

УДК 541.64:539.199

ВЗАИМОСВЯЗЬ МЕЖДУ СТРУКТУРОЙ, СВОЙСТВАМИ И ФУНКЦИЯМИ НЕНАСЫЩЕННЫХ ЦЕПЕЙ МОЛЕКУЛ ЛИПИДОВ ПРИРОДНЫХ МЕМБРАН: КОМПЬЮТЕРНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ¹

Рабинович А.Л.

*Институт биологии КарНЦ РАН, г. Петрозаводск,
rabinov@krc.karelia.ru*

1. Природные мембраны: состав, подходы к изучению

Для понимания принципов функционирования природных мембран на молекулярном уровне требуется знание особенностей структуры, организации, взаимодействия многих компонентов, - молекул липидов, белков, углеводов. В мембранах обнаружены различные липидные и смешанные (микро-, нано-, макро-) доменные структуры. В настоящее время статус отдельной концепции приобрела идея иерархии доменов, их сосуществования на разных пространственных масштабах. Основу природных мембран образуют молекулы липидов, а наиболее распространенными компонентами последних являются неразветвленные углеводородные олигомеры цепного строения, которые могут содержать до 6 двойных связей (преимущественно конфигурации *cis*) в различных положениях. В мембране сосуществуют сотни различных по строению молекул липидов, отличающихся полярными головными группами и составом жирнокислотных цепей (количеством звеньев в них, степенью разветвленности цепи, количеством и конфигурацией двойных связей, их местоположением в цепи). Несмотря на такое многообразие липидных молекул, разными научными группами все больше осознается и подчеркивается, что для функционирования мембран особую важность представляют ненасыщенные и полиненасыщенные (полиеновые) цепи липидных молекул [1, 2]. Вместе с тем понимание большинства связанных с этим механизмов на молекулярном уровне не достигнуто.

Оценивать относительный вклад отдельных молекул липидов или углеводородных цепей в свойства мембран, прогнозировать возможную их роль (по крайней мере, выдвигать и обосновывать гипотезы об их функциях или сужать круг уже имеющихся гипотез) можно при изуче-

¹ Работа выполнена при поддержке РФФИ, проект 06-03-32211, и гранта Президента РФ для ведущих научных школ, НШ-306.2008.4.

нии разницы в собственных физических свойствах этих молекул в различных состояниях. Этот путь, однако, осложнен тем обстоятельством, что экспериментальные данные по многим свойствам имеются далеко не для всех известных молекул липидов, особенно ненасыщенных. Причина отсутствия систематических данных заключается, с одной стороны, в объективных трудностях по выделению, очистке, идентификации и сохранению ненасыщенных молекул, а с другой, - в затруднениях по интерпретации регистрируемых в эксперименте спектров (или других характеристик), которые относятся к образцу как целому, и по выделению из них искомой информации о молекулярных компонентах системы. В этой ситуации особую актуальность приобретает задача восполнения пробелов в данных теоретическими методами. Важнейшее место среди последних занимают методы имитационного компьютерного моделирования, в частности, методы статистических испытаний (Монте-Карло, МК) и молекулярной динамики (МД) [3–6]. Компьютерное моделирование позволяет извлечь информацию о свойствах молекулярных систем, иногда уникальную по степени детальности и подчас едва ли достижимую в физическом эксперименте. К настоящему времени компьютерное моделирование упрочилось как парадигма, как мощный общепризнанный инструмент изучения свойств объектов различной природы, хотя структура и функционирование реальных объектов существенно сложнее тех молекулярных моделей, которые пока используются.

2. Углеводородные цепи молекул природных липидов

Ненасыщенные углеводородные олигомерные цепи, как упоминалось, имеют существенное значение для биомембран. Можно привести примеры некоторых видов животных, тканей или органов, мембраны которых содержат в качестве основного компонента липидов всего одну или несколько ненасыщенных жирнокислотных цепей. Для обозначения химической структуры природных углеводородных олигомеров (цепей жирных кислот), двойные связи в которых являются метилепрерывающимися, т.е. между каждой парой двойных связей расположена одна группа CH_2 , ниже использовано сокращение N:k(n-j)cis . Здесь N – общее количество атомов углерода, k – количество двойных связей, j – количество атомов углерода до ближайшей двойной связи, считая от концевой группы CH_3 цепи (на это указывает наличие символа n , не принимающего никаких числовых значений), *cis* - конфигурация двойных связей. Так, установлено, что мононенасыщенные жирнокислотные цепи являются основным компонентом некоторых мембран бактерий [7]; цепь α -линоленовой кислоты, $18:3(n-3)\text{cis}$, является основной ацильной состав-

ляющей липидов хлоропластов высших растений [8]; цепь докозагексаеновой кислоты, 22:6(n-3)*cis*, важна для установления нормальной структуры и функционирования сетчатки глаз [9], и содержание 22:6(n-3)*cis* составляет до половины остатков жирных кислот фосфолипидов внешних сегментов палочек сетчатки глаз позвоночных. Высокое содержание цепей (n-3)-полиненасыщенных жирных кислот, особенно 22:6(n-3)*cis*, является особенностью центральной нервной системы [10]. Цепи арахидоновой 20:4(n-6)*cis*, эйкозапентаеновой 22:5(n-3)*cis* и докозагексаеновой 22:6(n-3)*cis* кислот эффективно поглощались тканями млекопитающих и активно метаболизировались в липиды мозга [11]. Цепь 22:6(n-3)*cis* составляет примерно 1/3 жирнокислотного состава молекул фосфатидилэтаноламина и фосфатидилсерина коры головного мозга человека, обезьяны, крысы [10]. Мембраны метаболически активных тканей и структур, - сетчатки глаз, митохондрий, синаптических везикул и др. вообще характеризуются высоким уровнем цепей полиненасыщенных жирных кислот и 22:6(n-3)*cis*-содержащих видов молекул фосфолипидов [12]. Содержание цепей 22:6(n-3)*cis* в молекулах липидов морских и пресноводных видов рыб коррелирует со степенью их двигательной активности: у более активных видов – более высокий уровень 22:6(n-3)*cis* [13]. Известно влияние полиненасыщенных углеводородных цепей на огромное число биохимических процессов, в том числе вызывающих болезни [14], – столь различные, что с формальной точки зрения они представляются не связанными между собой. Следовательно, механизм взаимодействия полиненасыщенных цепей с другими молекулярными компонентами мембран и функциональная роль в этих процессах должны быть в известном смысле общими, фундаментальными, основанными на специфических, особых свойствах, обусловленных строением таких цепей. Мы затронем вопрос лишь о таких функциях олигомерных цепей в мембранных системах, которые не нарушают целостности молекул. Очевидно, в ряду различных свойств мембранных систем в нормальных условиях или систем, претерпевающих изменения внешних условий (например, температуры), молекулы с полиненасыщенными цепями должны обладать характеристиками, позволяющими выделить эти молекулы среди всех остальных. Поэтому важнейшее значение приобретает анализ свойств цепных олигомеров разной структуры и поиск среди них свойств *экстремальных*.

3. Методы исследования

В работе использованы методы МК и МД. Для понимания многих “мембранных” проблем весьма плодотворными оказались результаты,

полученные при моделировании компонентов липидов, - олигомерных цепей, и липидных бислойных (или монослойных) кластеров. Для генерирования ансамблей конформаций различных цепных углеводородных олигомеров использована МК-модель, идея которой и основные этапы вычислений изложены в [15, 16], – “континуум-модель”. Данный подход применялся для изучения разных свойств углеводородных цепей [17–19]. Генерирование конформаций цепных молекул на компьютере в рамках этой модели осуществляется не в поворотном-изомерном приближении [20], а в предположении о непрерывном изменении всех торсионных углов основной цепи рассматриваемой молекулы в диапазоне от 0 до 360°. Методика МД-моделирования липидных бислоев была детально представлена в работах [21–24]. В итоге были рассчитаны свойства большого числа олигомерных цепей как в изолированном состоянии [17–19], так и в бислоях [21–24].

4. Температурная зависимость формы ориентационных функций распределения

Среди многих свойств были изучены ориентационные функции распределения связей С-С и С-Н разных углеводородных олигомеров (в Θ -условиях [20]) относительно главной оси инерции цепи, отвечающей ее наибольшей протяженности. Цель состояла в выявлении разницы в форме каждой из функций в разных цепях. Для упрощения этой задачи были определены значения углов $\vartheta_{\text{CH}}^{\text{max}}$ и $\vartheta_{\text{CC}}^{\text{max}}$, при которых данная функция распределения достигает максимального значения, и величины угловой ширины $\delta\vartheta_{\text{CH}}$ или $\delta\vartheta_{\text{CC}}$ этой функции распределения на половине ее высоты. Результаты расчета для двух цепей – насыщенной 18:0 и предельно ненасыщенной 18:5(n-3)cis при температурах 278 и 403 К представлены на рис.1; объемы выборок при генерировании цепей методом МК составляли 1500000 – 2000000 конформаций [25]. Обратим особое внимание на влияние температуры и отметим, что с ростом температуры в цепи 18:5(n-3)cis изменения как величин углов $\vartheta_{\text{CC}}^{\text{max}}$, $\vartheta_{\text{CH}}^{\text{max}}$, так и флуктуаций $\delta\vartheta_{\text{CC}}$, $\delta\vartheta_{\text{CH}}$ для всех связей практически несущественны по сравнению с таковыми в цепи 18:0. Ранее нами было показано [1], что полиеновые цепи обладают многократно меньшими, чем цепи насыщенные, температурными коэффициентами геометрических характеристик, - таких, как $d \ln \langle h_0^2 \rangle / dT$ (где $\langle h_0^2 \rangle$ - средний квадрат расстояния между концевыми атомами углерода, T - температура). Таким образом, оказалось, что в полиеновой цепи резко снижена, по сравнению с насыщенной цепью, температурная чувствительность не только

характеристик, относящихся к цепи как целому (например, $\langle h_0^2 \rangle$),

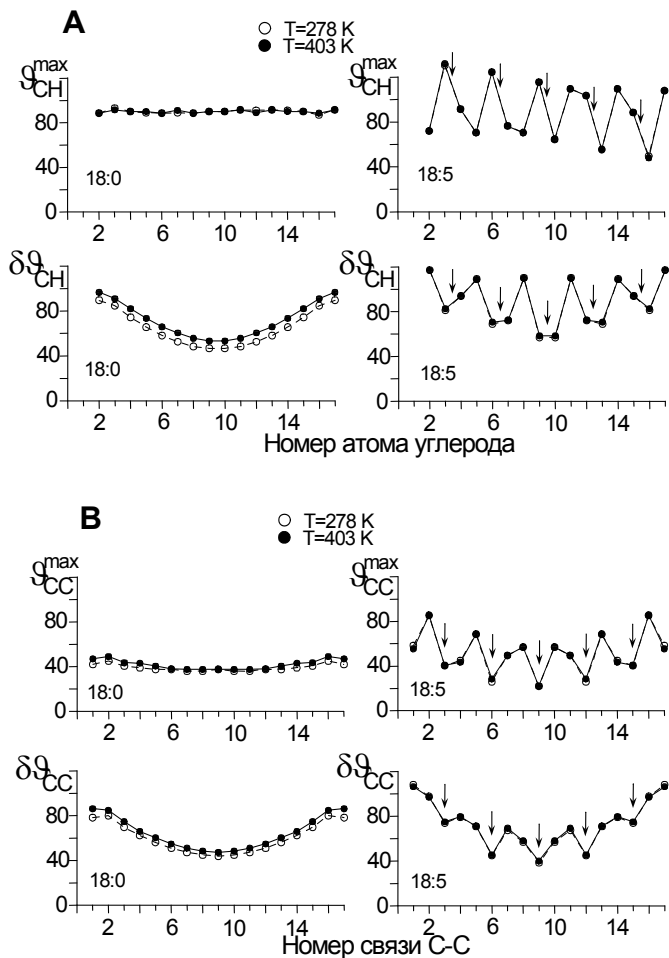


Рис.1. А - углы ϑ_{CH}^{\max} , отвечающие максимумам ориентационных функций распределения связей С-Н насыщенной, 18:0, и полиеновой, 18:5(n-3)cis, цепей в невозмущенном состоянии, а также ширина $\Delta\vartheta_{CH}$ этих функций на половине их высоты при двух температурах, 278 К и 403 К. ϑ_{CH} – угол, образуемый вектором связи С-Н с главной осью инерции цепи, соответствующей ее наибольшей протяженности.

В – аналогичные величины для ориентационных функций распределения связей

C=C этих же цепей. Расчет по результатам моделирования методом МК, положения двойных связей C=C в цепи указаны стрелками.

но и характеристик каждого ее звена, – формы ориентационных функций распределения связей, рис.1. С помощью компьютерного моделирования были выявлены и другие *экстремальные* свойства полиеновых цепей, что позволяет обсуждать вопросы о возможных их функциях.

5. Полиеновые углеводородные цепи: структура, свойства, функции

Согласно традиционной интерпретации [26–31], функции ненасыщенных цепей в фосфолипидах биомембраны состоят исключительно в поддержании ее жидкостности, – такой, которая обеспечила бы возможность нормального функционирования данной мембраны при различных условиях внешней среды. Экспериментально наблюдается общая тенденция к увеличению степени ненасыщенности цепей липидов при адаптации организма, например, к более низким температурам, и, наоборот, повышение температуры среды способствует понижению концентрации ненасыщенных цепей. При изменении температуры (а в общем случае – изменении условий среды), как представляется, мембрана стремится сохранить должный уровень свойств, изменяя свою структуру (структуру своих компонентов) минимальным образом. Понимание этого механизма на молекулярном уровне, прежде всего, означает точное знание связей “структура-свойство” для каждой липидной молекулы. Конкретные пути осуществления замены липидной цепи того или иного строения на другую в природной мембране связаны с комплексом сложнейших биохимических процессов, и в настоящее время прямому компьютерному моделированию не поддаются. Поэтому представляется разумным судить о функциях той или иной углеводородной цепи по степени соответствия ее физических свойств некоторой (выдвинутой) гипотезе; это, как уже упоминалось, либо способствует обоснованию конкретных гипотез, либо сужает их круг.

Концепция функциональной связи “ненасыщенные цепи липидов – жидкостность биомембраны”, безусловно, коррелирует с уже известными свойствами ненасыщенных углеводородных цепей [1]. Например, согласно расчетам, с ростом числа метиленпрерывающихся двойных связей *cis* увеличивается равновесная гибкость цепи [1]. Вопрос состоит лишь в том, липиды с каким числом двойных связей в цепи могут играть наибольшую роль в установлении надлежащей жидкостности, и только ли жидкостностью ограничиваются функции ненасыщенных цепей. С формальной точки зрения, для существенного изменения температуры плавления и достижения тем самым должной степени жидкост-

ности мембраны (в широком диапазоне) достаточно изменять содержание моноеновой и/или диеновой цепей с 18 атомами углерода. Эти цепи выполняли бы гомеовязкостные функции и таким образом являлись бы основным строительным материалом липидной матрицы, наряду с насыщенными цепями. Например, согласно экспериментальным данным, собранным в работе [32], замена лишь одной простой связи С-С в одной насыщенной цепи молекулы 18:0/18:0 ФХ на двойную С=C, т.е. переход к молекуле 18:0/18:1(n-9)*cis* ФХ, приводит к понижению температуры плавления T_c (фазового перехода гель-жидкий кристалл), соответственно, от величины $54.5^\circ\text{C} \pm 1.5^\circ$ до $6.9^\circ\text{C} \pm 2.9^\circ\text{C}$, т.е. сравнительно небольшим изменением структуры молекул перекрывается почти весь диапазон биологически значимых температур. Замена второй простой связи на двойную, т.е. переход к молекуле 18:0/18:2(n-6)*cis* ФХ, снижает температуру T_c до отрицательных значений $-14.4^\circ\text{C} \pm 4.1^\circ\text{C}$ [32]. Изменение местоположения двойной связи в моноеновой цепи 18:1 даже на один атом углерода в ту или другую сторону производит тоже заметный эффект: например, температура плавления T_c молекул 18:0/18:1(n-11)*cis* ФХ равна 16.7°C [32], а T_c молекул 18:0/18:1(n-12)*cis* ФХ – уже 24.8°C [32]. Механизм увеличения жидкостности мембраны с появлением двойных связей *cis* в углеводородных цепях липидов был выявлен с помощью компьютерного моделирования. Он состоит в увеличении, вследствие особенностей внутренних вращений в ненасыщенных цепях, угловых флуктуаций CH_2 -групп, примыкающих с обеих сторон к двойным связям, и в увеличении пространственных флуктуаций двойных связей [17, 22].

Однако, перечисленные в разделе 2 факты высокой концентрации в ряде органов и тканей углеводородных цепей с большим числом – шестью – двойными связями в эту “гомеовязкостную” схему явно не вписываются. Формально говоря, полиненасыщенные цепи едва ли могут способствовать достижению еще большей степени жидкостности, поскольку, например, T_c молекул 18:0/22:6(n-3)*cis* ФХ равна $-3.8^\circ\text{C} \pm 1.8^\circ\text{C}$ [32], т.е. она выше (а не ниже!), чем T_c молекул 18:0/18:2(n-6)*cis* ФХ. С другой стороны, компьютерные эксперименты позволили обнаружить, что физические свойства полиеновых цепей являются аномальными, уникальными [1, 17, 22]. Следовательно, и функции полиеновых жирнокислотных цепей в биомембране вполне могут (а, возможно, должны) быть явно более специфичными. Здесь уместно отметить, что большое количество биохимических данных указывает на то, что внутримембранное распределение липидов, содержащих остатки полиненасыщенных цепей, неоднородно. Как оказалось, полиненасыщенными цепями

могут быть значительно обогащены липиды, непосредственно связанные с интегральными белками [1, 10, 27, 33]. В частности, согласно эксперименту, остатки 22:6(n-3)cis в мембранах нервной системы преимущественно связаны с белками [34]. Утверждалось, что полиненасыщенные липиды типа 22:6-фосфатидилсерина или 20:4-фосфатидилэтаноламина могут играть поэтому регуляторную роль во многих клеточных процессах, – например, для встраивания фосфатидилсерина и рецептора опиума [34, 35]. Подобные данные позволяют полагать, что полиненасыщенные липиды и в других системах не являются строительным материалом липидной матрицы а, как правило, создают специфическое микроокружение для внедренных в мембрану ферментов (это согласуется и с концепцией существования различных “кластеров” внутри мембраны). При этом уже известные свойства полиненасыщенных цепей (выявленные к настоящему времени с помощью компьютерного моделирования) дают возможность перечислить наиболее вероятные причины и следствия повышенного содержания этих цепей в аннулярных липидных слоях [1, 22].

При температурах выше температуры T_c :

– (а) в полиненасыщенных цепях наиболее велики, по сравнению с другими цепями, (i) ориентационное разупорядочение простых связей, соседних с двойными C=C, (ii) угловые флуктуации связей C-H во всех CH_2 -группах вдоль по цепи, (iii) пространственные флуктуации атомов C двойных связей, (iv) гибкость цепи в целом и каждого ее участка. Для ферментов такие свойства окружающих полиненасыщенных цепей могут способствовать поддержанию надлежащей конформационной подвижности, играющей ключевую роль для нормального функционирования ферментов, давать выигрыш в энергии липид-белковых взаимодействий по всей поверхности контакта молекул, обеспечивать условия для взаимодействия отдельных ферментов сложных энзиматических систем;

– (б) при изменении температуры наиболее стабильны, по сравнению с другими цепями, характеристики полиненасыщенных цепей - как в целом, так и каждого их сегмента в отдельности. Это может стабилизировать или оптимизировать липид-белковые взаимодействия при разных температурах, причем, на каждом малом участке вдоль всей поверхности контакта этих молекул, ослабить негативное воздействие колебаний температуры среды на активность ферментов, окруженных полиненасыщенными цепями, способствовать увеличению активности ферментов в случае общего повышения уровня метаболизма.

При температурах ниже температуры T_c полиненасыщенная цепь образует вытянутую конформацию [1], которая комплементарна себе

подобным или насыщенным цепям. Это должно ослаблять разрушительное влияние низких температур на мембранные структуры, поскольку упаковки цепей липидов, образуемые при глубоком охлаждении, будут свободны от высоких механических напряжений.

В липид-белковых взаимодействиях существенное значение имеет, разумеется, не только тип липидных молекул, но и структура конкретных белков. Описанная выше функция связана с изменением структуры сравнительно небольших молекул микроокружения ферментов, а не структуры белковых макромолекул, поэтому реагирование, например, гидробионтов на резкие изменения внешних условий может производиться весьма оперативно. С другой стороны, данная функция может служить примером проявления одного из фундаментальных механизмов биохимической адаптации – “адаптации на уровне микроокружения макромолекул” [29].

Литература

1. Рабинович А.Л., Рипатти П.О. // Успехи совр. биологии. 1994. Т. 114. № 5. С. 581-594.
2. Valentine R.C., Valentine D.L. // Prog. Lipid Res. 2004. V. 43. P. 383-402.
3. Allen M.P., Tildesley D.J. *Computer Simulation of Liquids*. Oxford: Clarendon Press, 1987. 385 p.
4. Sadus R.J. *Molecular Simulations of Fluids. Theory, Algorithms and Object-Oriented*. Amsterdam: Elsevier, 1999. 523 p.
5. *Monte Carlo and Molecular Dynamics Simulations in Polymer Science*. Ed. Binder K., N.Y.: Oxford University Press, 1995. 578 p.
6. Frenkel D., Smit B. *Understanding Molecular Simulation. From Algorithms to Applications*. San Diego: Academic Press, 1996. 443 p.
7. Wilkinson S.G. // In: *Microbial Lipids*. Ratledge C., Wilkinson S.G., eds. London: Academic Press, V.1, 1988. P. 299-488.
8. Murphy D.J. // Biochim. Biophys. Acta. 1986. V. 864. № 1. P. 33-94.
9. Bazan N.G., Gordon W.C., Rodriguez de Turco E.B. // In: *Neurobiology of Essential Fatty Acids*. Eds. Bazan N.G. et al. N.Y.: Plenum Press, 1992. P. 295-306.
10. Bazan N.G. // In: *Nutrition and the Brain*. V.8. Eds. R.J. Wurtman, J.J. Wurtman. N.Y.: Raven Press, Ltd. 1990. P. 1-24.
11. Anderson G.J., Connor W.E. // Lipids 1988. V. 23. № 4. P. 286-290.
12. Neill A.R., Musters C.J. // Biochem. J. 1972. V. 127. № 2. P. 375-385.
13. Shulman G.E., Love R.M. *The Biochemical Ecology of Marine Fishes. Advances in Marine Biology*, V.36. A.J. Southward, P.A. Tyler, C.M. Young, eds. San Diego etc.: Academic Press, 1999. 351 p.
14. Stillwell W., Wassall S.R. // Chem. Phys. Lipids. 2003. V.126. P.1-27.
15. Дашевский В.Г., Рабинович А.Л. // Высокомолек. соед. А. 1983. Т. 25. № 3. С. 544-550.
16. Rabinovich A.L. // Makromol. Chem. 1991. V. 192. № 2. P. 359-375.

17. Рабинович А.Л., Рипатти П.О. // Биол. мембраны. 1999. Т. 16. № 5. С. 563-576.
18. Rabinovich A.L., Ripatti P.O. // Proceedings of SPIE. 2001. V. 4348. P. 225-236.
19. Рабинович А.Л., Рипатти П.О. // Журн. физ. химии. 2002. Т. 76. № 11. С. 1997-2001.
20. Флори П. *Статистическая механика цепных молекул*. М.: Мир, 1971. 440 с.
21. Rabinovich A.L., Ripatti P.O., Balabaev N.K., Leermakers F.A.M. // Proc. SPIE. 2002. V. 4627. P. 141-153.
22. Rabinovich A.L., Ripatti P.O., Balabaev N.K., Leermakers F.A.M. // Phys. Rev. E. 2003. V.67. № 1. P. 011909_1-011909_14.
23. Рабинович А.Л., Рипатти П.О., Балабаев Н.К. // Журн. физ. химии. 2004. Т. 78. № 7. С. 1160-1165.
24. Rabinovich A.L., Balabaev N.K., Alinchenko M.G., Voloshin V.P., Medvedev N.N., Jedlovsky P. // J. Chem. Phys. 2005. V. 122. № 8. P. 084906_1-084906_12.
25. Рабинович А.Л. // Биофизика. 2008. Т. 53. Вып. 3. С.
26. Stubbs C.D., Smith A. D. // Biochim. Biophys. Acta. 1984. V. 779. № 1. P. 89-137.
27. Salem N., Jr., Kim H.-Y., Yergey J.A. // In: *The health effects of polyunsaturated fatty acids in seafoods*. A.P. Simopoulos, R.R. Kifer, R.E. Martin, eds. N. Y.: Acad. Press, 1986. P. 263-317.
28. Крепс Е.М. *Липиды клеточных мембран*. Л.: Наука, 1981. 339 с.
29. Хочачка П., Сомеро Дж. *Биохимическая адаптация*. М.: Мир, 1988. 568 с.
30. Cossins A.R., Macdonald A.G. // Biochim. Biophys. Acta. 1986. V. 860. № 2. P. 325-335.
31. Salmon A., Dodd S.W., Williams G.D., Beach J.M., Brown M.F. // J. Amer. Chem. Soc. 1987. V. 109. № 9. P. 2600-2609.
32. Koynova R., Caffrey M. // Biochim. Biophys. Acta. 1998. V. 1376. P. 91-145.
33. Stubbs C.D., Smith A.D. // Biochem. Soc. Transact. 1990. V. 18. P. 779-781.
34. Abood L.G., Salem N., Jr., MacNeil M., Bloom L., Abood M.E. // Biochim. Biophys. Acta. 1977. V. 468. P. 51-62.
35. Abood L.G., Salem N., Jr., MacNeil M., Batler M. // Biochim. Biophys. Acta. 1978. V. 530. P. 35-46.