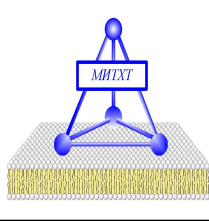


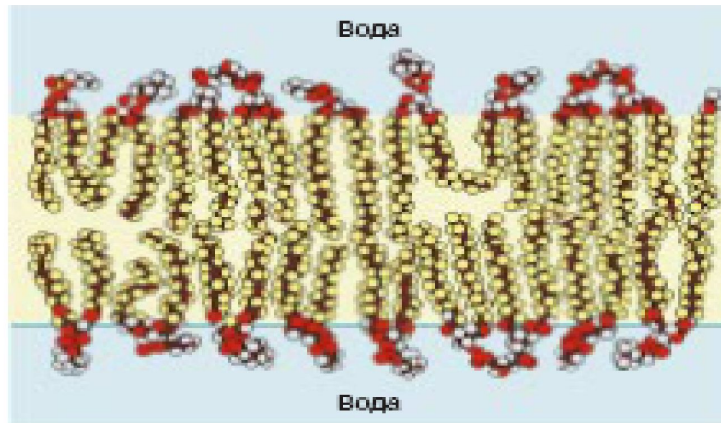
Фазовые переходы в мембранах. Лиотропный мезоморфизм липидов

- Полиморфизм липидов в водной среде
- Лиотропный мезоморфизм
- Критический параметр упаковки липидов
- Методы изучения липидного полиморфизма
- Биологическое значение полиморфизма



Фазовые переходы липидов в мембранах

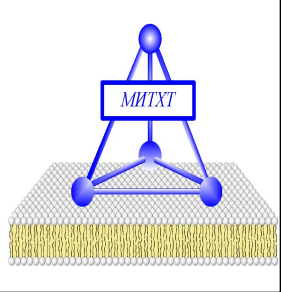
В водной среде липидные структуры ведут себя как **анизотропные жидкости (жидкие кристаллы)**, обладающие упорядоченностью.



Такие структуры обладают свойствами:

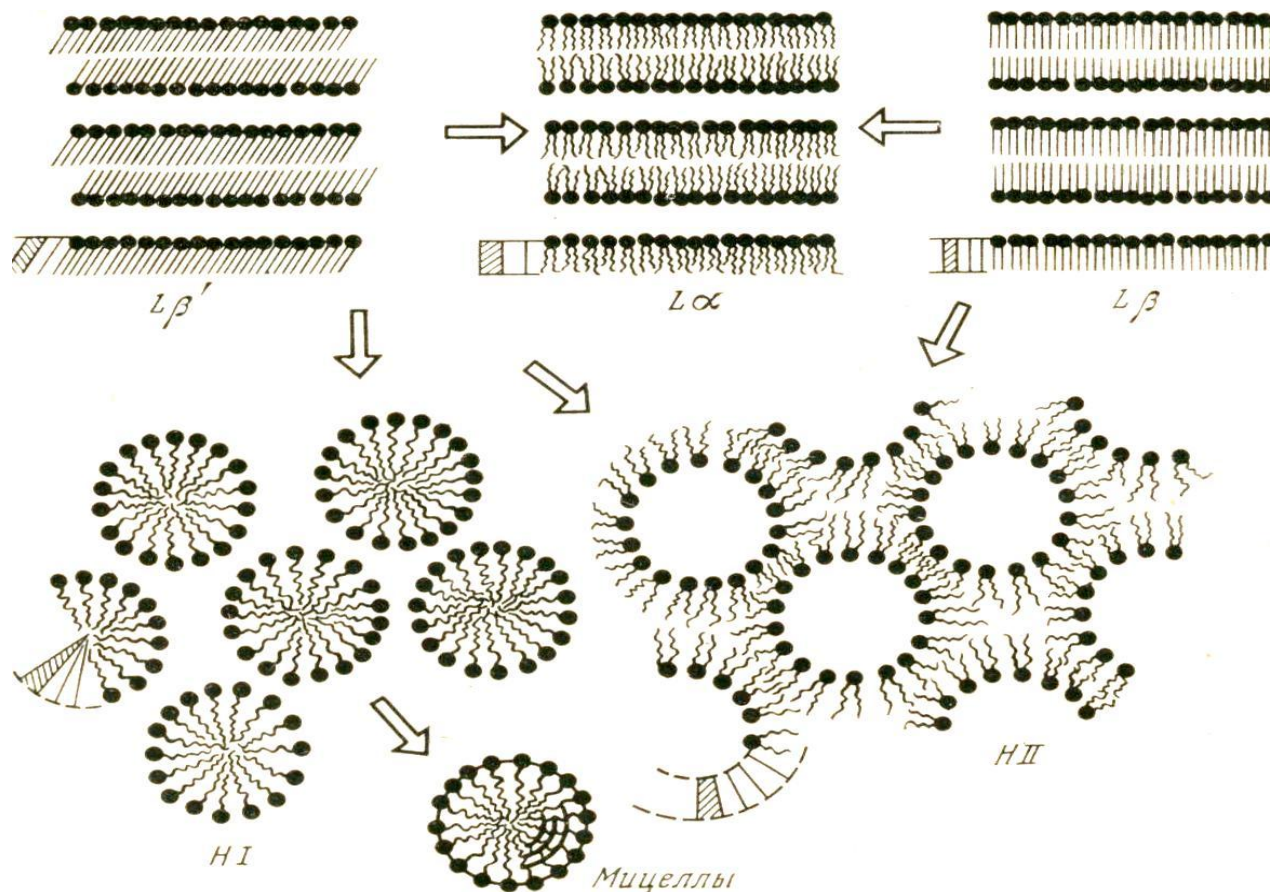
- **термотропного мезоморфизма** (зависимость фазового состояния от температуры).
- **лиотропного мезоморфизма** (зависимость фазового состояния от степени гидратации),

Лиотропный и термотропный мезоморфизм связаны между собой.



Лиотропные жидкие кристаллы

образуются при смешении двух веществ, одно из которых является растворителем (липид-вода)

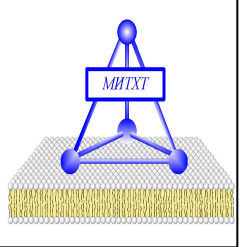


Lβ – ламеллярная гелевая мезофаза;

Lα – ламеллярная жидко-кристаллическая мезофаза;

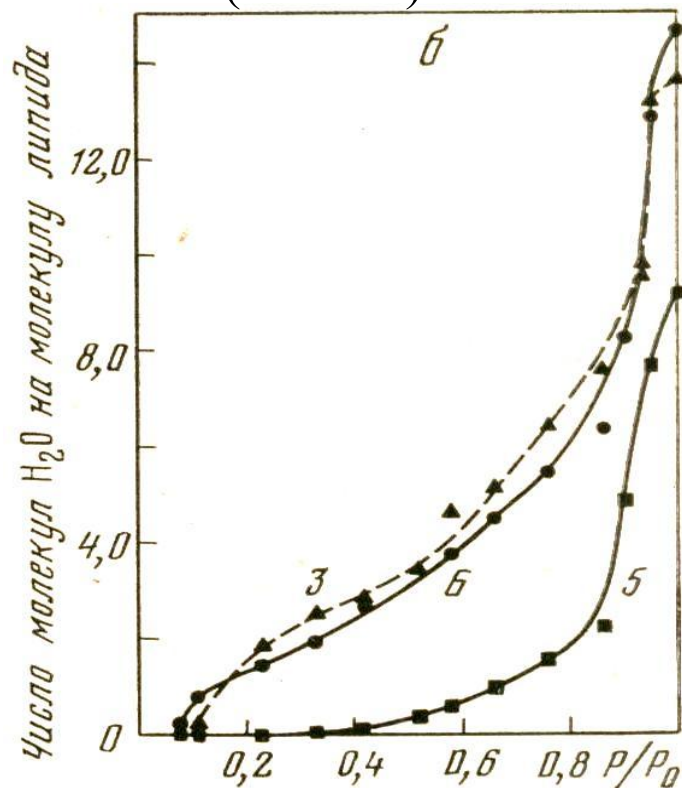
HI – нормальная гексагональная мезофаза;

HII – обращенная гексагональная мезофаза.



Гидратация липидов

Адсорбционные изотермы липидов
($T=22^{\circ}\text{C}$)



P/P_0 — относительное давление паров воды
(P_0 — давление насыщенного пара)

3 — яичный фосфатидилхолин (я-ФХ)

5 — яичный фосфатидилэтаноламин (я-ФЭ)

6 — смесь я-ФХ/я-ФЭ (1:1 моль/моль)

липид

+ Вода [мало]

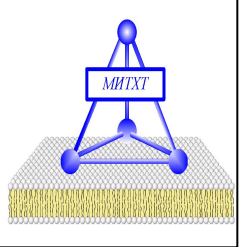
гидратированный липид

+ Вода

модификация полярной «головы»
липид: увеличение объема;
ослабление водородных связей

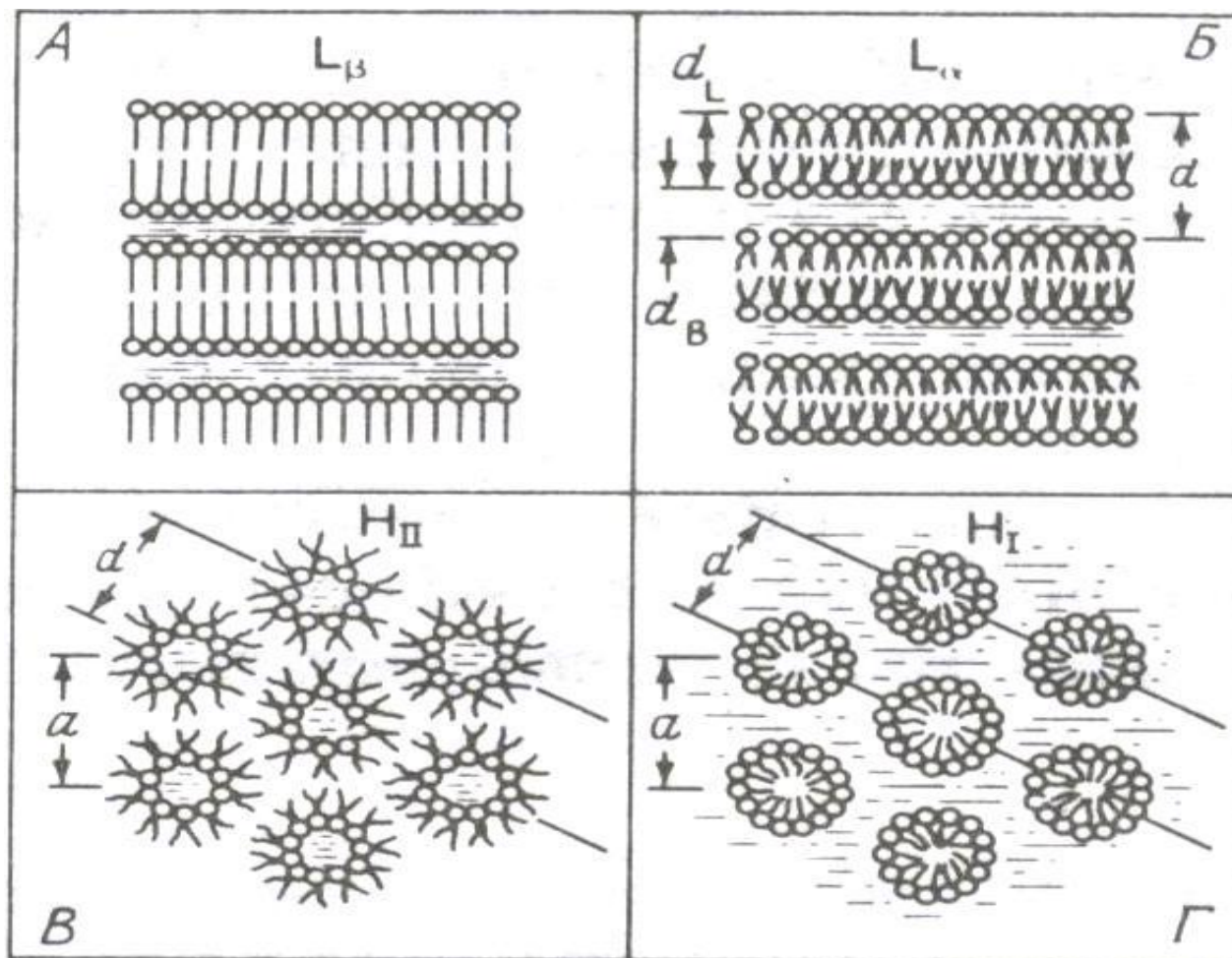
+ Вода

гидратированный липид
+ свободная вода

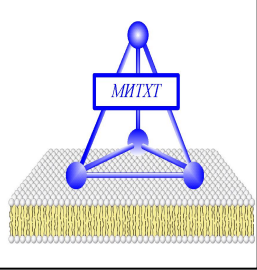


Лиотропный полиморфизм фосфолипидов

Полиморфизм – способность липидов образовывать в растворе агрегаты различной структуры



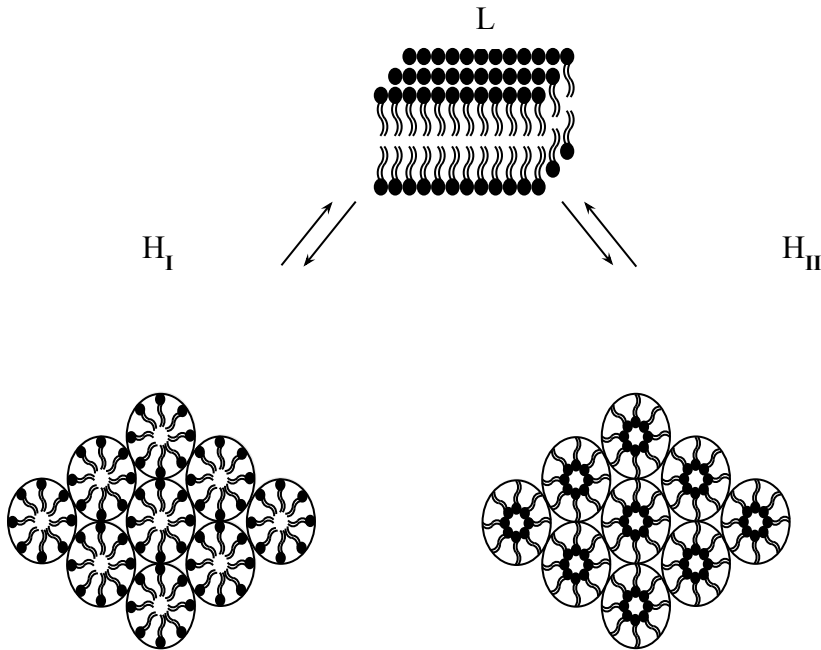
Фаза = f (Сфл, Р, Т, I, рН)



Фазовые переходы $L \leftrightarrow H$

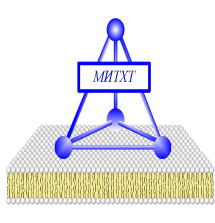
Гексагональные фазы

- **H_I** - цилиндрические структуры, поверхность которых образована полярными головками липидов и контактирует с водой.
- **H_{II}** - цилиндрические структуры, в которых полярные группы обращены внутрь цилиндра и формируют водный канал, поверхность цилиндров гидрофобна.



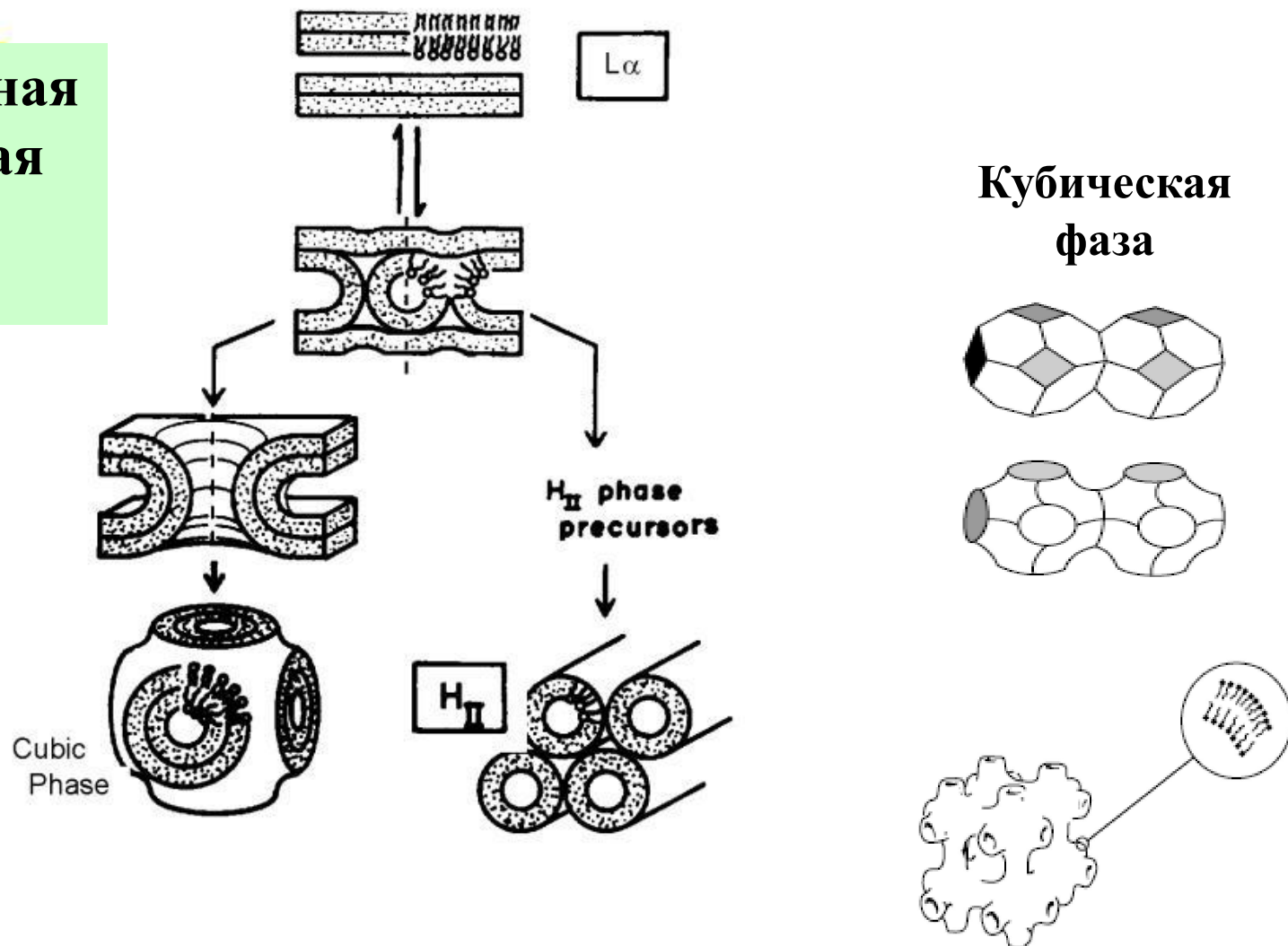
Для природных липидов
характерна **гексагональная
структура H_{II}**

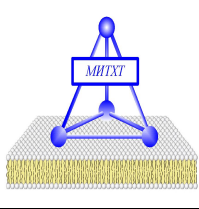
Цилиндры **H_I** и **H_{II}** упакованы по
типу **гексагональной решетки**.



Фазовые переходы бислоем – не бислоем

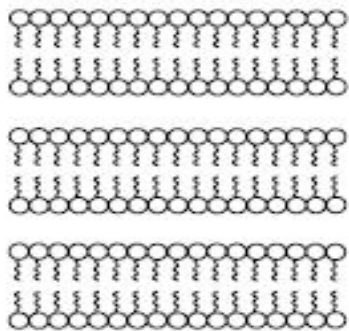
Гексагональная
и кубическая
фазы





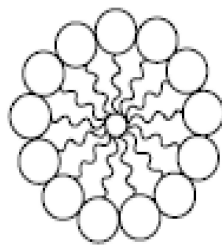
Липидные агрегаты в воде

Ламеллярная фаза

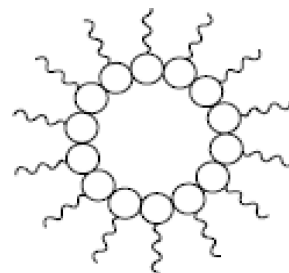


Бислой

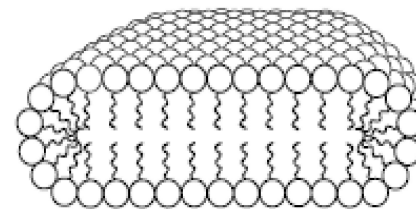
Мицеллярная фаза



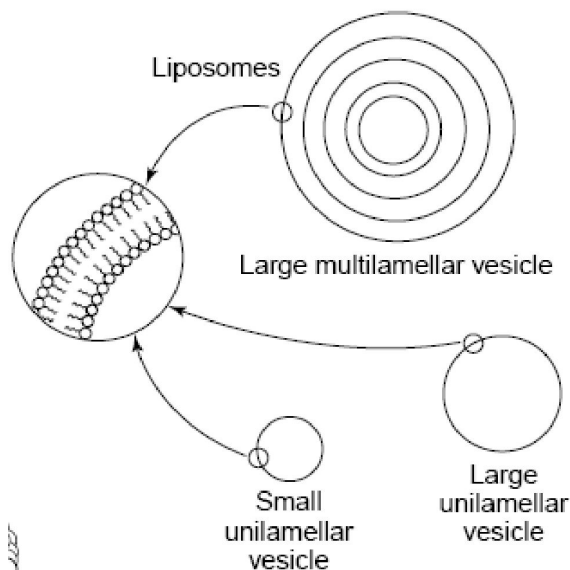
Мицеллы



Обращенные
мицеллы

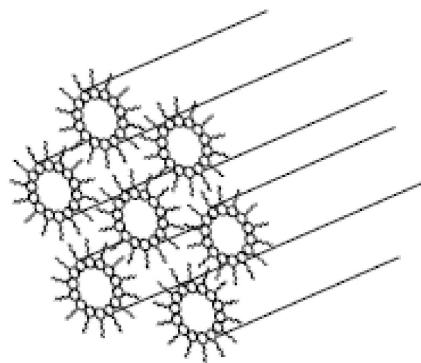


Дискообразные
мицеллы, бицеллы

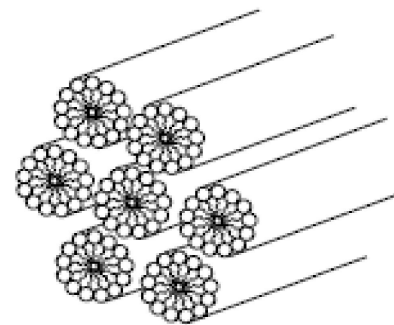


ЛИПОСОМЫ

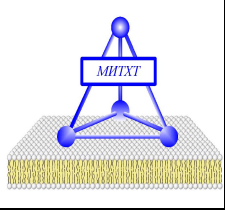
Гексагональная фаза



H_{II} - инвертированная



H_I



Взаимосвязь лиотропного и термотропного мезоморфизма липидов в мембране

Температура фазового перехода гель-жидкий кристалл

Тф.п. зависит от **содержания H_2O** в системе:

- Тф.п. достигает **min** значения при увеличении содержания H_2O в системе
- При $T > T_{ф.п.}$ в случае недостатка H_2O в системе липиды могут находиться в упорядоченном состоянии

Фазовые диаграммы отражают эту взаимосвязь:

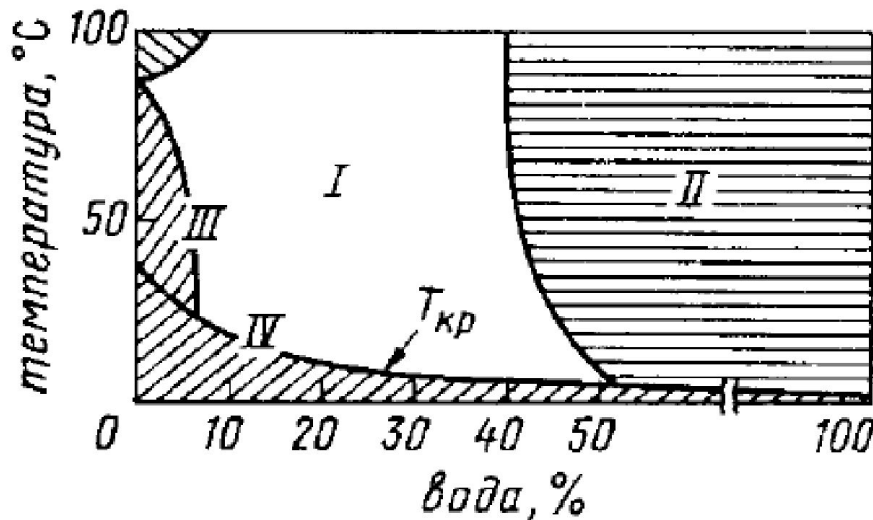
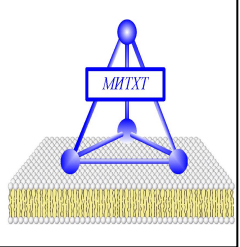
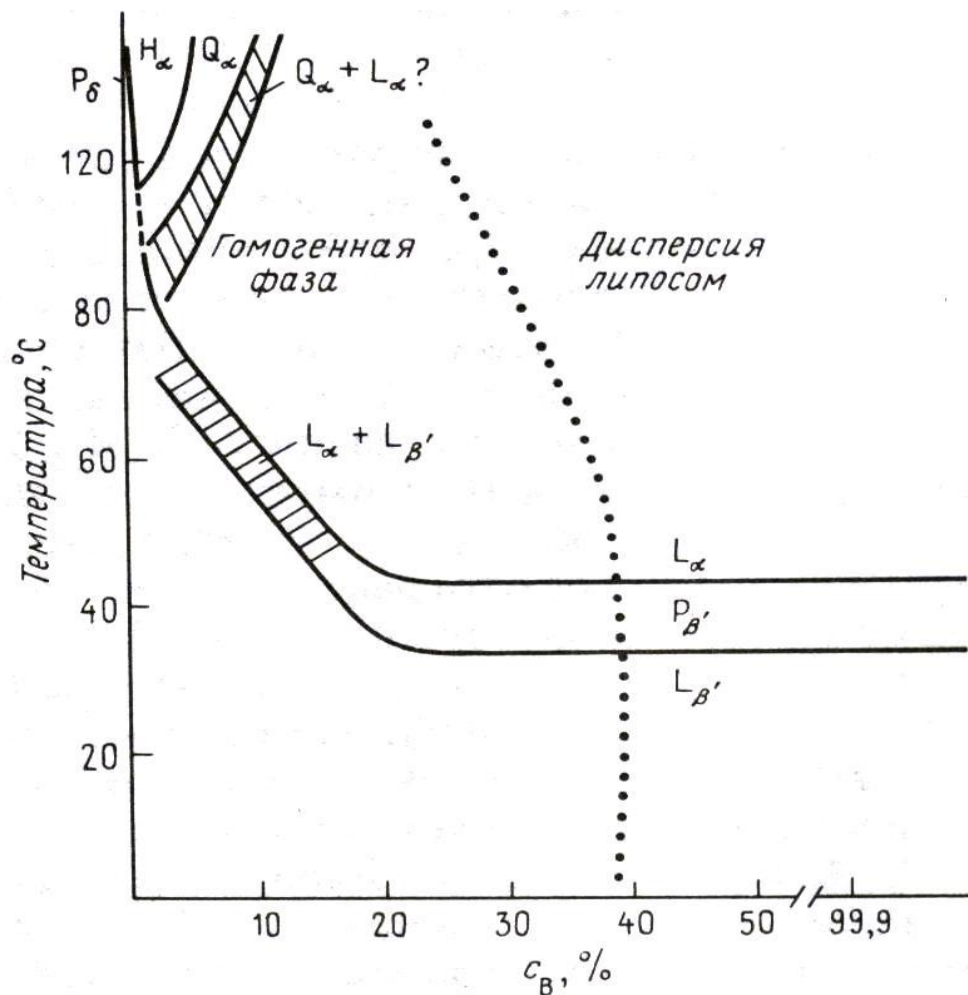
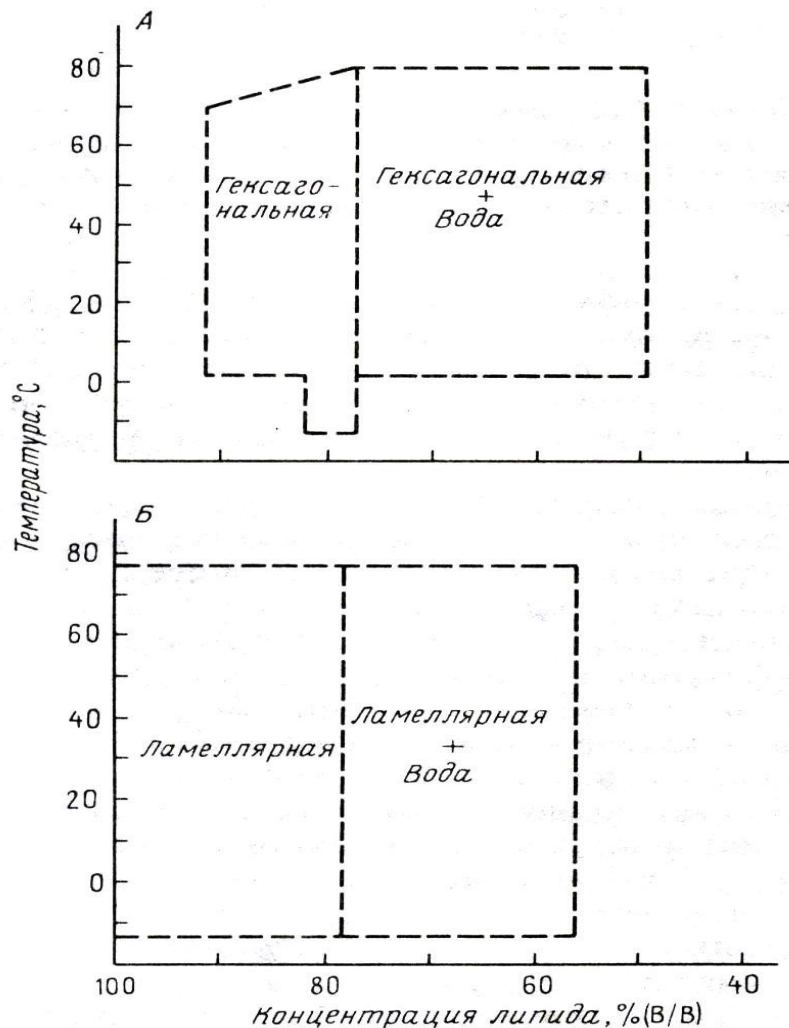


Рис. 21. Фазовая диаграмма смеси яичного лецитина с водой

I – жидкокристаллическое состояние, бислой; II – двухфазная система: вода-бислойные структуры; III – область сосуществования ламеллярных и гексагональных структур; IV – гель. $T_{кр}$ – кривая температуры фазового перехода.

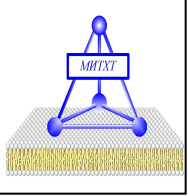


Фазовые диаграммы – однокомпонентных водно-липидных систем



Дипальмитоилфосфатидилхолин в воде

А – моногалактозилдиглицерид,
Б - дигалактозилдиглицерид



Критический параметр упаковки липидов

Структура полиморфной фазы (мезофазы) определяется **динамической формой молекулы липида.**

- Геометрические размеры молекул липидов позволяют предсказать, какие структуры будут образовывать в водной фазе данные липиды.
- Геометрические размеры молекул липидов описывает **критический параметр упаковки:**

$$v/(l \cdot S_o)$$

v/l – площадь поперечного сечения углеводородной области молекулы (v – молекулярный объем углеводородной области молекулы, l – максимальная длина углеводородной цепи),
 S_o – площадь поверхности для размещения полярной головки липида.

Критический параметр упаковки липидов

Пример расчета КПУ для сферических мицелл радиусом R ,
содержащих M молекул.

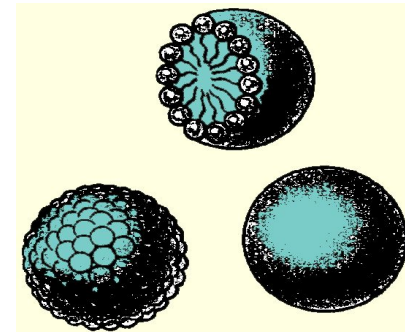
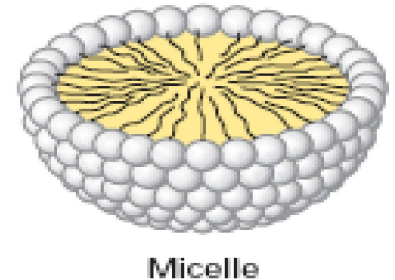
Полная поверхность мицеллы - $M \cdot S_0 = 4\pi R^2$

Полный объем мицеллы - $M \cdot v = \frac{4}{3}\pi R^3 \rightarrow$

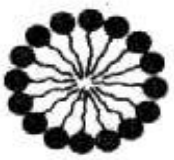
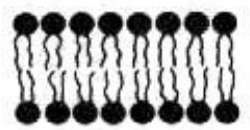
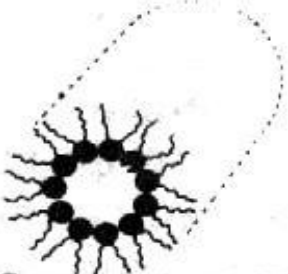
Радиус мицеллы R - $R = 3v/S_0$.

Т.к. радиус мицеллы не может быть больше l ($R \leq l$),
условие упаковки липидов в сферические мицеллы :

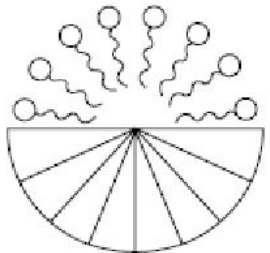
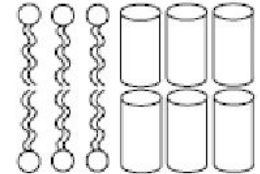
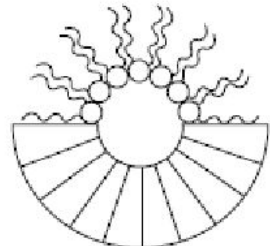
$$V/(l \cdot S_0) \leq 1/3$$



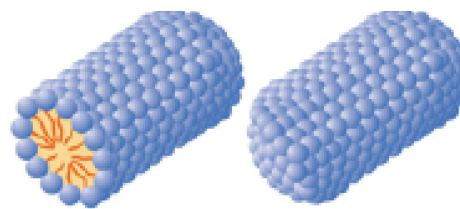
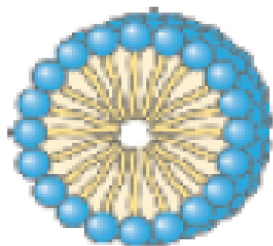
Полиморфные фазы, форма молекул и КПУ

Липид	Фаза	Форма молекулы	Критический параметр упаковки (v/lS_0)
Лизофосфолипиды Детергенты	 Мицеллярная	 Перевернутый конус	$< 1/3$ (Сфера) От $1/3$ до $1/2$ (Глобулярные структуры; стержни)
Фосфатидилхолин Сфингомелин Фосфатидилсерин Фосфатидилинозитол Фосфатидилглицерол Фосфатидная кислота Кардиолипин Дигалактозилдиглицерид	 Бислойная	 Цилиндр	$1/2 - 1$
Фосфатидилэтаноламин (ненасыщенный) Кардиолипин - Ca^{2+} Фосфатидная кислота - Ca^{2+} (pH < 6,0) Фосфатидная кислота (pH < 3,0) Фосфатидилсерин (pH < 4,0) Моногалактозилдиглицерид	 Гексагональная (H _{II})	 Конус	> 1

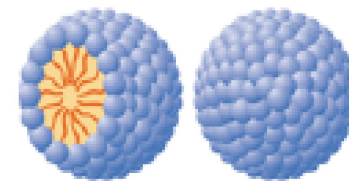
Полиморфные фазы и форма молекул

Species	Shape	Organization	Phase
Soaps Detergents Lysophospholipids	 Inverted cone	 Micelles	Isotropic Hexagonal 1
Phosphatidylcholine Phosphatidylserine Phosphatidylinositol Sphingomyelin Dicetylphosphate DODAC	 Cylinder	 Bilayer	Lamellar (Cubic)
Phosphatidylethanolamine Phosphatidic acid Cholesterol Cardiolipin Lipid A	 Cone	 Reverse micelles	Hexagonal 2

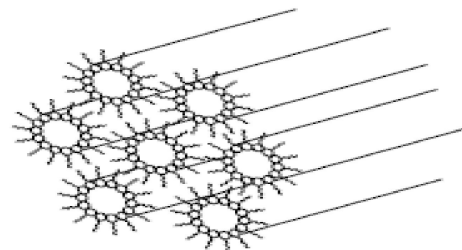
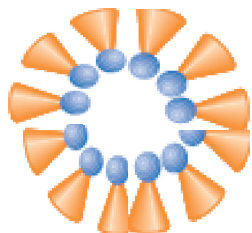
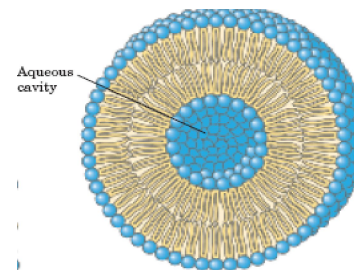
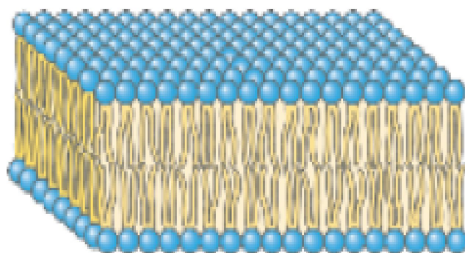
Полиморфные фазы и динамическая форма молекул липидов

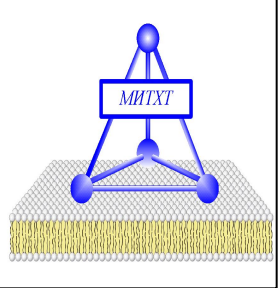


Цилиндрические мицеллы



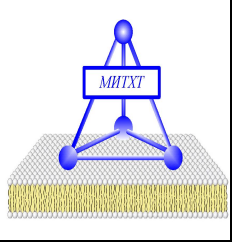
Сферические мицеллы





Методы изучения липидного полиморфизма

- ЯМР – спектроскопия**
- Электронная микроскопия**
- Дифракционные методы**

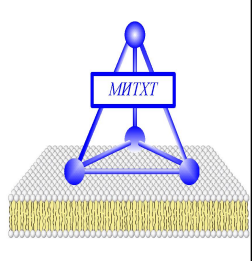


Метод ^{31}P ЯМР

- **ФЛ – основные структурные элементы бислоя биомембран.**
- **ФЛ содержат, по крайней мере, один атом Р в полярной части молекулы (ФХ, ФЭА и др.).**
- **Некоторые ФЛ содержат несколько атомов Р (ДФГ, ФИ).**
- **Атом ^{31}P является идеальной природной ЯМР-меткой – возможность изучения природных и модельных мембран методом ^{31}P ЯМР.**

Достоинства метода ^{31}P ЯМР

- **Широкий диапазон химических сдвигов (700 м.д.)**
- **Высокая чувствительность (0,066 относительно ^1H)**
- **Естественное содержание изотопа ^{31}P - 100%**



Метод ЯМР на ядрах фосфора (^{31}P – ЯМР)

^{31}P -ЯМР – используют для изучения полиморфизма липидов с 1978 г.

Все фосфолипиды содержат по крайней мере один атом фосфора в полярной части липидной молекулы, что делает его идеальной природной меткой. Форма сигнала в спектрах ^{31}P –ЯМР определяется анизотропией химического сдвига.

Основные уравнения :

$$\nu = \gamma H_{\text{эфф}} / 2\pi$$

$$H_{\text{эфф}} = H_0 (1 - \sigma)$$

$$\delta = \sigma - \sigma_{\text{ст}}$$

ν – резонансная частота (ширина сигнала)

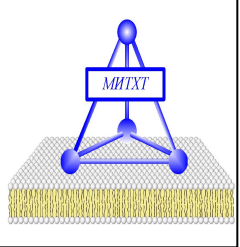
H_0 – напряженность внешнего магнитного поля

$H_{\text{эфф}}$ – напряженность эффективного магнитного поля

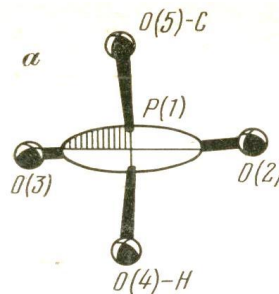
σ – константа экранирования

γ – «гироманнитное отношение» постоянное для данного типа ядер

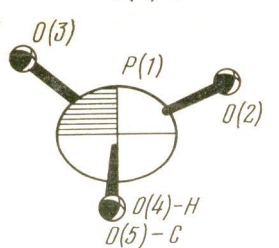
δ – химический сдвиг (разность между константой экранирования образца и стандарта)



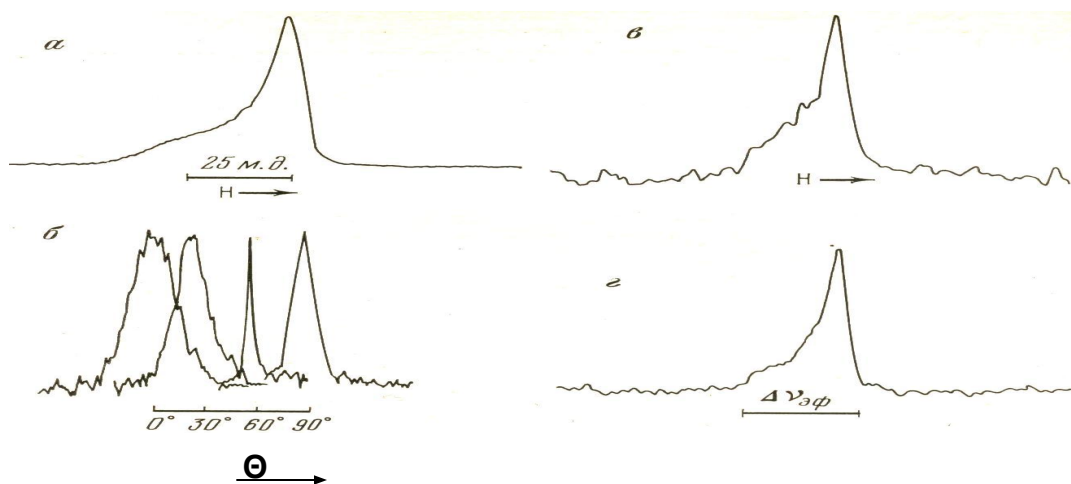
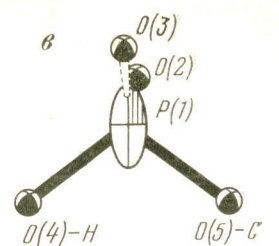
Химический сдвиг сигналов зависит от ориентации фосфатной группы относительно линий напряженности магнитного поля. Электронная плотность вокруг ядра фосфора в фосфатной группе анизотропна.



В истинных растворах происходит быстрое неупорядоченное движение молекул и усреднение электронной плотности вокруг ядра Р и химического сдвига. Сигнал в спектре ^{31}P -ЯМР- узкий изотропный .

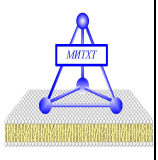


В частице с ламеллярной фазой электронная плотность вокруг ядра Р имеет аксиальную симметрию. Ось симметрии перпендикулярна плоскости бислоя. Химический сдвиг зависит от ориентации бислоя относительно линий напряженности магнитного поля. Сигнал в спектре ^{31}P -ЯМР для липидной мембраны – широкий анизотропный.



а – МЛВ смеси ДПФХ/хол (1:1);
 б – плоские ориентированные мультислои той же смеси;
 в – «тени» эритроцитов человека;
 г – дисперсия липидов, экстрагированных из теней

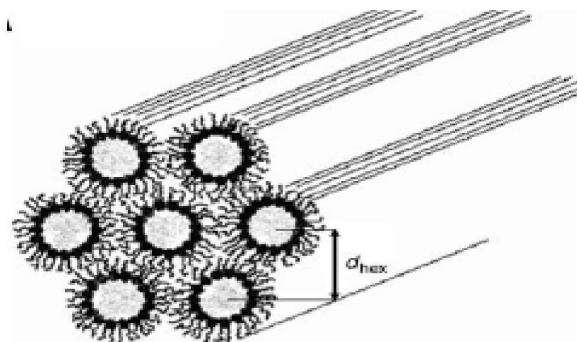
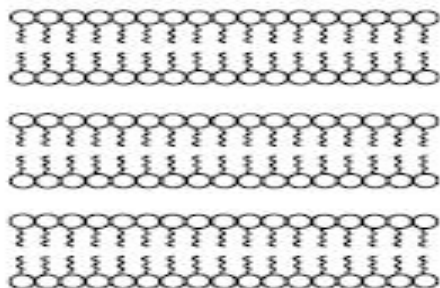
Θ – угол между направлением магнитного поля и нормалью к бислою

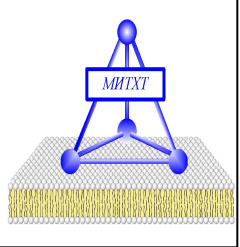


Метод ^{31}P ЯМР

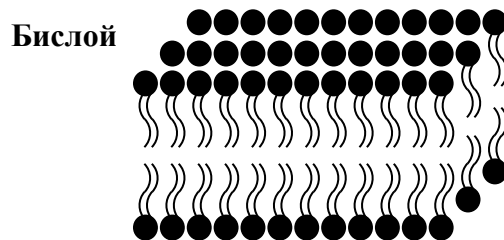
Химический сдвиг сигналов зависит от **ориентации фосфатной группы** относительно линий напряженности магнитного поля. Электронная плотность вокруг ядра фосфора в фосфатной группе анизотропна. Молекулы липидов обладают высокой латеральной и вращательной подвижностью.

- **Бислойные структуры:** латеральное движение липидов в плоскости бислоя не сопровождается изменением ориентации фосфатных групп относительно любой заданной оси, включая линии напряженности магнитного поля ЯМР -спектрометра. Анизотропия химического сдвига (расстояние между пиком и плечом сигнала) - 40-50 м.д.
- **Гексагональная фаза:** латеральное движение липидов представляет собой вращение вокруг оси цилиндров, которое сопровождается изменением ориентации фосфатных групп. Изменяется форма сигнала, уменьшается анизотропия химического сдвига.

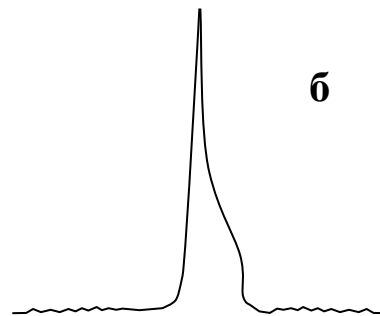
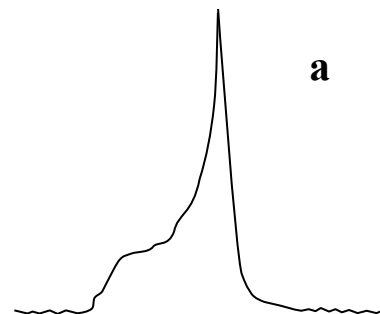
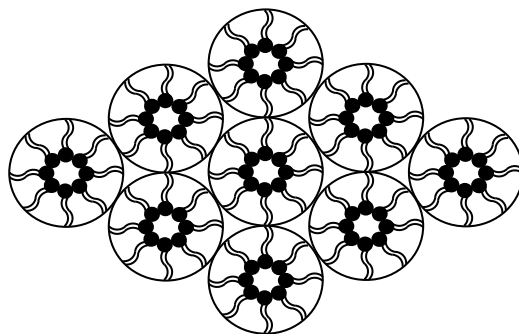




Метод ^{31}P ЯМР

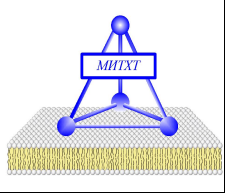


Гексагональная (H_{II})



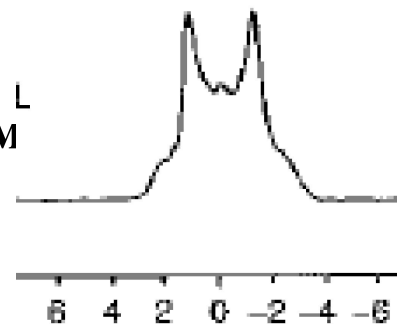
- 50 ppm - Hz

Спектры ^{31}P -ЯМР в составе ламеллярной (а)
и гексагональной (б) фаз



Метод ^2H ЯМР

- Спектр ^2H -ЯМР мембран представляет собой широкий анизотропный сигнал с двумя максимумами, частотное расстояние между которыми называется квадрупольным расщеплением



- Основа метода** – измерение квадрупольного расщепления $\Delta \nu$ дейтерия, которым селективно мечены молекулы липидов

$\Delta \nu = f(\beta)$, где

β - угол между нормалью к плоскости домена и направлением внешнего магнитного поля H_0 .

Величина $\Delta \nu$ зависит от движений, совершаемых дейтерием вместе с молекулой или ее фрагментом.

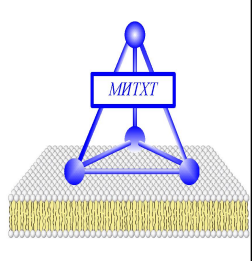
Понижение молекулярного порядка приводит к уменьшению наблюдаемого $\Delta \nu$

$\Delta \nu = 3/4 (e^2qQ/h)S$, где:

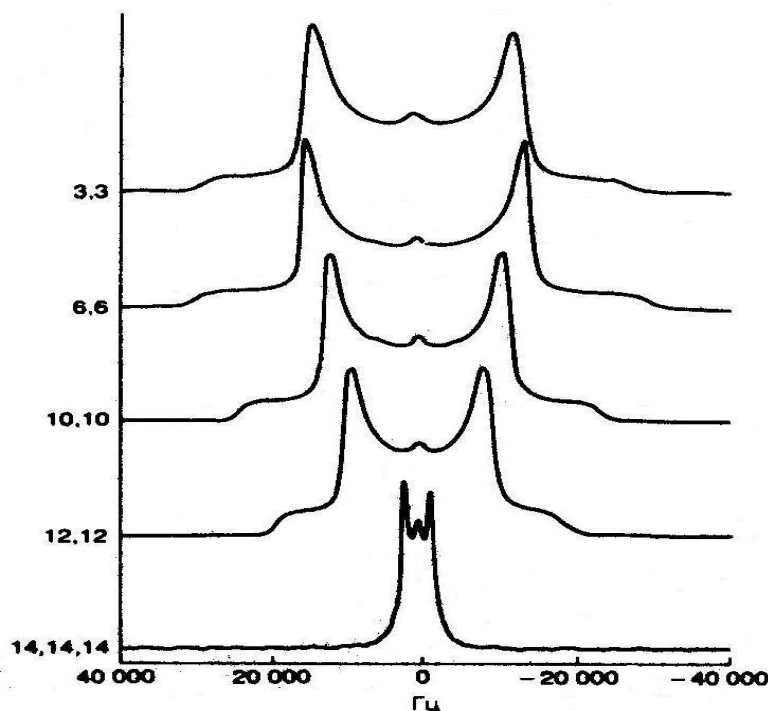
e^2qQ/h – статистическая константа квадрупольного расщепления;

$S = 1/2 (3 \cos^2 \theta_i - 1)$ – молекулярный параметр порядка, равный отношению наблюдаемого и максимально возможного квадрупольного расщепления;

θ_i - угол между i -ой осью динамического усреднения и направлением связи C- ^2H

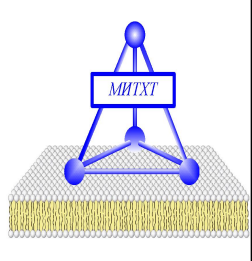


Спектр 2 Н-ЯМР мембран представляет собой широкий анизотропный сигнал с двумя максимумами, частотное расстояние между которыми называется квадрупольное расщепление

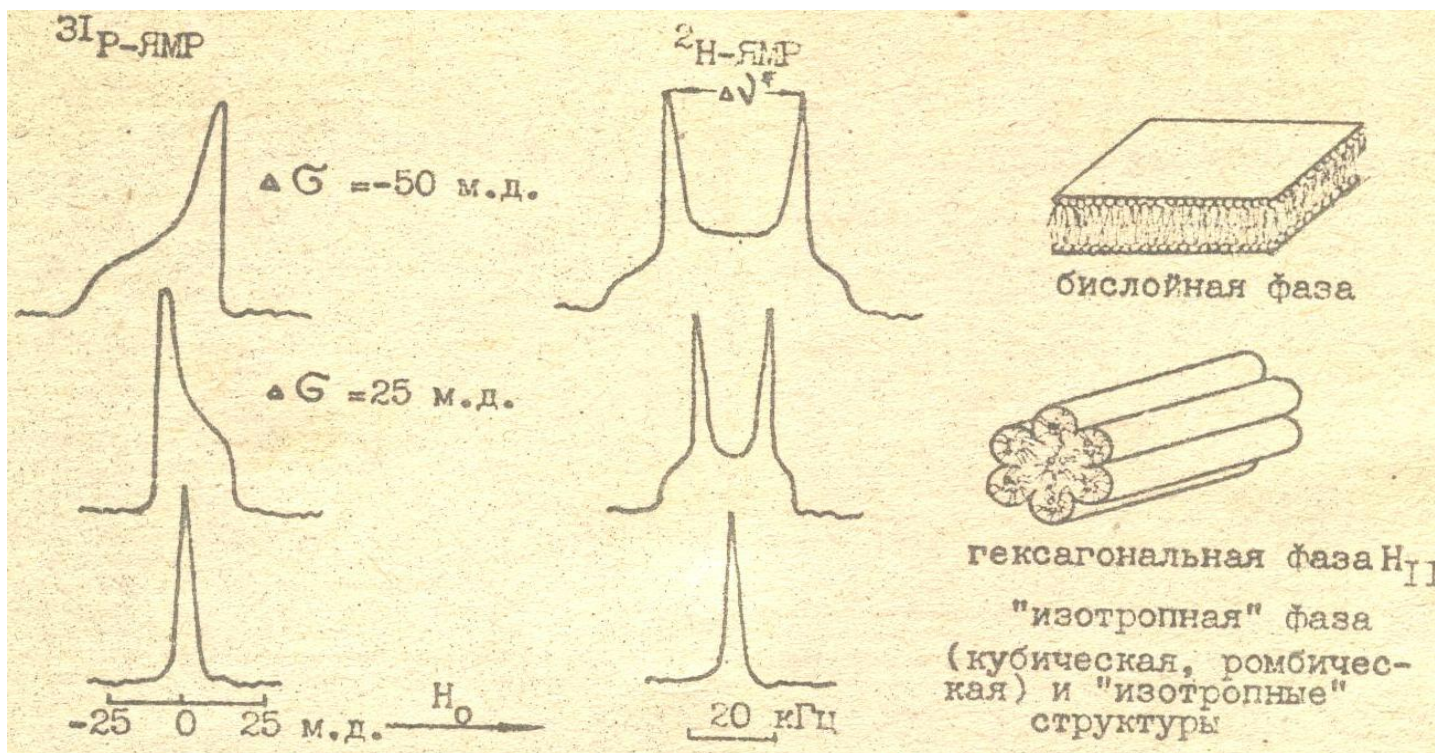


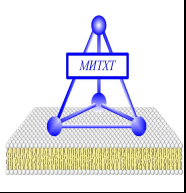
Спектр 2H – ЯМР ДМФХ, дейтерированного по различным положениям ацильной цепи. Числа слева – положение атомов дейтерия в каждой цепи.

Концевая метильная группа имеет самый узкий спектр – значительная неупорядоченность, а в центральной области высокая упорядоченность бислоя.



Структуры, которые образуются при диспергировании фосфолипидов в воде и соответствующие им спектры ^{31}P -ЯМР и ^2H -ЯМР





Электронная микроскопия

- Характеристика частиц по размеру и форме

Методы:

- Просвечивающая микроскопия тонких срезов
- Замораживания-скалывания
- Негативное контрастирование
- Криоэлектронная микроскопия

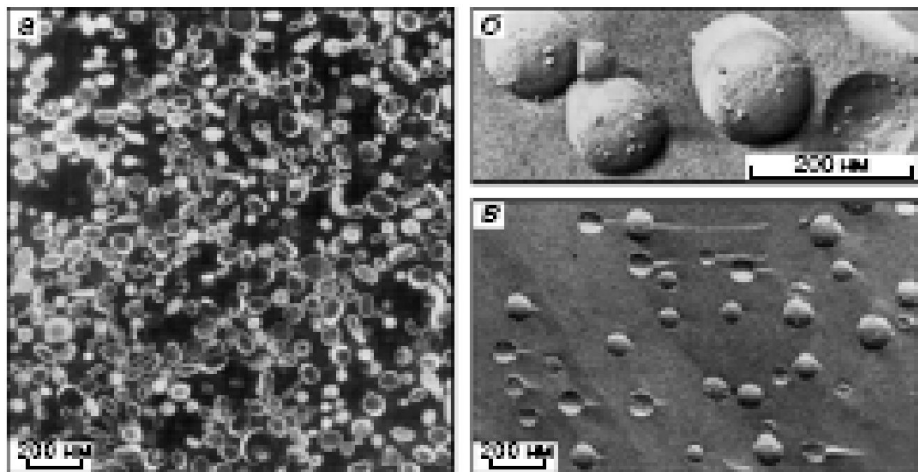
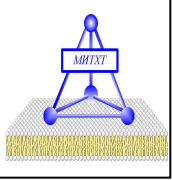
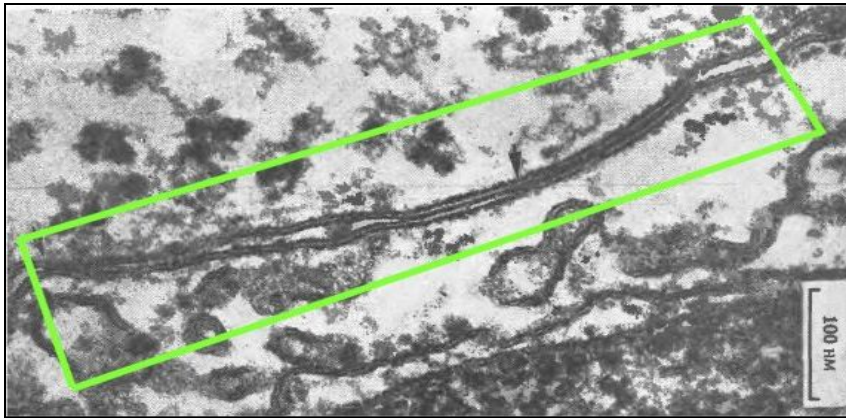


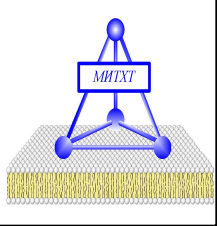
Рис. 4. Морфология реконструированных мембранных везикул, содержащих белок полосы 3, по данным электронной микроскопии: а – негативное контрастирование, б и в – замораживание-скалывание (из: Scheuring et al. // J. Membrane Biol. 1986. Vol. 90. P. 123-136)



Просвечивающая электронная микроскопия тонких срезов

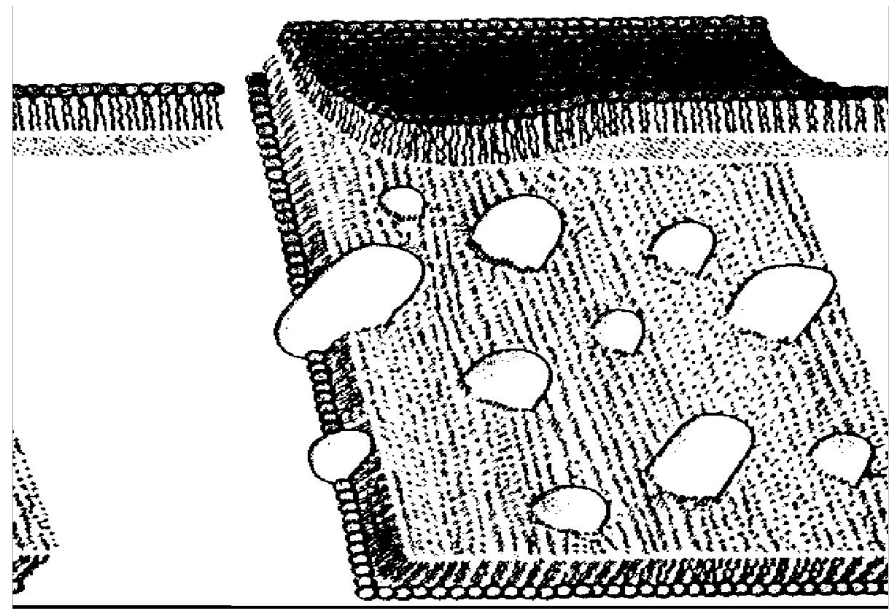
- 1950-е г.г. - Выявлена характерная трехслойная структура мембран, состоящая из 2-х электроноплотных полос, разделенных промежутком $\approx 80 \text{ \AA}$
- Используется обработка препаратов мембран OsO_4

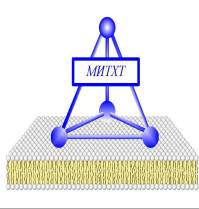




Метод замораживания-скалывания

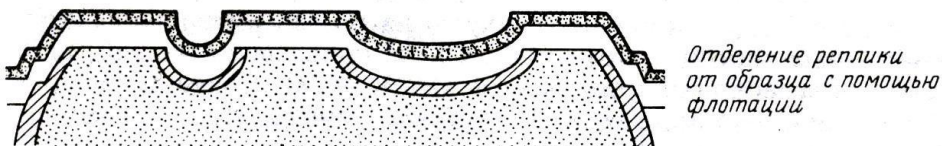
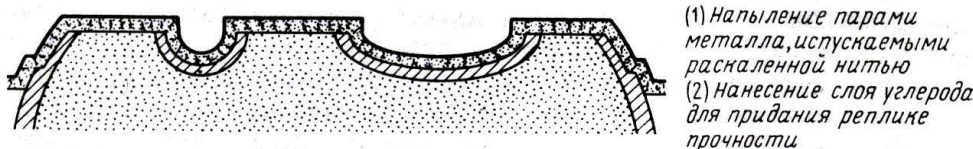
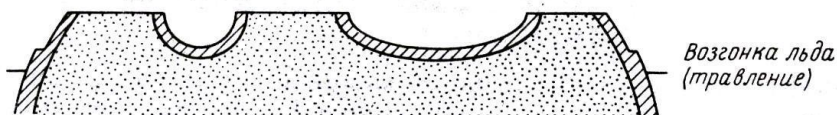
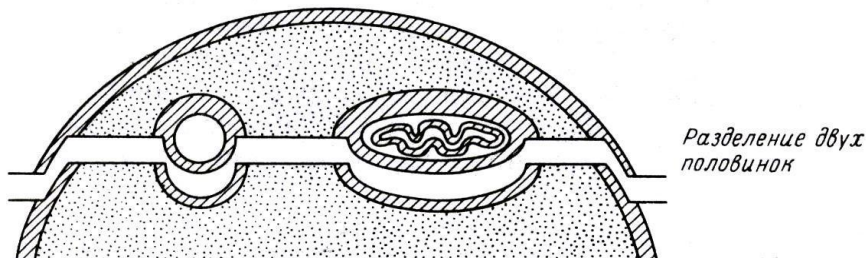
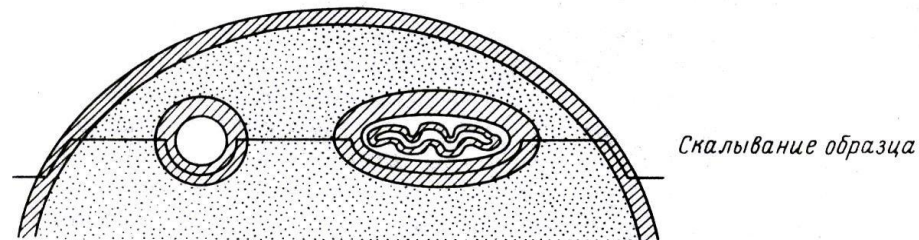
- Усилия при скалывании замороженной клетки приводят к образованию среза, проходящего через образец.
- Оказалось, что мембрана раскалывается преимущественно по своей срединной области и расщепляется на 2 половинки.
- На образовавшихся плоскостях скола мембраны обнажается ее внутренняя область.

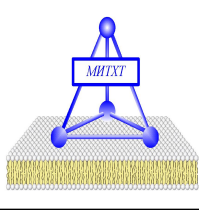




Метод «замораживания-скалывания» и «замораживания-травления»

1. Замораживание образца в жидком азоте ($T = -196^{\circ}\text{C}$, $V = 20^{\circ}\text{C}/\text{мс}$)
2. Скалывание ножом-микротомом в вакууме
3. Разделение скола
4. «Травление» (возгонка льда)
5. Получение платино-углеродной реплики
6. Размораживание образца
7. Удаление реплики
8. Анализ реплики под микроскопом





Метод замораживания-скалывания

Электронные микрофотографии замороженных сколов

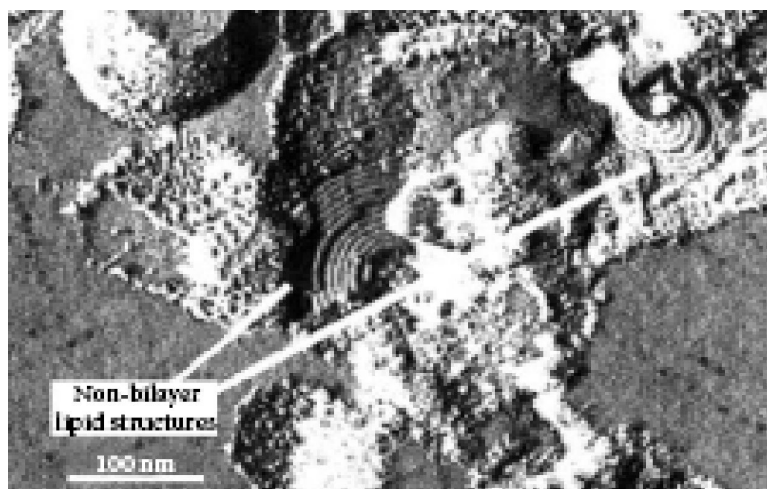
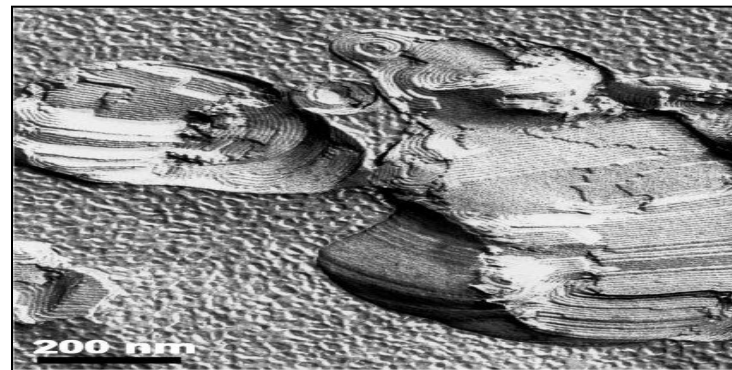
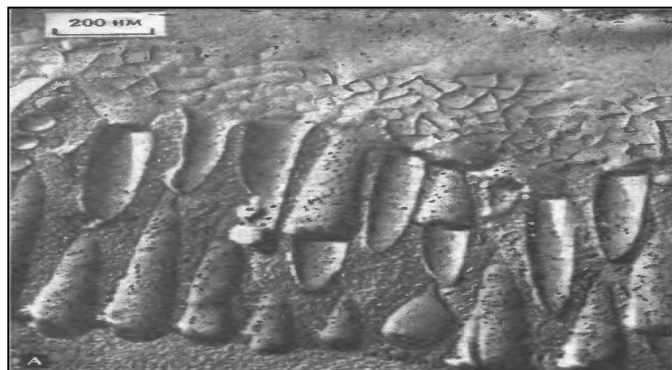
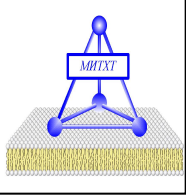


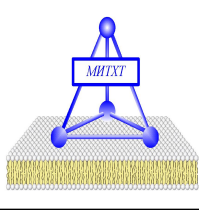
FIGURE 7.39 An electron micrograph of a freeze-fracture replica prepared from bean chloroplasts heated for 5 min at 55°C before thermal quenching.



Дифракционные методы. РСА и дифракция нейтронов.

Дифракция рентгеновских лучей (РСА)

- **Высокая упорядоченность кристаллических образцов – необходимое условие получения данных о структуре с высоким разрешением.**
- **1930-е г.г. Миелиновая мембрана нервных волокон – регулярная система из концентрических мембранных структур.**
- **1971 г. (Уилкинс и др.) –изучение водных дисперсий мембран и фосфолипидов (толщина бислоя 36 Å для ФЛ, расстояние между повторяющимися углеводородными слоями 4, 2 Å)**
- **Невозможность получения детальной молекулярной картины ограничивает применение метода РСА для изучения биологических мембран.**
- **Возможность изучения упорядоченных водно-липидных систем.**



Дифракционные методы (РСА)

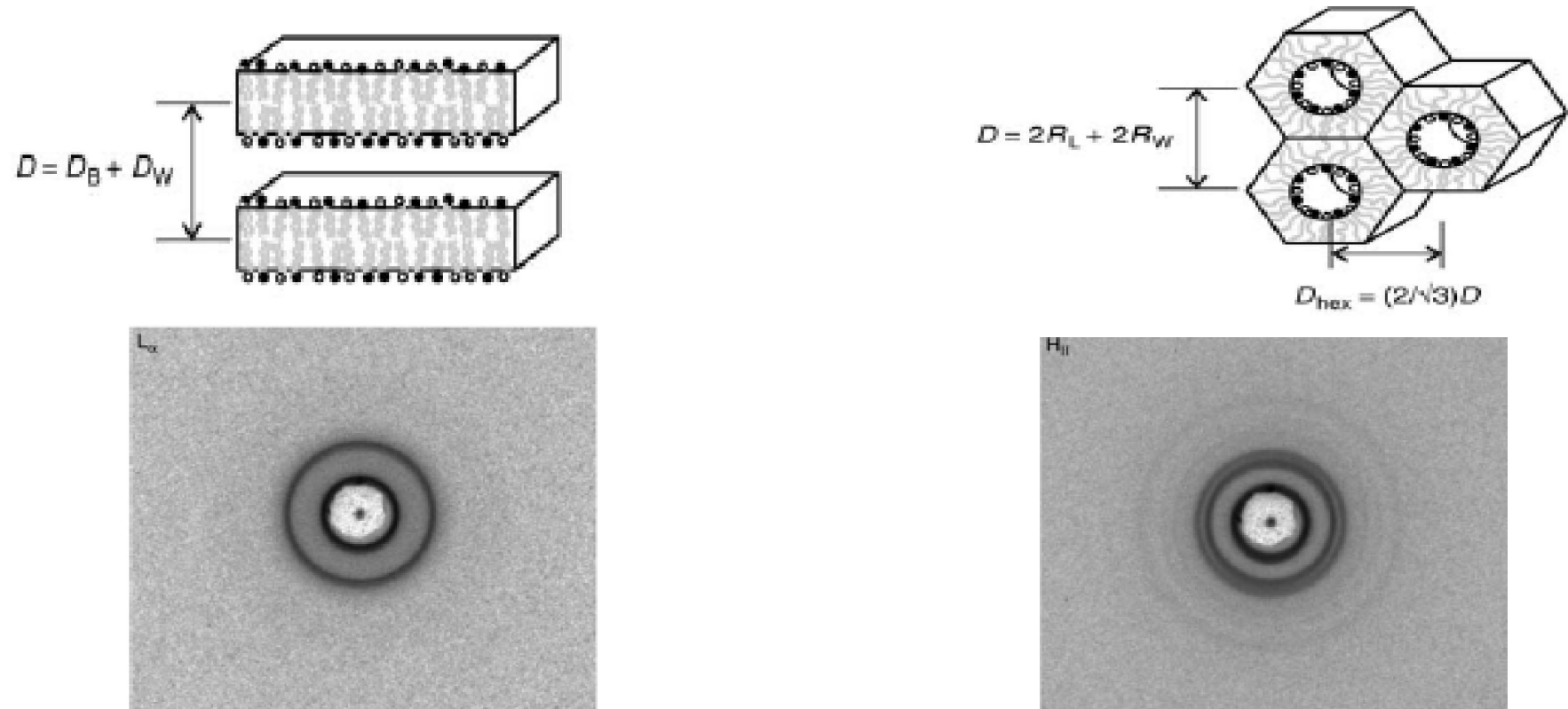
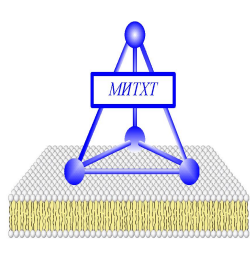
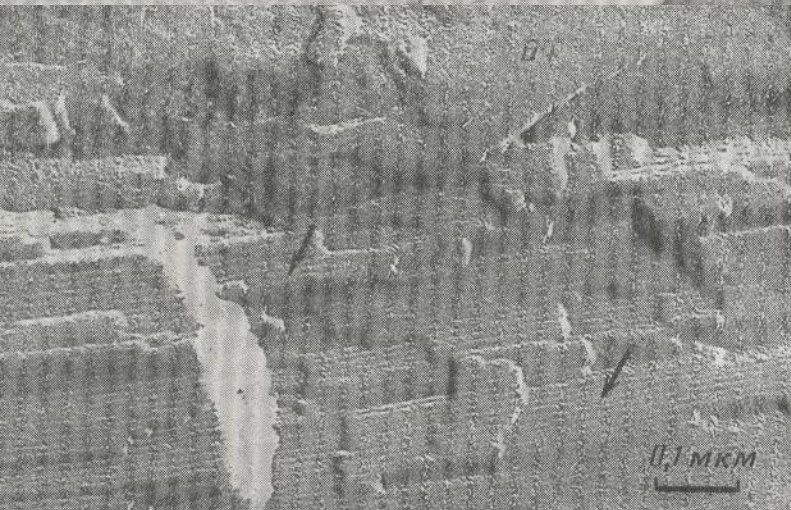
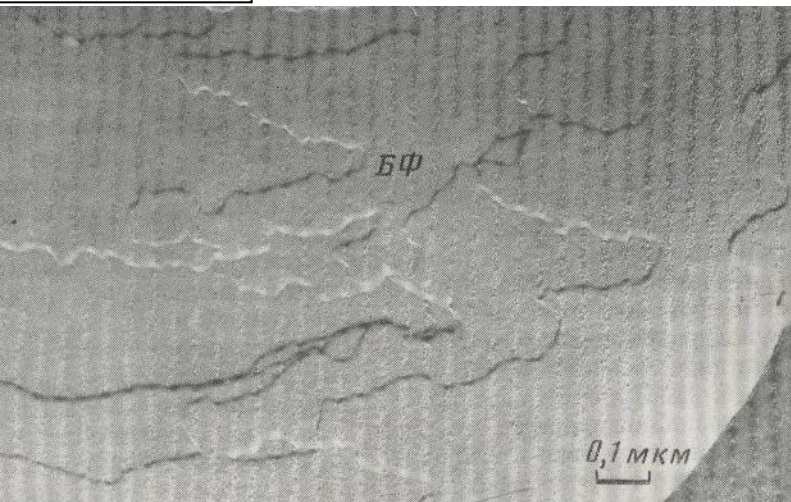


Fig. 1. X-ray scattering from multilamellar (L_α) DMPC and inverted hexagonal (H_{II}) DOPE, both fully hydrated at 35°C. Scattering rings of DMPC are equally spaced and reflect the regular spacing between stacked bilayers. The X-ray rings of DOPE index as 1, $1/\sqrt{3}$, $1/2$, $1/\sqrt{7}$, ... and reflect the honeycomb-like positioning of water cylinders in the H_{II} phase.

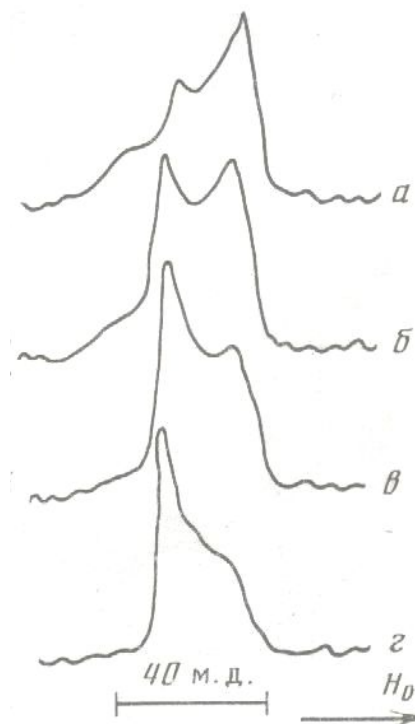


Электронная микроскопия «замораживание-скалывание» и ^{31}P –ЯМР спектроскопия

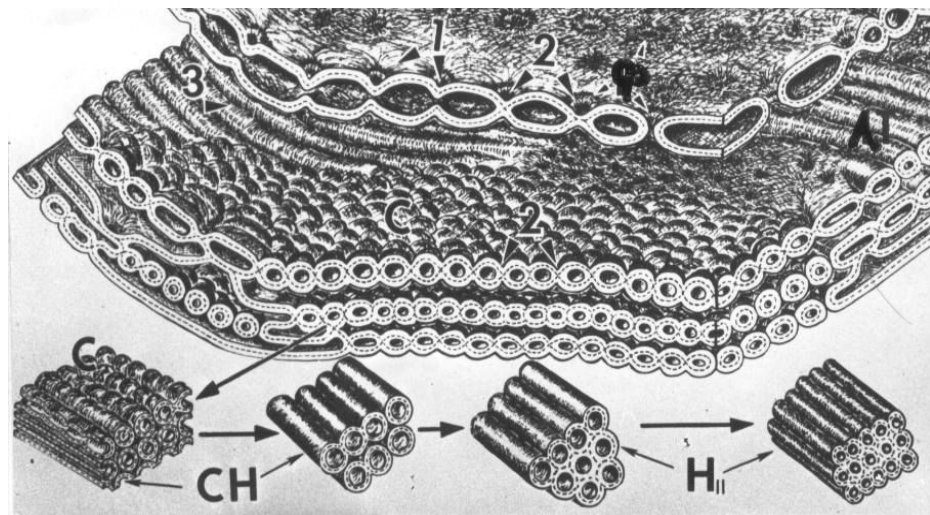


А

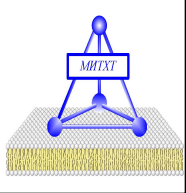
Б



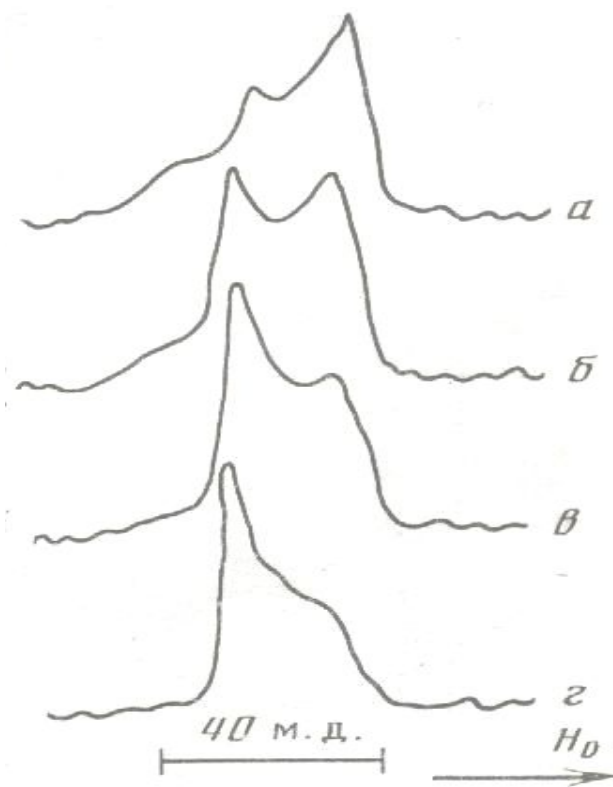
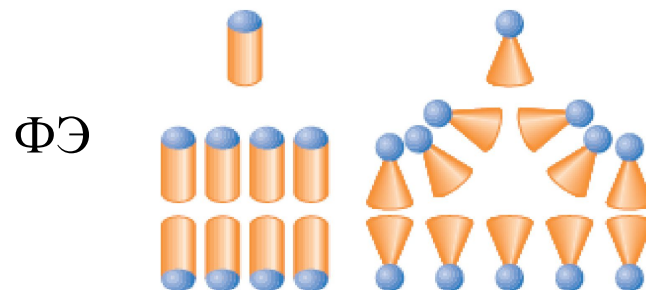
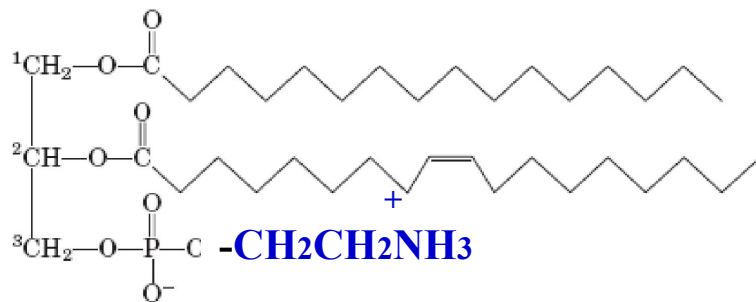
Спектры ^{31}P -ЯМР водных дисперсий яичного фосфатидилэтаноламина (я-ФЭ) при различных температурах :
а - 25 оС,
б – 35 оС,
в - 40 оС
г - 45 оС



Электронные микрофотографии сколов замороженных препаратов водных дисперсий ФЭ А – при 25оС и Б – при 45 оС

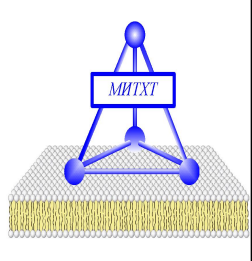


Влияние температуры на переход бислой-гексагональная фаза



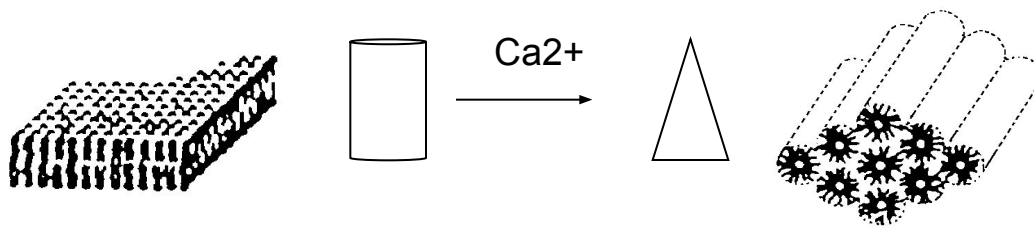
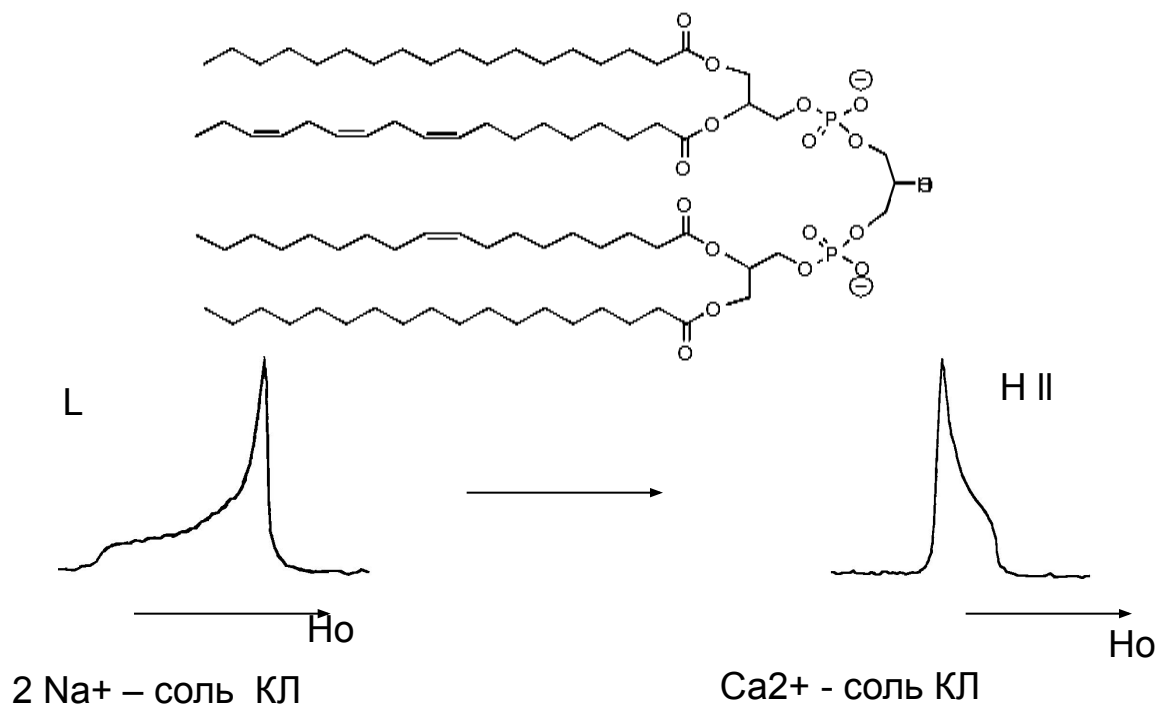
Спектры ^{31}P -ЯМР водных дисперсий яичного фосфатидилэтаноламина при различных температурах :

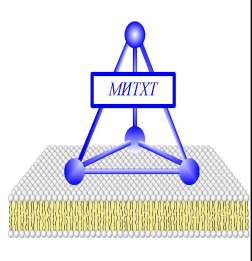
- а - 25°C - L + H_{II} -фаза
- б - 35°C - L + H_{II} -фаза
- в - 40°C - L + H_{II} -фаза
- г - 45°C - H_{II} -фаза



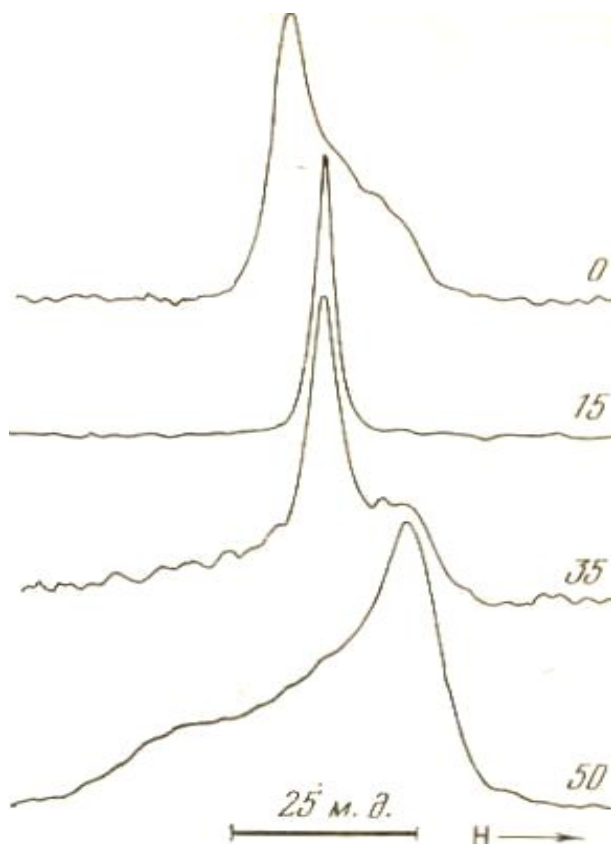
Полиморфизм отрицательно заряженных фосфолипидов

Структурные перестройки водных дисперсий кардиолипина (КЛ) при добавлении ионов Ca^{2+}





Полиморфизм смесей фосфолипидов

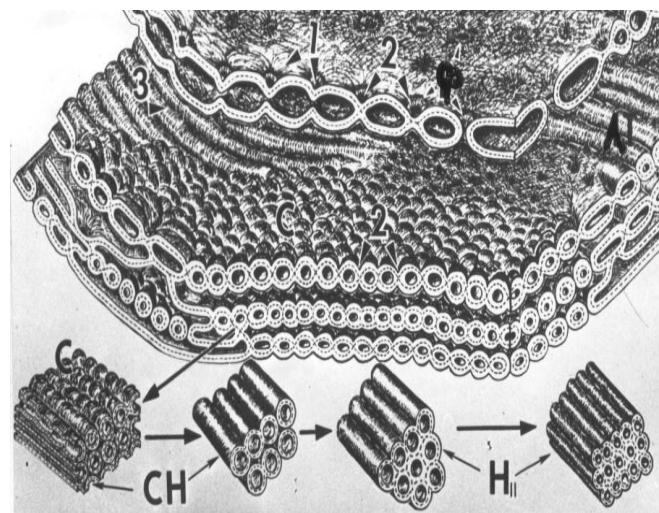


ФЭ

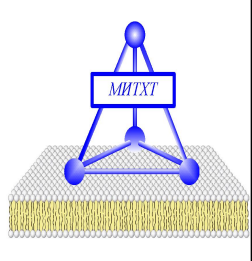
ФЭ/ФХ
85:15

ФЭ/ФХ
65:35

ФЭ/ФХ
50:50



Спектры ^{31}P -ЯМР водных дисперсий смесей соевого ФЭ и яичного ФХ при 30°C , pH 7,0



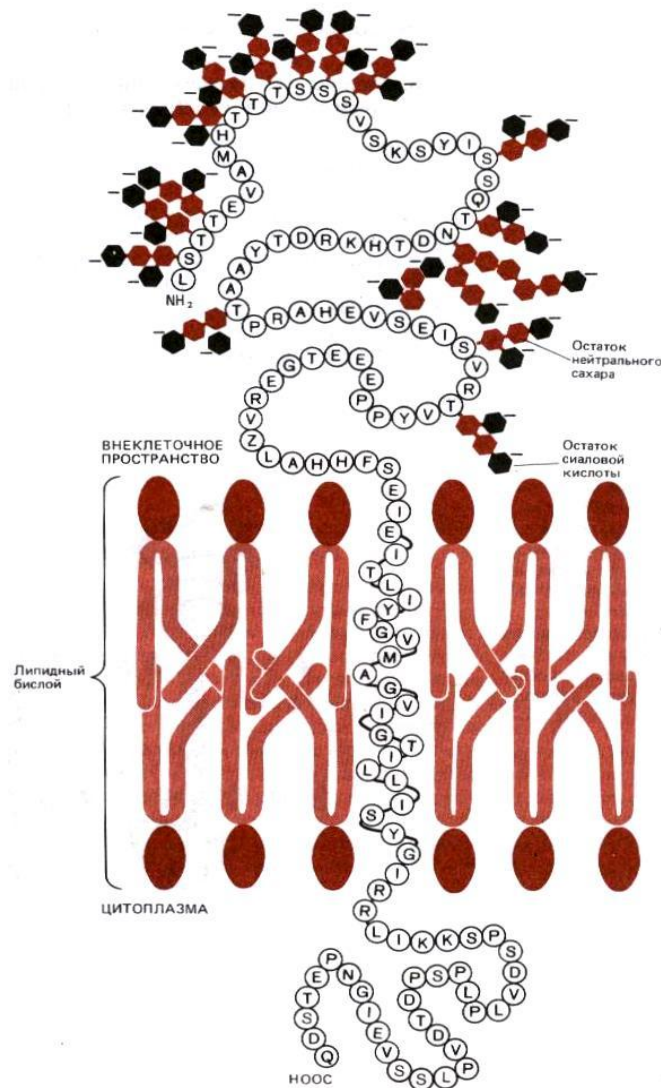
Влияние белков на полиморфизм фосфолипидов

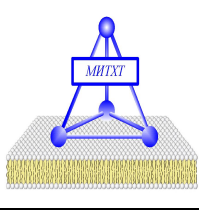
Белки оказывают сильное влияние на полиморфизм ФЛ:

- Гидрофобный полипептид грамицидин А при соотношении липид/белок (10:1) приводит ДОФХ к переходу из L в H_{II} фазу. При этом происходит агрегация грамицидина А, дегидратация липидов, которая стабилизирует гексагональную фазу.

- Гликофорин стабилизирует бислойную конфигурацию небислойногo липида ДОФЭ.

- На полиморфизм КЛ влияют положительно заряженные белки

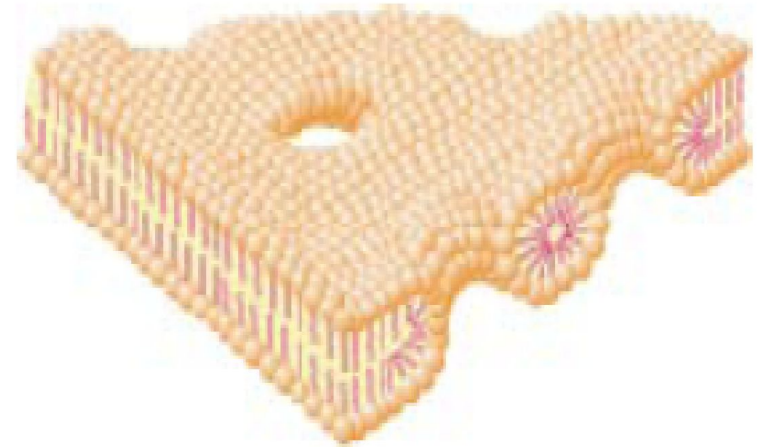




Биологическое значение полиморфизма липидов



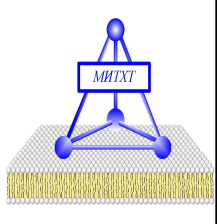
Бислой – структурная основа биологических мембран



НЕбислойные структуры в мембранах

В настоящее время полиморфизмом фосфолипидов биологических мембран объясняют такие процессы, как:

- **трансмембранный транспорт фосфолипидов и водорастворимых веществ,**
- **слияние мембран.**



Биологическое значение полиморфизма липидов

**Слияние 2-х мембран
лежит в основе
многих процессов
в клетке:**

- деление клеток
- слияние клеток
- ЭНДОЦИТОЗ
- ЭКЗОЦИТОЗ
- внутриклеточный транспорт
- и другие

