

## ИЗУЧЕНИЕ МЕЛИТТИН-МЕМБРАННОГО КОМПЛЕКСА МЕТОДОМ ФЛЮОРЕСЦЕНТНОЙ СПЕКТРОСКОПИИ С ВРЕМЕННЫМ РАЗРЕШЕНИЕМ

А. С. Ладохин, Н. В. Лебедева, А. Ю. Чикишев

Бурный прогресс пикосекундной лазерной техники, наблюдаемый в последние годы, открыл новые возможности в исследовании быстрой динамики биологических объектов.

Настоящая работа посвящена изучению кинетики затухания собственной триптофановой флуоресценции мелиттина в водном растворе и в комплексе с фосфолипидными мембранами. Установлены существенные различия спектральных зависимостей среднего времени жизни флуоресценции тетрамерной формы мелиттина в растворе и мелиттина, встроенного в липосомы.

Мелиттин — основной компонент пчелиного яда — состоит из 26 аминокислотных остатков и содержит единственный триптофанил (Trp-19). В растворе мелиттин может существовать в форме неупорядоченного мономера (при низкой ионной силе) и в виде высокоспиральной упорядоченной тетрамерной структуры (при высокой ионной силе) [1]. Стационарный спектр флуоресценции и количество  $\alpha$ -спиралей у тетрамерного мелиттина в растворе и белка, встроенного в мембрану, близки [2].

Мелиттин получали согласно [3]. Липосомы из димиристоилфосфатидилхолина (ДМФХ) готовили озвучиванием. Работали в 50 мМ трис-НСl-буфере, pH 7,4, содержащем 2 М NaCl. Флуоресценцию регистрировали с помощью пикосекундного лазерного спектрофлуориметра, работающего в режиме однофотонного счета. Подробно экспериментальная установка описана в [4]. Длина волны возбуждения составляла 266 нм, полуширина аппаратной функции  $\sim 0,3$  нс. Кинетика затухания флуоресценции описывалась по биэкспоненциальному закону (интенсивность (время,  $t$ )  $\sim A_1 \exp(-t/\tau_1) + A_2 \exp(-t/\tau_2)$ ). Параметры такого описания для тетрамерного мелиттина в растворе и в комплексе с липидом приведены в таблице. Из этих данных следует, что затухание флуоресценции во всех случаях существенно немонотонноэкспоненциально. Этому противоречат данные Георгиоу и др. [5], что может быть связано с более низкими характеристиками спектрального и временного разрешения применяемой этими авторами установки. Причины такой немонотонноэкспоненциальности могут быть различными: структурная гетерогенность, наносекундные перестройки окружения хромофоров и т. д. В связи с этим весьма непросто, если возможно, приписывать какой-либо физический смысл быстрой и медленной компонентам затухания, и в дальнейшем мы будем оперировать средним временем жизни флуоресценции, определяемом следующим образом:

$$\langle \tau \rangle = \frac{A_1 \tau_1^2 + A_2 \tau_2^2}{A_1 \tau_1 + A_2 \tau_2}.$$

На рисунке приведены зависимости  $\langle \tau \rangle$  от длины волны регистрации излучения  $\lambda_{\text{ем}}$  для тетрамерного мелиттина в растворе и в комплексе с липосомами (темпера-

Параметры затухания собственной флуоресценции мелиттина  
Fluorescence decay parameters of melittin as a function of emission wavelength

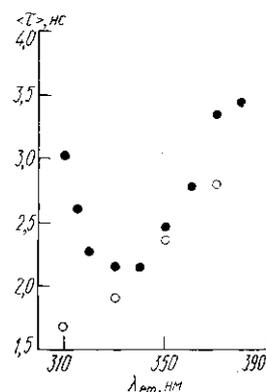
Мелиттин	Параметр	Длина волны регистрации излучения $\lambda_{\text{ем}}$ , нм			
		310	330	350	370
Тетрамер, 2М NaCl, 40 °С	$\tau_1$ , нс	2,61	3,16	4,45	4,97
	$\tau_2$ , нс	0,86	1,11	1,40	1,37
	$A_1/A_2$	0,28	0,23	0,14	0,18
Комплекс с ДМФХ-липосомами, $R_1^* = 200$ , 2 М NaCl, 29 °С	$\tau_1$ , нс	4,46	4,04	5,20	6,50
	$\tau_2$ , нс	1,16	1,20	1,22	1,33
	$A_1/A_2$	0,34	0,15	0,11	0,13

\*  $R_i$  — молярное отношение липид/белок.

тура выше температуры фазового перехода в липиде). Видно, что характер этих зависимостей принципиально различен. Для тетрамера в растворе характерно монотонное возрастание  $\langle \tau \rangle$  с увеличением  $\lambda_{em}$ . Этот эффект может объясняться проявлением наносекундной дипольно-ориентационной релаксации окружения триптофанов, наличие которой установлено как стационарными [3], так и кинетическими [6] спектроскопическими методами. Напротив, для мелиттина, встроенного в мембрану, зависимость  $\langle \tau \rangle$  от  $\lambda_{em}$  имеет явно выраженный минимум при 335 нм. Возможное объяснение такой зависимости может быть следующим. Структура мелиттин-мембранного комп-

Спектральная зависимость среднего времени жизни флуоресценции  $\langle \tau \rangle$  для тетрамерного мелиттина в растворе и комплекса мелиттина с ДМФХ-липосомами (светлые и темные кружки соответственно)

Spectral dependence of the mean fluorescence lifetime  $\langle \tau \rangle$  for tetrameric melittin in solution (O) and bound to liposomes (●)



лекса гетерогенна (что подтверждается данными по тушению флуоресценции йодидом [7]):

— возрастание  $\langle \tau \rangle$  на длинноволновом краю спектра определяется дипольно-ориентационной релаксацией окружения триптофанов, локализованных в более полярной области (аналогично тетрамеру в растворе);

— триптофаны, локализованные во внутренней неполярной области, имеют более коротковолновое излучение и меньшую безызлучательную дезактивацию (т. е. большое время жизни). Фотоотбор этого класса хромофоров и приводит к увеличению среднего времени  $\langle \tau \rangle$  на коротковолновом краю спектра.

Полученные результаты свидетельствуют о принципиальном различии кинетических флуоресцентных параметров, а, следовательно, и структурно-динамической организации тетрамерного мелиттина в растворе и комплекса мелиттина с мембраной. Выявление этих различий стало возможным благодаря уникальному пикосекундному лазерному спектрофлуориметру, сочетающему высокое временное разрешение с удобным для белковой спектроскопии возбуждением (266 нм).

Авторы глубоко признательны Е. Г. Костржевской и Г. А. Корнейчук, без помощи которых эта работа была бы невозможна.

#### STUDY OF MELITTIN-MEMBRANE COMPLEX BY TIME-RESOLVED FLUORESCENCE SPECTROSCOPY

A. S. Ladokhin, N. V. Lebedeva, A. Yu. Chikishev

A. V. Palladin Institute of Biochemistry,  
Academy of Sciences of the Ukrainian SSR, Kiev  
M. V. Lomonosov State University, Moscow

#### Summary

Structural dynamics of tetrameric melittin in solution and of the melittin-phospholipid membrane complex was studied by time-resolved fluorescence spectroscopy. Significant differences in the spectral dependences of the mean tryptophan fluorescence lifetime of protein in solution and in the complex with liposomes were established.

1. Conformational change and self-association of monomeric melittin / J. C. Talbot, J. Dufourcq, J. de Vony et al. // FEBS Lett.—1979.—102, N 1.—P. 191—193.
2. Демченко А. П., Костржевская Е. Г. Мелиттин: структура, свойства, взаимодействие с мембраной // Укр. биохим. журн.—1986.—58, № 5.—С. 92—103.
3. Структурно-динамические свойства окружения триптофанового остатка в мелиттине / А. П. Демченко, А. С. Ладохин, Е. Г. Костржевская, Т. Л. Диброва // Молекуляр. биология.—1987.—21, № 3.—С. 663—671.
4. Лазерный субнаносекундный флуоресцентный спектрометр со счетом одиночных фотонов / В. Ф. Камалов, А. П. Разживин, Б. Н. Толеутаев и др. // Квантовая электроника.—1987.—14, № 6.—С. 1303—1308.

5. *Georgioui S., Thompson M., Mukhopadhyay A. K.* Melittin-phospholipid interaction studied by employing the single tryptophan residue as an intrinsic fluorescent probe // *Biochim. et biophys. acta.*—1982.—688, N 2.— P. 441—452.
6. *Камалов В. Ф., Ладохин А. С., Толугаев Б. Н.* Наносекундная внутримолекулярная динамика мелиттина // Докл. АН СССР.—1987.—296, № 3.— С. 742—745.
7. *Ладохин О. С., Костржевська О. Г., Демченко О. П.* Взаємодія меліттину з фосфоліпідним бішаром. «Поверхнева» і «внутрішня» форми білка // Доп. АН УРСР.—1988.— № 11.— С. 65—68.

Ин-т биохимии им. А. В. Палладина АН УССР, Киев  
МГУ им. М. В. Ломоносова

Получено 20.06.88

УДК 577.113.4

## МЕТИЛФОСФОНАТНЫЕ АЛКИЛИРУЮЩИЕ ПРОИЗВОДНЫЕ ОКТАТИМИДИЛАТА

Н. В. Амиранов, В. Ф. Зарытова

Серьезным недостатком олигонуклеотидов с природной фосфодиэфирной связью и их реакционноспособных производных, используемых для направленного воздействия на генетический аппарат клетки [1, 2], является их плохое проникновение через цитоплазматические мембраны и подверженность гидролизу клеточными нуклеазами [3]. Более перспективным с этой точки зрения является использование неионных аналогов олигонуклеотидов, особенно метилфосфонатных [3—9]. Однако реакционноспособные производные последних не были получены и их свойства не исследовались. Поскольку введение метилфосфонатных группировок в олигонуклеотид приводит к образованию смеси диастереомеров, способных образовывать комплементарные комплексы различной стабильности [7, 8], то изучение влияния таких группировок на реакционную способность аналогов необходимо проводить на индивидуальных изомерах. Из реакционноспособных аналогов олигонуклеотидов наиболее широко изучены алкилирующие, содержащие остаток 4-[(N-2-хлорэтил, N-метил)амино]бензиламина (C1RCH<sub>2</sub>NH-), производные.

Целью данной работы было получение индивидуальных диастереомеров алкилирующих (содержащих C1RCH<sub>2</sub>NH-остаток) производных октатимидилата, включающих три чередующиеся метилфосфонатные группировки, и исследование свойств полученных аналогов.

Нами были получены пять октатимидилатных производных: (Tr)<sub>8</sub>R<sub>1</sub> (I); Tr(TrTr)<sub>3</sub>TrR<sub>1</sub> (II); Tr(TrTr')<sub>3</sub>TrR<sub>1</sub> (III); Tr(TrTr'')<sub>3</sub>TrR<sub>1</sub> (IV) и Tr(Tr)<sub>6</sub>TrR<sub>1</sub> (V) (где R<sub>1</sub> = а) — SCH<sub>3</sub>, б) — OH, в) — NHCH<sub>2</sub>RCI; р — фосфодиэфирный остаток, р' — метилфосфонатный остаток), исходя из полностью защищенных динуклеотидов: (MeO)<sub>2</sub>TrTr(SCH<sub>3</sub>)Tr(SCH<sub>3</sub>, CNEt) (VI), (MeO)<sub>2</sub>TrTr(CH<sub>3</sub>)Tr(SCH<sub>3</sub>, CNEt) (VII), (MeO)<sub>2</sub>TrTr'(CH<sub>3</sub>)Tr(SCH<sub>3</sub>, CNEt) (VIIa), (MeO)<sub>2</sub>TrTr''(CH<sub>3</sub>)Tr(SCH<sub>3</sub>, CNEt) (VIIб), (MeO)<sub>2</sub>TrTr(SCH<sub>3</sub>)Tr(CH<sub>3</sub>, CNEt) (VIII) и (MeO)<sub>2</sub>TrTr(CH<sub>3</sub>)Tr(CH<sub>3</sub>, CNEt) (IX). Динуклеотиды были синтезированы по обычной триэфирной схеме [10] с использованием в качестве конденсирующего реагента смеси TPS (0,3 M) и MeIm (0,6 M) в абсолютном пиридине (20 °С, 30—60 мин) при 0,1 M концентрациях нуклеозидного и нуклеотидного компонентов. Полученные динуклеотиды выделены хроматографией на силикагеле. Динуклеотид (VII), содержащий два асимметричных атома фосфора и соответственно четыре изомера с помощью препаративной силикагелевой хроматографии разделяли на два продукта, которые обозначены как р' ((VIIa), R<sub>(MeO)<sub>2</sub>TrTr</sub> = 0,82; <sup>31</sup>P-ЯМР; б = 32,2; 30,2; 30,0 м. д.) и р'' ((VIIб), R<sub>(MeO)<sub>2</sub>TrTr</sub> = 0,72;

Сокращения: (MeO)<sub>2</sub>Tr — *n, n'*-диметокситригитил; CNEt — 2-цианэтил; TPS — 2,4,6-триизопропилбензолсульфохлорид; MeIm — N-метилимидазол; TEA — триэтиламин; (PyS)<sub>2</sub> — 2,2'-дипиридилдисульфид; RCI — C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>N-(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Cl; р' и р'' — энантиомерные конфигурации заместителей при атоме фосфора (см. в тексте). Символ d в обозначениях нуклеотидов опущен, так как использовались только нуклеотиды дезоксирибы.