol. 45.— P. 1049—1055.
19. Левчук Ю. Н., Осокин В. М. Техника средств связи // 1989,— Т. 3.— С. 72—78.
20. Mantsch H. H. *Spectroscopy of Biological Molecules*, (Sandorfy C. and Theophanides T., eds.) Dodrecht: Reidel, 1984.
21. Czeslik C., Reis O., Winter R., Rapp G. Effect of high pressure on the structure of dipalmitoylphosphatidylcholine bilayer membranes: a synchrotron-X-ray diffraction and FT-IR spectroscopy study using the diamond anvil technique // *Chem. Phys. Lipids.*— 1998,— Vol. 91.— P. 135—144.
22. Le Bihan T., Pezolet M. Study of the structure and phase behavior of dipalmitoylphosphatidylcholine by infrared spectroscopy: characterization of the pretransition and subtransition // *Chem. Phys. Lipids.*— 1998,— Vol. 94,— P. 13—33.

Afonin S. E., Dovbeshko G. I.

FT-IR AND NMR OBSERVATION OF CALCIUM INDUCED MODEL MEMBRANE FUSION PROCESS

Process of fusion of phospholipid vesicles formed from egg phosphatidylcholine (PC) with high concentration of lyso-lipids have been investigated with FT-IR and NMR spectroscopy. Double shift reagent assay was applied to assess fusion with regard to behavior of different membrane leaflets. Assay is capable of observing vesicles size changes, inner volume mixing and vesicles leakage, and could be potentially used to assess dynamical changes of lipid molecules. The same sample preparations could be studied with FT-IR, supplying information additional to NMR. Up to 6,75 % lyso-PC content caused slowing of the Ca²⁺ fusion process to the minutes time-scale.