

ИЗСЛЕДВАНЕ НА ВЗАИМОДЕЙСТВИЕТО МЕЖДУ СИНТЕТИЧНИ ЕНКЕФАЛИНИ И ФИЛМИ, СЪСТАВЕНИ ОТ РАФТОВИ ЛИПИДИ

Ася Цанова*, Албена Йорданова*, Тамара Пайпанова**, Евгени Головински**,
Здравко Лалчев***

*Медицински факултет, Софийски университет „Св. Климент Охридски“, 1407 София,
България, *assja_t@yahoo.com*

**Институт по молекулярна биология, БАН, 1113 София, България

***Биологически факултет, Софийски университет „Св. Климент Охридски“, 1164 София,
България

STUDY OF THE INTERACTION BETWEEN SYNTHETIC ENKEPHALINS AND FILMS COMPOSED OF RAFT LIPIDS

Asya Tsanova*, Albena Jordanova*, Tamara Pajpanova**, Evgeny Golovinsky**,
Zdravko Lalchev***

*Faculty of Medicine, St. Kliment Ohridsky University of Sofia, 1407 Sofia, Bulgaria,
assja_t@yahoo.com

**Institute of Molecular Biology, BAS, 1113 Sofia, Bulgaria

***Faculty of Biology, St. Kliment Ohridsky University of Sofia, 1164 Sofia, Bulgaria

ABSTRACT

Enkephalins are pentapeptides (Tyr-Gly-Gly-Phe-Met/Leu) with proven antinociceptive action in organism. They are neurotransmitters found in the central nervous system, which interact with opioid receptors in order to play their biological action. Enkephalin receptors belong to G-protein coupled receptors. It is known that these receptors are located in membrane rafts. Moreover, it is believed that in order to achieve conformation for binding to opioid receptors enkephalins interact with the lipid phase of the membranes. In the present work by using Langmuir's monolayer technique in combination with Wilhelmy's method for measuring the surface pressure, the interaction between synthetic enkephalins and monolayers composed of the raft lipids palmitoyl oleoyl phosphatidyl choline, sphingomyelin, cholesterol, as well as their double and triple mixtures was studied. From the pressure-area isotherm measured, the compressional modulus of the lipids and lipids-peptides monolayers was determined. Our results showed that the addition of the synthetic enkephalins to the monolayers studied led to change in the lipid monolayers characteristics. This observation demonstrated that there was an interaction between the peptides and the raft lipids.

Keywords: *enkephalins, raft lipids, Langmuir monolayers, compressional modulus*

УВОД

За въвеждането на ново лекарство в клиничната практика са необходими много години. Ето защо е важно при предклиничните изследвания моделните системи и използваните методи да са лесни и удобни за работа и същевременно да са достатъчно информативни. Монослойната техника на Лангмуир е подходящ метод, който би могъл да се използва като първа стъпка на предклинични изследвания за нови биологично активни молекули, които осъществяват функцията си чрез взаимодействие с клетъчната мембрана.

В последните десетилетия, след откриването на енкефалините през 1975 г. ендогенните опиоидни пептиди будят интерес заради тяхното доказано антиноцицептивно действие [5]. Изследва се механизмът на тяхното действие, като в допълнение опиоидите се модифицират, за да се повиши резистентността им при фармакологичното им администриране.

Енкефалините (Tyr-Gly-Gly-Phe-(Met or Leu)) са невротрансмитери, установени в централната нервна система при човек, особено в участъците, свързани с болковите пътища

[9, 12]. В допълнение към аналгетичното им действие, енкефалините участват и в йонния транспорт в гастроинтестиналния тракт [2], във възпалението и имунния отговор [17], в запаметяването [6] и др.

В литературата има ограничена информация за точните молекулни механизми на взаимодействие между енкефалините и биологичните мембрани. За да осъществят биологичната си функция, невропептидите трябва да се транспортират от водна фаза до липидното обкръжение на мембранните си рецептори [13]. Счита се, че те взаимодействат с мембраната на нервната клетка, за да добият правилна конформация за свързване с рецепторите [1]. Според този модел, наречен „мембранна катализа“, полярните глави на липидите взаимодействат с тези амфибилни пептиди, което води до тяхната биологично активна конформационна промяна [15]. Известно е, че Метионин-енкефалините (Met-enk) действат чрез три основни опиоидни рецептори: μ -, δ - и κ -, както и ζ -рецептори, които са свързани с G-протеини [14]. В допълнение е известно, че този тип рецептори, включително и опиоидните, се локализируют преимуществено в т.нар. мембранни рафтове [7,8], които се състоят от сфингомиелин, холестерол и фосфатидилхолин [3, 4].

До момента липсват достатъчно литературни данни за влиянието на изкуствено създадени невропептиди върху мембраните, поради което изследването на взаимодействието между синтетични енкефалини и липидни моделни мембрани, като Лангмюировите монослое, е от съществен интерес. Целта на представената работа е да се изследва влиянието на изкуствено създаден Met-enk върху физикохимичните характеристики на монослое, съставени от рафтовете липиди палмитоолеоилфосфатидилхолин (POPC), сфингомиелин (Sm) и холестерол (Cho), както и от техни смеси.

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

Метионин-енкефалинът е синтезиран в Лабораторията по биоактивни пептиди, ИМБ, БАН. POPC, Sm и Cho са закупени от Sigma-Aldrich.

Всички измервания са осъществени в Лангмюирова везна MicroTrough X (Kibron Inc., Finland). Везната на Лангмюир се състои от вана, в която, с помощта на микроспринцовка тип Hamilton, върху подложка от 0.15 M NaCl се формират монослоеве от POPC, Sm, Cho и техни предварително формиранни еквилярни двойни и тройни смеси, разтворени в хлороформ. Апаратът използва метода на Wilhelmy за измерване на повърхностното налягане на течности чрез платинена игла, потопена в течната субфаза и свързана с прецизна везна, като се измерва силата, с която иглата се притегля от подложката. След изпаряване на разтворителя, под формирания монослой се инжектира Met-enk, разтворен във физиологичен разтвор, до крайна концентрация 0.1 mM и с помощта на подвижни бариери пептид-липидният филм се компресира до 20 % от първоначалната площ. Получените резултати са представени под формата на изотерми повърхностно налягане (π , mN/m)/площ за молекула (A , Å²/molecule). От π/A -изотермите за всеки от изследваните монослое са изчислени модулите

на компресия, посредством формулата:

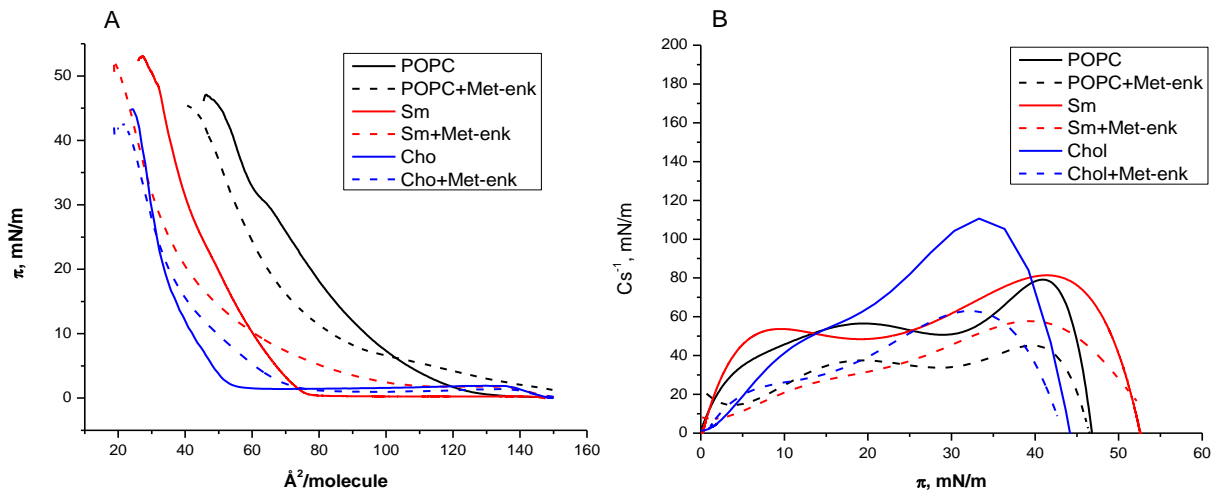
$$Cs^{-1} = -A_{\pi} \left(\frac{d\pi}{dA} \right)_T.$$

РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЯ

Изследвано е влиянието на синтетичен Метионин-енкефалин върху компресионните π/A -изотерми и еластичността на монослое, съставени от рафтовете липиди POPC, Sm и Cho, самостоятелно и след инжектирането на пептидите към техни двойни и тройни смеси.

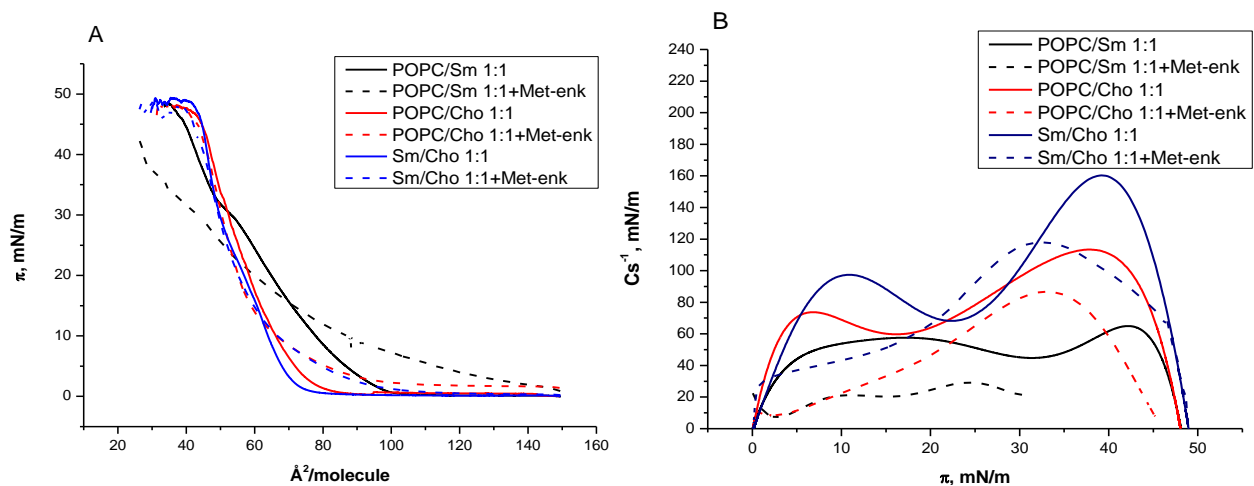
Получените резултати показват, че добавянето на пептида към всички изследвани монослое влияят върху компресионните π/A -изотерми, което е по-силно изразено при пониски стойности на повърхностно налягане, съотв. при по-режав монослой (Фиг. 1А, 2А и 3А). При всички анализирани изотерми се вижда, че преходът от много режав монослой

(газово фазово състояние) към течно-неподредено фазово състояние, след добавянето на Met-enk не е ясно изразен и компресията започва от по-високо повърхностно налягане.



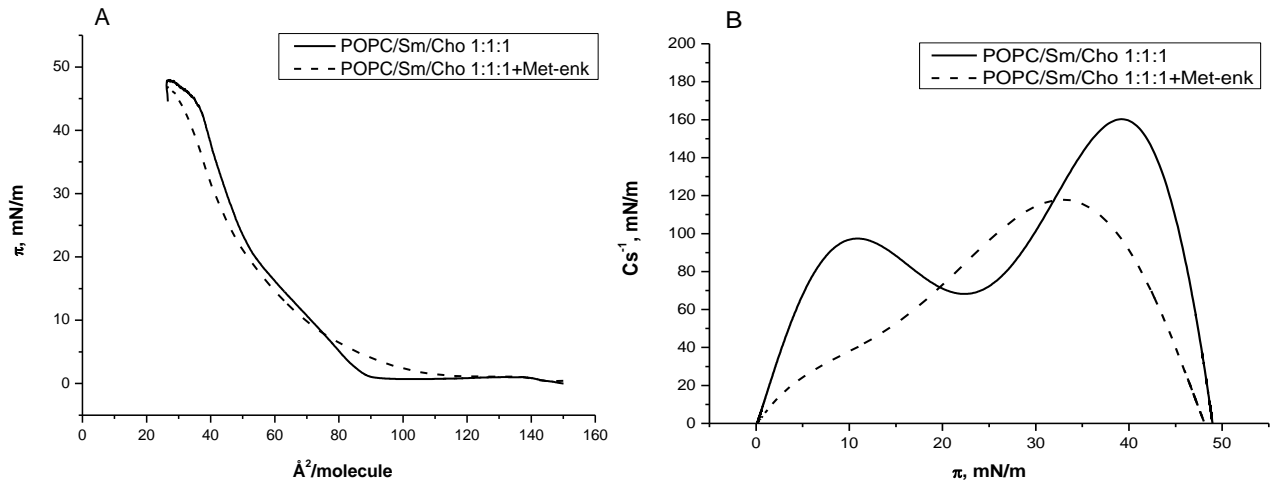
Фигура 1. Компресионна π/A -изотерма (A) и модул на еластичност (B) на липидни монослое, съставени от POPC, Sm и Cho самостоятелно и след инжектиране на Метионин-енкефалин (0,1mM).

В допълнение, сравнявайки мономолекулните монослое, с двуконпонентните липидни монослое, се вижда, че при първите промяната в изотермите е по-изразена (Фиг. 1A и 2A). При двойните смеси, инжектирането на невропептида към Sm/Cho-монослой води до незначителен ефект, което е логично, тъй като двата липида проявяват силен афинитет един към друг и водят до формиране на домейни в течно-подредено състояние, т.е. „втвърдяват“ монослоеве [16] и не представят достатъчно свободна площ за проникване на енкефалиновите молекули. Подобен слаб ефект се наблюдава и при π/A -изотермата на тройната липидна смес (Фиг. 3A), тъй като очаквано тази рафтова композиция, също формира течно-подредени домейни с висок афинитет между отделните компоненти [3,4].



Фигура 2. Компресионна π/A -изотерма (A) и модул на еластичност (B) на липидни монослое, съставени от двойни смеси на POPC, Sm и Cho самостоятелно и след инжектиране на Метионин-енкефалин (0,1mM).

При високи стойности на π при всички компресионни изотерми взаимодействието между липидните монослое и изследваните от нас невропептиди е по-слабо изразено, което е логично, поради по-плътната опаковка на липидите.



Фигура 3. Компресионна π/A -изотерма (A) и модул на еластичност (B) на липидни монослое, съставени от тройна смес на POPC, Sm и Cho самостоятелно и след инжектиране на Метинин-енкефалин (0,1mM).

Получените от изотермите резултати показват, че енкефалините проникват в липидните моделни мембрани, когато те са в течно-неподредено фазово състояние. Изразените до този момент хипотези се потвърждават и от анализа на изчислените модули на компресия и зависимостта им от повърхностното налягане.

Според литературата стойностите на модула на компресия под 100 mN/m съответстват на ниска степен на подреденост на опашките на липидните молекули, изграждащи монослоеве, докато по-високите стойности на този параметър демонстрират намаляване на еластичността на съответния монослой, т.е. плътна опаковка на хидрофобните части на молекулите [11].

По отношение еластичността на монослоеве, ефектът от добавянето на пептидите е по-значим, в сравнение с данните от π/A -изотермите (Фиг. 1B, 2B и 3B). При еднокомпонентните монослоеве еластичността слабо се увеличава след инжектирането на енкефалините, като в същото време фазовите преходи се изместват към по-високи стойности на повърхностно налягане. [10].

При двойните и тройната липидни смеси, в допълнение към повишаването на латералната еластичност, т.е. намаляването на стойността на модула на компресия при добавяне на Met-enk, в сравнение с чистите липидни монослоеве, първият пик от графиката, характеризираща двукомпонентните липидни филми, става почти незабележим (Фиг. 2B и 3B). „Изглаждането“ на първия пик отразява липсата на ясно изразен фазов преход, установен от π/A -изотермата, което потвърждава липид-пептидното взаимодействие при ниски стойности на повърхностно налягане. По-ниските стойности на модула на компресия от своя страна, вероятно се дължат на навлизане на пептидните молекули в монослоеве, което води до неподреденост на въглеродните им опашки и следователно, до засилен флуидитет на съответните смесени моделни мембрани.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Получените резултати демонстрират потенциала на липидните Лангмуирови монослоеве да бъдат успешно прилагани като елегантен и прост метод за изследване на липид-пептидните взаимодействия на въздушно-водната фазова граница.

БЛАГОДАРНОСТИ: Изследването е осъществено с финансовата подкрепа на Фонд “Научни изследвания”, СУ “Св. Климент Охридски”, проект № 46/13.

ЦИТИРАНА ЛИТЕРАТУРА

1. Behnam, B.A., C.M. Deber, 1984. Evidence for a folded conformation of methionine- and leucine-enkephalin in a membrane environment, *Journal of Biological Chemistry*, 259, 14935-14940.
2. Cheng, P.Y., L.Y. Liu-Chen, C. Chen, V.M. Pickel, 1996. Immunolabeling of mu opioid receptors in the rat nucleus of the solitary tract: extrasynaptic plasmalemmal localization and association with Leu5-enkephalin, *Journal of Comparative Neurology*, 371, 522-536.
3. De Almeida, R.F.M., A. Fedorov, M. Prieto, 2003. Sphingomyelin/Phosphatidylcholine/Cholesterol Phase Diagram: Boundaries and Composition of Lipid Rafts, *Biophysical Journal*, 85, 2406.
4. Frazier, M.L., J.R. Wright, A. Pokorny, P.F.F. Almeida, 2007. Investigation of domain formation in sphingomyelin/cholesterol/POPC mixtures by fluorescence resonance energy transfer and Monte Carlo simulations, *Biophysical Journal*, 92, 2422.
5. Fuxe, K., L.F. Agnati, M. Zoli, A. Cintra, A. Harstrand, G. von Euler, R. Grimaldi, M. Kalia, P. Eneroth, 1988. In: *Regulatory Roles of Opioid Peptides* (P. Illes, C. Farsang, Eds.), VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, 33-68.
6. Gallagher, M., R.A. King, N.B. Young, 1983. Opiate antagonists improve spatial memory. *Science*, 221, 975-976.
7. Huang, P., W. Xu, S.I. Yoon, C. Chen, P.L. Chong, L.Y. Liu-Chen, 2007. Cholesterol reduction by methyl-beta-cyclodextrin attenuates the delta opioid receptor-mediated signaling in neuronal cells but enhances it in non-neuronal cells, *Biochemical Pharmacology*, 73, 534-549.
8. Huang, P., C. Chen, W. Xu, S.I. Yoon, E.M. Unterwald, J.E. Pintar, Y. Wang, P.L. Chong, L.Y. Liu-Chen, 2008. Brain region-specific N-glycosylation and lipid rafts association of the rat mu opioid receptor, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 365, (2008) 82-88.
9. Hucho, F., 1986. *Neurochemistry: Fundamentals and Concepts*. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim.
10. Hoda, K., H. Kawasaki, N. Yoshino, C.-H. Chang, Y. Morikawa, G. Sugihara, O. Shibata, 2006. Mode of interaction of two fluorinated-hydrogenated hybrid amphiphiles with dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) at the air-water interface, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 53, 37-50.
11. Kodama, M., O. Shibata, S. Nakamura, S. Lee, G. Sugihara, 2004. A monolayer study on three binary mixed systems of dipalmitoyl phosphatidyl choline with cholesterol, cholestanol and stigmaterol, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 33, 211.
12. Kruk, Z.L., C.J. Pycock, 1991. *Neurotransmitters and Drugs*. Chapman and Hall, London.
13. Liu, S., A. Shibata, S. Ueno, F. Xu, Y. Baba, D. Jiang, Y. Li, 2006. Investigation of interaction of Leu-enkephalin with lipid membranes, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 48:148-58.
14. Malendowicz, L.K., P. Rebuffat, C. Tortorella, G.G. Nussdorfer, A. Ziolkowska, A. Hochol, 2005. Effects of met-enkephalin on cell proliferation in different models of adrenocortical-cell growth, *International Journal of Molecular Medicine*, 15(5), 841-845.
15. Marcotte, I., E.J. Dufourc, M. Ouellet, M. Auger, 2003. Study of the interaction of the neuropeptide Met-enkephalin with modified bicelles by ³¹P and ²H solid-state NMR spectroscopy. *Biophysical Journal*, 85, 328-339.
16. Paweł, W., 2012. Sphingomyelin/phosphatidylcholine/cholesterol monolayers – analysis of the interactions in model membranes and Brewster Angle Microscopy experiments, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 93, 174-179
17. Shipp, M.A., G.B. Stefano, S.N. Switzer, J.D. Griffin, E.L. Reinherz, 1991. CD10 (CALLA)/neutral endoprotease 24.11 modulates inflammatory peptide-induced changes in neutrophil morphology, migration, and adhesion proteins and is itself regulated by neutrophil activation. *Blood*, 78, 1834-1841.