

На правах рукописи

Храмцов Юрий Викторович

**ИЗУЧЕНИЕ САМОСБОРКИ МЕМБРАН
В ТЕРМОЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ
ЛИПИД-ДЕТЕРГЕНТНЫХ СИСТЕМАХ**

Специальность: 03.01.02. – “Биофизика”

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени кандидата
физико-математических наук

Москва – 2011

Работа выполнена на кафедре физико-химической биологии и биотехнологии
Московского физико-технического института

Научный руководитель: кандидат химических наук
Барсуков Леонид Иванович
(ИБХ им. акад. М. М. Шемякина и
Ю. А. Овчинникова РАН)

Официальные оппоненты: доктор физико-математических наук
Ефремов Роман Гербертович
(ИБХ им. акад. М. М. Шемякина и
Ю. А. Овчинникова РАН),
доктор химических наук,
доктор биологических наук
Зайцев Сергей Юрьевич
(МГАВМиБ им. К. И. Скрябина)

Ведущая организация: Московская государственная академия тонкой
химической технологии им. М. В. Ломоносова
(Технологический университет)

Защита состоится «26» мая 2011 года в 14 часов на заседании
Диссертационного совета Д 501.001.96 при Московском государственном
университете им. М. В. Ломоносова по адресу: 119991, Россия, Москва,
Ленинские горы 1/12, МГУ, биологический факультет, кафедра биофизики,
аудитория "Новая".

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке биологического факультета
Московского государственного университета имени М. В. Ломоносова

Автореферат разослан « ____ » апреля ____ 2011 г.

Ученый секретарь
Диссертационного совета
кандидат биологических наук



М. Г. Страховская

Общая характеристика работы

Актуальность темы. Изучение процессов самосборки мембран в смешанных липид-детергентных системах является важной и актуальной проблемой биофизики мембран. Современные представления о структуре и функциях биологических мембран сформировались, во многом, благодаря введению в практику мембранных исследований методов солюбилизации и реконструкции мембран. Образующиеся в результате солюбилизации мембран детергентами термодинамически стабильные мицеллярные растворы исключительно удобны для исследования разнообразными физико-химическими методами. Эти растворы могут быть также использованы для выделения индивидуальных мембранных белков с целью изучения их строения и функциональной активности. Поскольку подавляющее большинство мембранных белков требуют полноценного мембранного окружения для проявления своей функциональной активности, принципиально важное значение приобретают такие методы реконструкции, которые позволяют получать искусственные мембраны с заданным составом, требуемой структурной организацией и необходимыми функциональными свойствами.

В основе процесса самосборки мембран при реконструкции лежит структурный переход между наноразмерными мицеллярными частицами и более крупными (порядка сотен нанометров) мембранными везикулами, обычно называемый переходом мицеллы–везикулы. Ранее проведенные исследования показали, что этот переход протекает с образованием ряда промежуточных надмолекулярных частиц, имеющих различное строение и морфологию. Однако, несмотря на широкое практическое применение данного перехода для реконструкции мембран, его молекулярные механизмы недостаточно изучены и нет определенной ясности и четкого представления о том, действие каких факторов является решающим на отдельных этапах самосборки мембран. Механизмы перехода мицеллы-везикулы удобнее всего изучать в термочувствительных липид-детергентных системах, где его можно индуцировать путём простого изменения температуры. Это позволяет лучше контролировать данный переход, а в изотермическом режиме изучить образующиеся промежуточные структуры.

При изучении самосборки надмолекулярных агрегатов важно понимать, как природа используемых амфифильных молекул определяет строение данных агрегатов. Наиболее простой и наглядный подход к решению данной задачи состоит в изучении упаковки молекул в этих агрегатах, описываемой набором геометрических параметров. Однако, некоторые из этих параметров довольно сложно, а порой и невозможно определить экспериментально, особенно в случае смешанных липид-детергентных систем. Тем не менее, ранее проведенные исследования показали, что даже приблизительные оценки этих параметров во многих случаях позволяют качественно, а иногда и количественно описать структурное поведение различных амфифильных систем. Поэтому важно иметь достаточно простой подход к их количественному определению. Изучение термоиндуцируемого перехода

мицеллы-везикулы в смешанных липид-детергентных системах позволяет разработать такой подход. Однако, процесс самосборки мембран в данных системах зависит от действия целого ряда факторов, во многом ещё не изученных и не систематизированных. Так, например, было не ясно, как природа детергента и липида влияет на характер перехода мицеллы-везикулы, т.к. систематические исследования в этом направлении до сих пор не были проведены.

Цель исследования заключалась в качественном и количественном описании процесса самосборки мембран в термочувствительных липид-детергентных системах.

Необходимо было решить следующие **задачи**:

- выявить основные факторы, определяющие процесс самосборки мембран в термочувствительных липид-детергентных системах;
- изучить влияние структуры липидных и детергентных молекул на характер термоиндуцируемого перехода мицеллы-везикулы в смешанных липид-детергентных системах различного типа;
- изучить тепловые процессы, протекающие в термочувствительных липид-детергентных системах при нагревании, и установить их связь с происходящими при этом структурными превращениями;
- разработать математическую модель перехода мицеллы-везикулы с целью определения параметров молекулярной упаковки и предсказания условий самосборки мембран в смешанных липид-детергентных системах.

Научная новизна работы. Впервые проведено систематическое изучение влияния природы липида и детергента на процесс самосборки мембран в термочувствительных липид-детергентных системах. При этом, были использованы как ионные, так и неионные детергенты с различными размерами полярной головки и объёмом гидрофобной части, а также фосфатидилхолины, отличающиеся длиной и степенью ненасыщенности жирнокислотных цепей. Впервые показано, что самосборка мембран в термочувствительных липид-детергентных системах может быть индуцирована не только изменением состава смешанных агрегатов, но и изменением размера полярной головки детергента. Новым фактом является то, что на самосборку мембран существенное влияние оказывает также строение углеводородных цепей липида и детергента. Для смесей, содержащих соли желчных кислот, обнаружено поглощение тепла в ходе термоиндуцируемого перехода мицеллы-везикулы и предложена молекулярная модель, описывающая этот процесс.

Предложен новый способ определения температурной зависимости состава смешанных липид-детергентных агрегатов в условиях перехода мицеллы-везикулы. Данные зависимости и разработанная математическая модель, описывающая переход мицеллы-везикулы, позволили определить температурную зависимость площади, приходящейся на одну молекулу детергента на границе раздела фаз, и предсказать условия, необходимые для формирования смешанных мембранных везикул.

Практическая значимость работы. Данные, полученные в представленной работе, могут быть использованы для оптимизации процесса самосборки мембран с требуемыми структурными и функциональными характеристиками, а также для более эффективного контроля включения в везикулы лекарственных препаратов и других веществ, что может найти широкое применение в молекулярной биологии, биотехнологии, медицине, химической и пищевой промышленности и косметологии. В нанотехнологии полученные данные могут быть использованы для целенаправленного создания наноразмерных липид-детергентных агрегатов необходимого строения и состава. Полученные данные о термоиндуцируемом переходе мицеллы-везикулы могут быть использованы для разработки новых систем доставки лекарственных препаратов, позволяющих осуществить контролируемое высвобождение этих препаратов путём простого изменения температуры. Кроме того, их можно применить при анализе условий формирования промежуточных структур этого перехода, например, бицелл – смешанных бислойных липид-детергентных агрегатов, способных ориентироваться в магнитном поле и широко применяющихся для структурного исследования белков с помощью метода ядерного магнитного резонанса. Полученные значения площади, приходящейся на одну молекулу детергента, могут оказаться полезными не только при изучении процесса самосборки мембран, но и при моделировании строения липид-детергентных агрегатов, при анализе межмолекулярных взаимодействий в этих агрегатах, а также при изучении связывания липидов и детергентов с интегральными мембранными белками.

Апробация работы. Основные результаты, изложенные в диссертации, докладывались и обсуждались на XLII, XLIII XLV научных конференциях МФТИ (Москва-Долгопрудный, 1999, 2000, 2002), XIII-XV международных молодежных научных школах «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» (Москва, 2001-2003), III съезде биохимического общества (Санкт-Петербург, 2002) и VI чтениях, посвященных памяти Ю.А. Овчинникова (Москва-Пушино, 2002). Работа также докладывалась в рамках семинаров кафедры физико-химической биологии и биотехнологии факультета молекулярной и биологической физики МФТИ.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 8 печатных работ, из них 3 в научных российских журналах по списку ВАК, а 5 в тезисах всероссийского съезда и международных школ и чтений.

Структура и объём диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов исследований и их обсуждения, выводов и списка литературы, включающего 227 наименований. Работа изложена на 150 страницах с 45 рисунками и 6 таблицами.

Сокращения, принятые в работе. ХН – холат натрия, ДХН – дезоксихолат натрия, ХДХН – хенодезоксихолат натрия, 5 β -Хол – 5 β -холановая кислота, ДСН – додецилсульфат натрия, ОГ – октилглюкозид, Хол – холестерин, C_nE_m – алкильные эфиры полиэтиленгликоля, яФХ – яичный фосфатидилхолин, ДМ –

додецилмальтозид, ДМФХ – димиристоилфосфатидилхолин, ДПФХ – дипальмитоилфосфатидилхолин, ДСФХ – дистеароилфосфатидилхолин, ККМ – критическая концентрация мицеллообразования, ДСК – дифференциальная сканирующая калориметрия, SD – среднее квадратичное отклонение, r – коэффициент корреляции.

Содержание диссертации

1. Введение

Рассмотрена актуальность изучения самосборки мембран в термочувствительных липид-детергентных системах. Обоснованы практическая ценность и новизна полученных результатов диссертационной работы, а так же указаны её цели и задачи.

2. Структурные превращения в системах, содержащих амфифильные соединения (обзор литературы)

В первой части обзора рассмотрены современные представления о структурообразовании в однокомпонентных амфифильных системах. Тип агрегатов можно описать как средней кривизной их поверхности, так и безразмерным параметром молекулярной упаковки, задаваемым средними параметрами геометрической упаковки амфифильных молекул. Описано, как на них влияют рН, ионная сила, давление, гидратация и температура.

Во второй части обзора рассмотрены структурные превращения в смешанных липид-детергентных системах. Сначала рассмотрена сольюбилизация липидных мембран детергентом. Описаны свойства широко используемых детергентов, а также взаимодействие этих детергентов с липидной фазой. Рассмотрены два предполагаемых механизма сольюбилизации липидных мембран детергентом. Согласно одному из них, в процессе сольюбилизации сложных промежуточных структур не образуется, а в смеси сосуществуют смешанные мицеллы и насыщенные детергентом везикулы. Однако, наиболее вероятным является другой механизм, согласно которому морфология агрегатов изменяется более плавно с образованием различных промежуточных структур, таких как плоские бислойные агрегаты и сетчатые мицеллярные структуры. Затем рассмотрен переход мицеллы-везикулы в смешанных липид-детергентных системах. Описаны два предлагаемых механизма этого перехода. Согласно одному из них, сначала из мицелл образуются мембранные фрагменты, искривление и замыкание которых приводит к возникновению моноламеллярных везикул. В другом механизме, из нитевидных мицелл вначале образуются сетчатые структуры, превращающиеся

затем в мультислойные мембранные структуры, искривление и замыкание которых приводит к возникновению мультиламеллярных везикул.

В третьей части обзора рассмотрены некоторые практические приложения данных трансформаций, в частности изучение условий существования бицелл, а также солюбилизация мембранных белков и их последующее встраивание в мембраны с заданным составом.

3. Материалы и методы

В работе использовали ХН, ДХН, ДСН, ОГ и Хол (Calbiochem, Германия), ХДХН, 5 β -Хол, C_nE_m (рис. 1), яФХ, и синтетические ДПФХ, ДСФХ (Sigma, США) и ДМФХ (Sigma, США и Lipoid, Германия). Используемые 5–10 мМ Трис-НСl-буферы (рН 7,3–8,1) готовили на воде, очищенной с помощью систем Milli-RO[®] 15 и Milli-Q (Millipore Intertech Inc., США). Перед экспериментами рН изучаемых смесей доводили до нужных значений концентрированными растворами HCl или NaOH. Концентрацию липида в смесях контролировали по содержанию фосфора [Gerlach E., 1963].

Для наблюдения за ходом термоиндуцируемого перехода мицеллы-везикулы использован метод сканирующей турбидиметрии, который чувствителен к изменению размера частиц. Измерения проводили при длине волны 450 нм на спектрофотометре UVIKON 943 (KONTRON Instruments, США) с термостатируемым кюветным отделением и магнитной мешалкой, нагревая и охлаждая образцы с помощью программируемого термостата Polystat (Cole Parmer Instrument Co., США) в диапазоне 8–85 $^{\circ}$ C со скоростью 0,8 $^{\circ}$ C/мин при постоянном перемешивании. Температуру в кювете спектрофотометра измеряли с помощью термопары с точностью 0,1 $^{\circ}$ C.

Для изучения тепловых процессов в изучаемых системах использовался метод ДСК. Измерения проводили на микрокалориметре ДАСМ-4А (Россия) со скоростью сканирования 0,3 $^{\circ}$ C/мин в температурном диапазоне 7–105 $^{\circ}$ C при повышенном давлении в измерительной ячейке 2,6–2,8 атм.

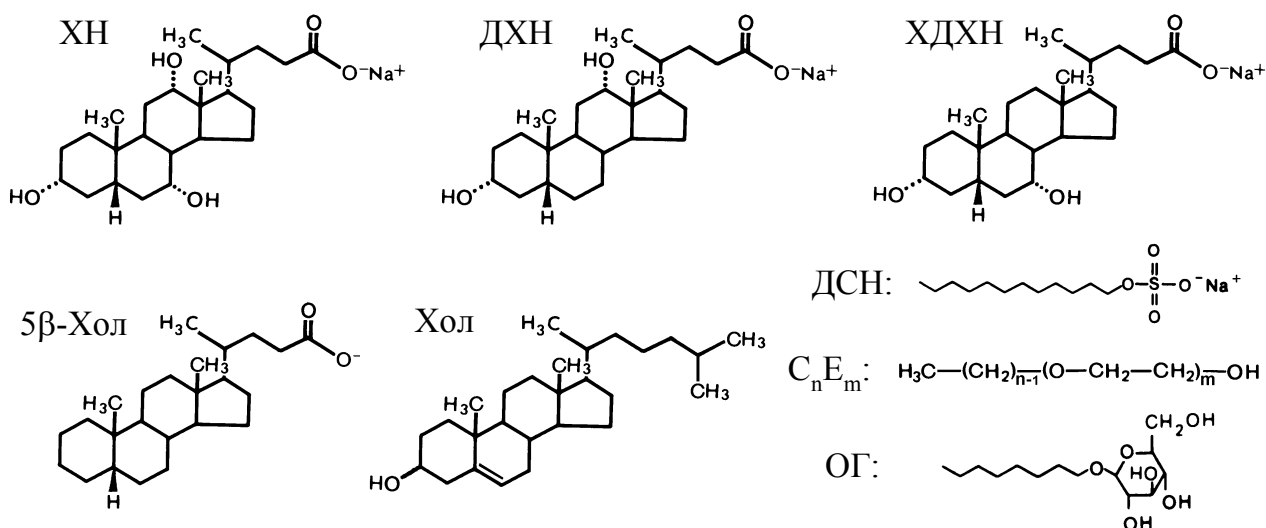


Рис. 1. Строение ХН, ДХН, ХДХН, 5 β -Хол, Хол, ДСН, C_nE_m и ОГ.

4. Результаты и их обсуждение

4.1. Термоиндуцируемые структурные и фазовые переходы в системе ДМФХ–ХН

Для последующего сравнительного анализа система ДМФХ–ХН была выбрана в качестве исходной, т.к. в ней термоиндуцируемый переход мицеллы-везикулы ранее был изучен наиболее полно. Но, недостаточно исследовано влияние концентраций компонентов на этот переход и не охарактеризованы наблюдаемые изменения теплоёмкости смесей.

Изучение смесей ДМФХ–ХН проводили с помощью методов сканирующей турбидиметрии и ДСК в широком диапазоне концентраций ДМФХ и ХН (1–15 мМ) и температур (8–85°C). За переходом мицеллы-везикулы следили по возрастанию оптической плотности смесей при нагревании (рис. 2). Уровень, на который выходит эта оптическая плотность, для смесей разного состава мог сильно отличаться (рис. 2, кривые 1 и 2), что указывает на образование везикул разного размера. Это вполне объясняется двумя предложенными ранее механизмами этого перехода, описывающими образование крупных, мультиламеллярных и небольших, моноламеллярных везикул.

По мере увеличения концентрации детергента в смеси, пик на кривых ДСК, отвечающий основному фазовому переходу липида гель-жидкий кристалл (рис. 3а, кривая 1), постепенно расщеплялся на три пика (рис. 3б, кривая 1). Низкотемпературный пик наблюдался при тех же температурах, что и падение оптической плотности смеси (рис. 3б), отвечающее основному фазовому переходу липида в ламеллярных структурах (рис. 3а). А при температурах, когда наблюдался средний пик, оптическая плотность смеси существенно не менялась (рис. 3б, 3в и 3г). Причём, этот пик наблюдался и для смесей в мицеллярном состоянии (рис. 3в и 3г). Поэтому, скорее всего, он объясняется основным фазовым переходом липида в смешанных мицеллах. Анализ зависимостей температур, энтальпий и ширин этих двух пиков от состава смеси

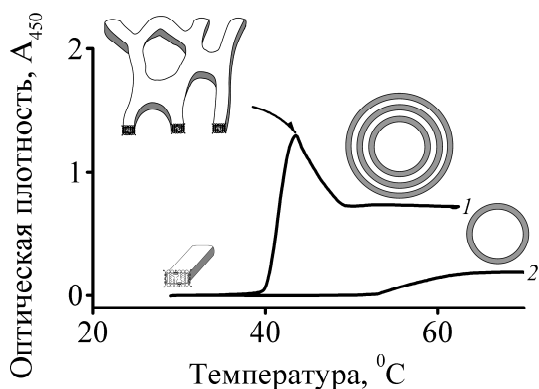


Рис. 2. Кривые сканирующей турбидиметрии для смесей ДМФХ/ХН = 5 : 5 мМ (1) и 5 : 6 мМ (2). Схематически показаны мицеллы, ретикулярная гелевая фаза, моно- и мультиламеллярные везикулы.

позволил подтвердить предложенную интерпретацию этих пиков.

Слишком высокие температуры, которые может иметь высокотемпературный пик на кривых ДСК, указывают на то, что он, скорее всего, вообще не связан с фазовыми переходами липида, а отвечает другому эндотермическому тепловому процессу, происходящему при переходе мицеллы-везикулы (рис. 3, ср. кривые 1 и 2). Этот тепловой процесс, вероятно, обусловлен особым строением солей желчных кислот, т.к. в смесях с другими детергентами он не наблюдался.

Таким образом, механизм термоиндуцируемого перехода мицеллы-

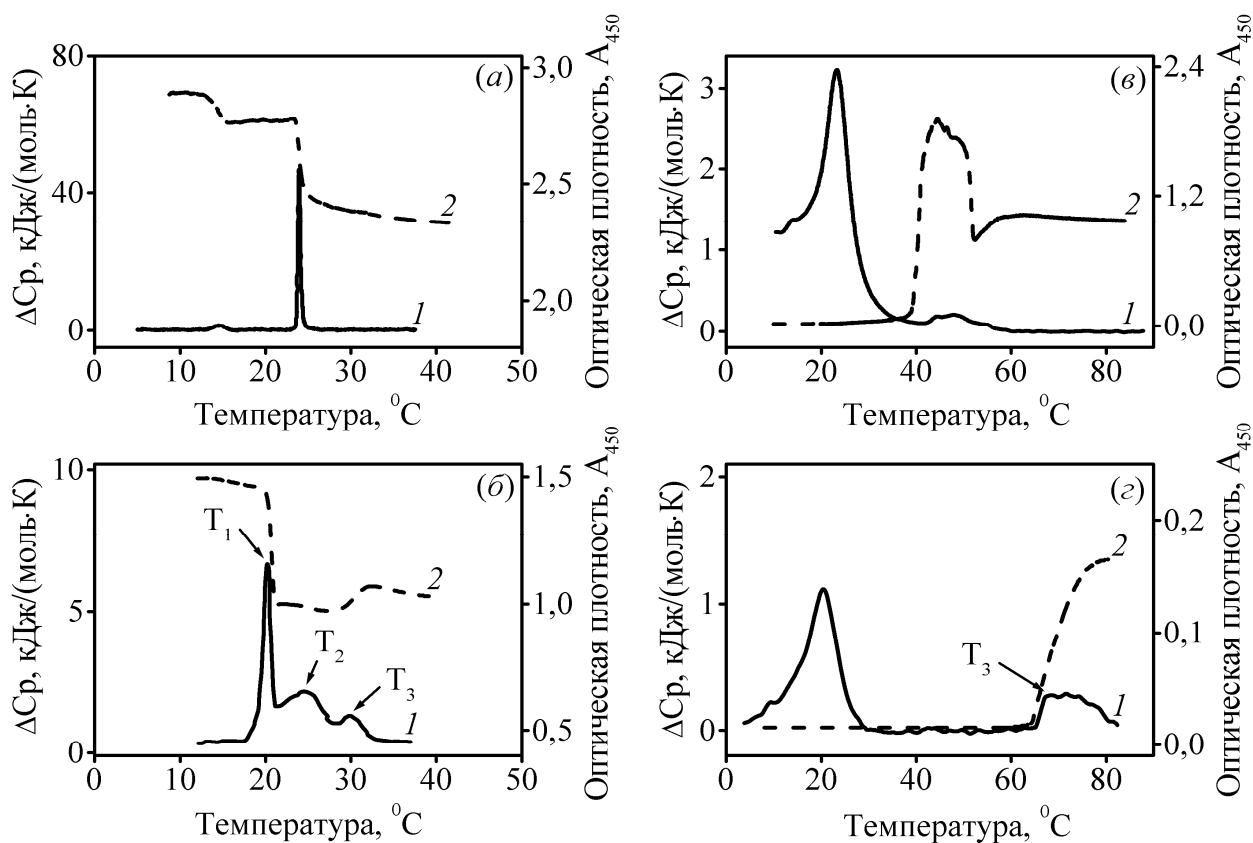


Рис. 3. Кривые ДСК (1) и сканирующей турбидиметрии (2) для системы ДМФХ–ХН. Показаны смеси ДМФХ : ХН (мМ): 5 : 0 (а), 5 : 2 (б), 15 : 8 (в) и 5 : 8 (г). T_1 , T_2 и T_3 – температуры максимумов пиков на кривых ДСК.

везикулы в системе ДМФХ–ХН по-видимому можно изменять, просто варьируя концентрации липида и детергента. Низкотемпературный и средний пики на кривых ДСК для системы ДМФХ–ХН отвечают основному фазовому переходу липида гель-жидкий кристалл в ламеллярных структурах и смешанных мицеллах, соответственно. А высокотемпературный пик не связан с фазовыми переходами липида и отвечает поглощению тепла при переходе мицеллы-везикулы.

4.2. Влияние строения липидов и детергентов на переход мицеллы-везикулы в смешанных системах

Влияние строения жирнокислотных цепей фосфолипидных молекул

Влияние строения жирнокислотных цепей фосфолипидных молекул, а также фазового перехода липида гель-жидкий кристалл на процесс самосборки мембран изучали на смесях холата натрия с фосфатидилхолинами разной длины (ДМФХ, ДПФХ и ДСФХ) и степени ненасыщенности жирнокислотных цепей (яФХ).

Температура начала перехода мицеллы-везикулы (рис. 4, T_4) для систем ДМФХ–ХН, ДПФХ–ХН и ДСФХ–ХН была всегда больше или равна температуре основного фазового перехода липида гель-жидкий кристалл в смешанных мицеллах (рис. 3, ср. кривые 1 и 2, средний пик). Однако, фазовый переход не всегда вызывает структурный переход, что видно на примере

добавление холестерина, т.е. изменение плотности упаковки липидных молекул, практически не влияло на начало этого перехода (рис. 5). Следовательно, изменение плотности упаковки молекул липида при нагревании не способно вызвать переход мицеллы-везикулы в системе ДМФХ–ХН.

Таким образом, добавление холестерина может существенно влиять на механизм перехода мицеллы-везикулы, но практически не сказывается на температуре, при которой начинается этот переход. Изменение плотности упаковки молекул липида при нагревании не может вызвать самосборку мембран в системе ДМФХ–ХН.

Влияние строения молекул солей желчных кислот

Для изучения влияния размера полярной части ионного детергента на термоиндуцируемый переход мицеллы-везикулы выбрали желчные кислоты с разным числом гидроксильных групп (ХН, ДХН или ХДХН и 5 β -Хол (рис. 1)).

Параметры термоиндуцируемого структурного перехода (рис. 4) для систем ДМФХ–ДХН и ДМФХ–ХДХН в пределах ошибок измерений совпадают, т.е. положение гидроксильных групп в молекулах солей желчных кислот не влияет на данный переход. $\Delta T_{пр}$ для системы ДМФХ–ХДХН ($28,3 \pm 1,8^\circ\text{C}$) вдвое больше, чем для системы ДМФХ–ХН ($14,5 \pm 2,9^\circ\text{C}$). По амплитуде структурного перехода (рис. 4, $\Delta A_{пр}$) показано, что и размер образующихся везикул в системе ДМФХ–ХДХН больше, чем в системе ДМФХ–ХН. Все смеси ДМФХ–5 β -Хол при изученных температурах находились в везикулярном состоянии.

Итак, в смесях ДМФХ с солями желчных кислот уменьшение числа гидроксильных групп в молекулах детергента, т.е. уменьшение размера их полярной части, приводит к уширению диапазона температур, в котором наблюдается переход мицеллы-везикулы, и вызывает увеличение размеров образующихся везикул.

Смеси додецилсульфата натрия (ДСН) с ДМФХ

Кроме солей желчных кислот, были изучены смеси ДМФХ с более сильным электролитом – ДСН (рис. 1). Изучено влияние соли на характер термоиндуцируемого перехода в этой системе.

С помощью метода сканирующей турбидиметрии, для смесей ДМФХ–ДСН разного состава переход мицеллы-везикулы при нагревании был обнаружен только в деионизованной воде (рис. 6а, $\text{ККМ}_{\text{ДСН}} = 8,73\text{--}10,83 \text{ мМ}$ [Majhi et al., 2001] и заметно возрастает при нагревании), в то время, как в буфере, содержащем 0,1 М NaCl, он не наблюдался (рис. 6б, $\text{ККМ}_{\text{ДСН}} = 1,57\text{--}2 \text{ мМ}$ [Tan et al, 2002] и слабо зависит от температуры).

Итак, термоиндуцируемый переход мицеллы-везикулы обусловлен скорее свойствами детергента, а не липида. Одним из факторов, вызывающих этот переход, может быть увеличение водной концентрации детергента при нагревании.

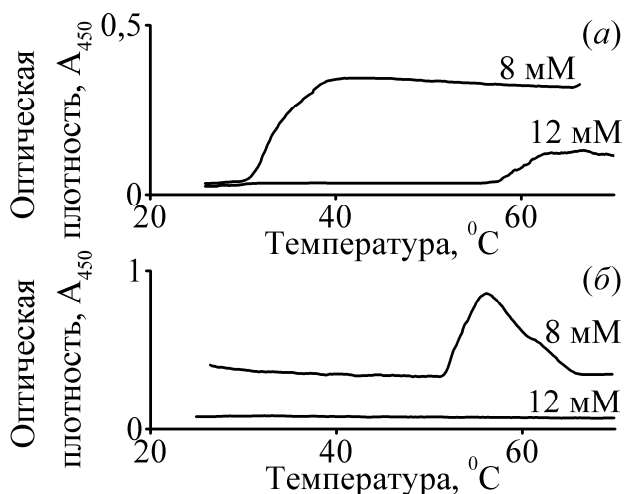


Рис. 6. Кривые сканирующей турбидиметрии, полученные для системы ДМФХ–ДСН в деионизованной воде (а) и буфере (100 мМ NaCl, 10 мМ Трис, рН 7,4) (б) при нагревании в зависимости от концентрации детергента в смеси. В смесях 5 мМ ДМФХ.

перехода мицеллы-везикулы. На структурное поведение системы ДМФХ–ОГ влияет еще и основной фазовый переход липида в смешанных мицеллах, который также может вызывать переход мицеллы-везикулы (рис. 7, для 20 мМ ОГ максимум среднего пика на кривых ДСК совпадал по температуре с резким ростом оптической плотности смеси).

Итак, в зависимости от изменения водной концентрации детергента, переход мицеллы-везикулы может наблюдаться как при нагревании, так и при охлаждении.

Смеси октилглюкозида с фосфатидилхолином

Изучены смеси фосфатидилхолина (ДМФХ или яФХ) с неионным детергентом – октилглюкозидом (рис. 1, ОГ), который, как и ДСН, имеет высокую ККМ ($KKM_{OG} = 20,8–27,9$ мМ [Majhi et al., 2001]), существенно зависящую от температуры.

С помощью метода сканирующей турбидиметрии изучено структурное поведение систем яФХ–ОГ и ДМФХ–ОГ разного состава (рис. 7). Изменение оптической плотности смесей для этих систем во многом коррелировало с ККМ данного детергента, а именно, при нагревании сначала уменьшалось, а потом возрастало. Вероятно, в этих системах наблюдаются последовательные процессы термоиндуцируемой солюбилизации и

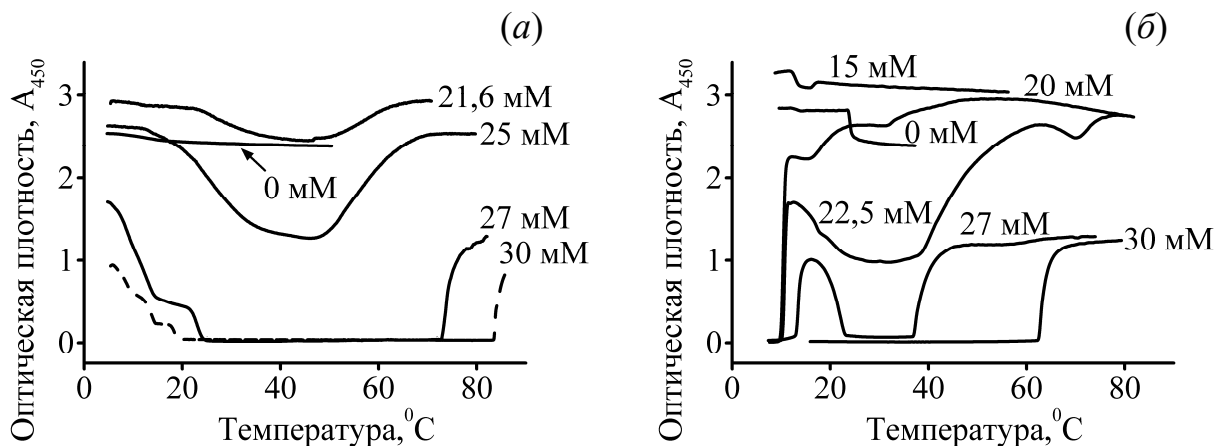


Рис. 7. Кривые сканирующей турбидиметрии, полученные для систем яФХ–ОГ (а) и ДМФХ–ОГ (б) при нагревании, в зависимости от концентрации детергента в смеси. Концентрация яФХ составляет 3 мМ, а ДМФХ – 5 мМ.

Смеси алкильных эфиров полиэтиленгликоля (C_nE_m) с фосфатидилхолином

Для алкильных эфиров полиэтиленгликоля (рис. 1, C_nE_m) можно изучить влияние размера полярной головки и длины их углеводородной цепи на процесс самосборки мембран, выбирая C_nE_m с разными m (изменяли в ряду $C_{12}E_8$, $C_{12}E_7$ и $C_{12}E_6$) и n (изменяли в ряду $C_{12}E_8$, $C_{14}E_8$ и $C_{16}E_8$). В смесях с липидом, изменением водной концентрации этих неионных детергентов при нагревании можно было пренебречь (для выбранных C_nE_m ККМ < 0,1 мМ), поэтому переход мицеллы-везикулы в этом случае вызван другими факторами.

Когда T_4 была больше температуры основного фазового перехода ДМФХ (рис. 8, начиная с 5 : 4), то в смесях ДМФХ– C_nE_m высокая амплитуда структурного перехода говорит об образовании крупных везикул, размер которых увеличивался как при уменьшении m , так и при увеличении n . На температуру начала перехода мицеллы-везикулы больше влиял размер полярных головок детергента, чем длина его углеводородной цепи. Поэтому именно изменение размера этих полярных головок может вызывать данный переход.

Для систем ФХ– C_nE_m интервал $\Delta T_{пр}$ (32–43°C) не зависел от длины жирнокислотных цепей молекул липида (ДПФХ и ДМФХ), но заметно уширялся при удлинении алкильных цепей молекул детергента. Размер полярных головок молекул детергента (m) не влиял на ширину этого интервала.

Итак, переход мицеллы-везикулы, т.е. процесс самосборки мембран в системах, содержащих алкильные эфиры полиэтиленгликоля, может быть вызван изменением размера полярной головки молекул этих детергентов при нагревании. Увеличения размера везикул, образующихся в системах ДМФХ– C_nE_m в результате этого перехода, можно достичь как выбором детергента с меньшим размером полярной головки, так и с большей длиной алкильной цепи. А выбирая детергент с более длинной алкильной цепью, можно получить заметное уширение температурного интервала, в котором происходит данный переход.

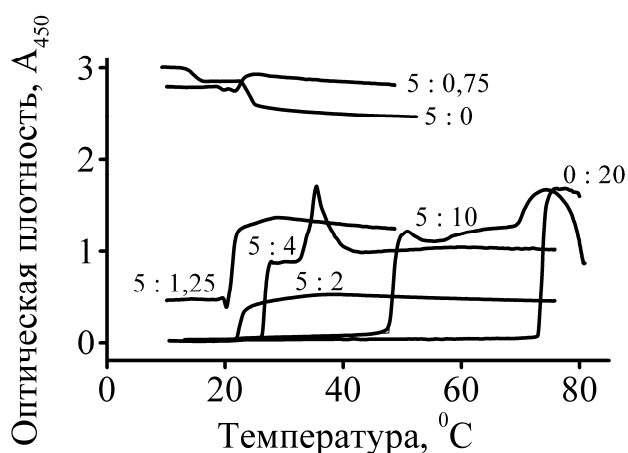


Рис. 8. Кривые сканирующей турбидиметрии, полученные для системы ДМФХ– $C_{12}E_8$ при нагревании, в зависимости от соотношения липид : детергент в смеси (в мМ).

4.3. Математическая модель, описывающая переход мицеллы-везикулы

Описание модели

Молекулярные характеристики липида и детергента во многом определяют их параметры геометрической упаковки в смешанных агрегатах (рис. 9). Эти параметры являются ключевыми при изучении и модельном описании процесса самосборки мембран в смешанных липид-детергентных системах. Предложена математическая модель перехода мицеллы-везикулы, которая связывает данные параметры с основными характеристиками этого перехода. В отличие от известных моделей, было учтено наличие гош-конформеров в углеводородных цепях липида и детергента и точнее определены условия, при которых начинается и заканчивается переход мицеллы-везикулы.

Тип образующихся агрегатов можно описать безразмерным параметром молекулярной упаковки, δ , который для случая двухкомпонентной липид-детергентной системы был обобщён [Гольцов и др., 2004] следующим образом: $\delta_{eff} = (v_l + R_e \cdot v_d) / (a_l \cdot h_{dl} + R_e \cdot a_d \cdot h_{dl})$ (1), где R_e – мольное соотношение детергент/липид в смешанных агрегатах (a_l , a_d , v_l , v_d и h_{dl} на рис. 9). Для бислоя он равен единице, в то время, как, например, для цилиндрических мицелл – 1/2, т.е. при переходе мицеллы-везикулы этот параметр возрастает. Увеличения δ_{eff} , согласно выражению (1), можно добиться как уменьшением R_e , т.е. удалением детергента, так и изменением упаковочных параметров липида и детергента, например, при нагревании. Как показано выше, термоиндуцируемый переход мицеллы-везикулы обусловлен больше свойствами детергента, а не липида, из которых основное влияние на начало этого перехода оказывает размер полярной головки детергента. А он определяет площадь, приходящуюся на одну молекулу детергента на границе раздела фаз, a_d . Поэтому, только её считали зависящей от температуры, а температурной зависимостью других упаковочных параметров пренебрегли.

В предложенной модели считалось, что параметр δ_{eff} в начале (R_e^{sol}) и при

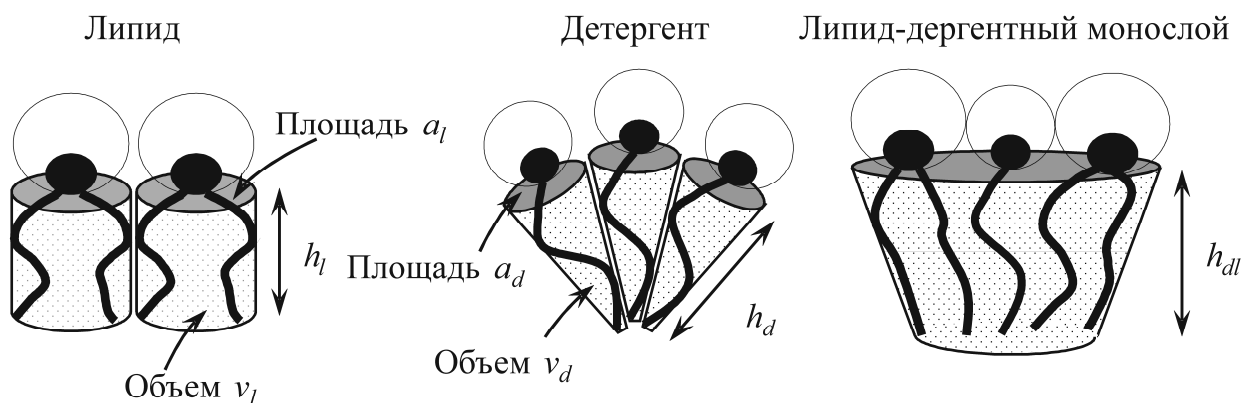


Рис. 9. Упаковочные параметры липида и детергента в агрегатах: a_l и a_d – площадь на границе раздела фаз, v_l и v_d – гидрофобный объем, h_l , h_d и h_{dl} – эффективная толщина монослоя.

окончании (R_e^{sat}) перехода мицеллы-везикулы имеет строго заданные значения δ_{kp} и δ_v , не зависящие от выбранной липид-детергентной системы. В этих условиях, выражение (1) задаёт связь состава липид-детергентных агрегатов (R_e) и упаковочных параметров детергента и липида.

Гидрофобные объёмы липида (v_l) и детергента (v_d) рассчитывали на основе ван-дер-ваальсовых объёмов для метильной (54 \AA^3) и метиленовой групп ($28,4 \text{ \AA}^3$). За h_{dl} принимали среднее из эффективных толщин однокомпонентных липидных и детергентных монослоев с учетом того, что липидная молекула имеет две углеводородных цепи, а детергентная молекула – одну: $h_{dl} = (2 \cdot h_l + R_e^{\text{sol}} \cdot h_d) / (2 + R_e^{\text{sol}})$ (2). Длину полностью вытянутой неразветвленной углеводородной цепи, содержащей n атомов углерода, оценивали по формуле Танфорда: $h^{\text{max}} = (1,54 + 1,265 \cdot n) \text{ \AA}$ (3). Наличие в ней гош-конформеров учли введением параметра $\gamma_1 \leq 1$, так что $h_{dl} = \gamma_1 \cdot h_{dl}^{\text{max}}$.

Используя известные литературные данные для ДМФХ и ДПФХ, считали (точность $3\text{--}8 \text{ \AA}^2$), что в жидкокристаллическом состоянии $a_l = 63 \text{ \AA}^2$ (4) и не зависит от температуры и состава липид-детергентных агрегатов.

Из выражения (1) по полученным зависимостям $R_e^{\text{sol}}(T)$ для систем ДМФХ– $C_{12}E_7$ и ДМФХ– $C_{12}E_8$ и литературным значениям a_d для $C_{12}E_7$ и $C_{12}E_8$, определили, что в среднем $\delta_{kp} \cdot \gamma_1 = 0,554 \pm 0,009$ (5).

На основании оценок (2), (4) и (5) и выражения (1) было получено:

$$a_d(T) = \frac{(v_l + R_e^{\text{sol}}(T) \cdot v_d) \cdot (2 + R_e^{\text{sol}}(T))}{0,554 \cdot R_e^{\text{sol}}(T) \cdot (2 \cdot h_l^{\text{max}} + R_e^{\text{sol}}(T) \cdot h_d^{\text{max}})} - \frac{63}{R_e^{\text{sol}}(T)} \quad (6).$$

При этом предполагалось, что a_d не зависит от состава смешанных агрегатов.

В силу своего специфического строения, молекулы солей желчных кислот могут находиться как на поверхности липид-детергентных агрегатов (рис. 10а и 10б), так и встраиваться в их гидрофобную область (рис. 10в). По молекулярным моделям и литературным данным получено, что в первом случае

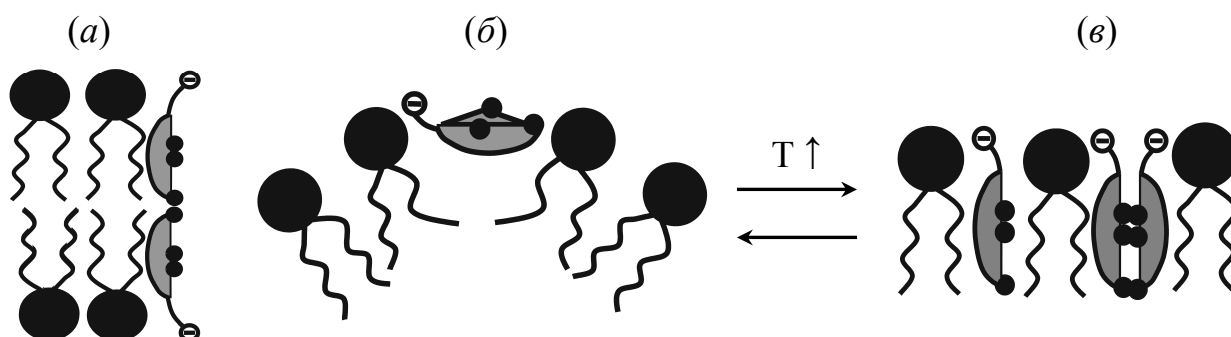


Рис. 10. Различные варианты ориентации молекул солей желчных кислот относительно молекул липида. (а) Молекулы детергента находятся на границе между гидрофобной областью ацильных цепей липидной фазы и водой; (б) молекулы детергента располагаются в области полярных головок липида; (в) молекулы детергента встроены в гидрофобную область агрегатов.

$a_{d1} = 120 \text{ \AA}^2$ (110 \AA^2 для ДХН) и $v_{d1} = 410 \text{ \AA}^3$, а во втором $a_{d2} = 45 \text{ \AA}^2$ и $v_{d2} = 470 \text{ \AA}^3$ (450 \AA^3 для ДХН). Средние $a_d = \alpha \cdot a_{d1} + (1 - \alpha) \cdot a_{d2}$ и $v_d = \alpha \cdot v_{d1} + (1 - \alpha) \cdot v_{d2}$, где α – доля молекул солей желчных кислот, плоско лежащих на поверхности липид-детергентных агрегатов. Считая, что $h_{dl} \approx \gamma_1 \cdot h_l^{\max}$ и используя выражение (1) определили эту долю в зависимости от температуры:

$$\alpha(T) = \frac{v_l - 0,554 \cdot h_l^{\max} \cdot a_l + R_e^{\text{sol}}(T) \cdot (v_{d2} - 0,554 \cdot h_l^{\max} \cdot a_{d2})}{R_e^{\text{sol}}(T) \cdot (0,554 \cdot (a_{d1} - a_{d2}) \cdot h_l^{\max} + v_{d2} - v_{d1})} \quad (7).$$

При R_e^{sat} , считая, что для смешанного липид-детергентного бислоя $h_{dl} = \gamma_2 \cdot h_{dl}^{\max}$, где $\gamma_2 < 1$, из выражения (1) получили:

$$R_e^{\text{sat}} = (v_l - \delta_v \cdot \gamma_2 \cdot a_l \cdot h_{dl}^{\max}) / (\delta_v \cdot \gamma_2 \cdot a_d \cdot h_{dl}^{\max} - v_d) \quad (8).$$

Для достаточно крупных везикул ($>100 \text{ нм}$) с ошибкой меньше 4% можно считать, что $\delta_v \approx 1$. Тогда выражение (8) задаёт взаимосвязь параметров R_e^{sat} и γ_2 . Используя известные значения R_e^{sat} , можно оценить параметр γ_2 . А зная γ_2 , по выражению (8) можно определить R_e^{sat} для любых липид-детергентных систем.

Итак, разработана математическая модель перехода мицеллы-везикулы, позволяющая для агрегатов известного состава и типа определить упаковочные параметры амфифильных молекул. Если же, наоборот, эти упаковочные параметры известны, то можно, например, определить границы области сосуществования мицелл и везикул (R_e^{sat} и R_e^{sol}).

Определение состава смешанных липид-детергентных агрегатов

В предложенной математической модели нужно знать состав смешанных агрегатов, образующихся на различных стадиях перехода мицеллы-везикулы, например, R_e^{sol} . Задача его определения особенно актуальна для липид-детергентных систем, содержащих детергенты с высокой ККМ. При анализе термоиндуцируемых переходов нужна также температурная зависимость этого состава. Для этого предложен наименее трудоёмкий способ его определения, описанный ниже на примере системы ДМФХ–ХН.

Липид-детергентные смеси разного состава сравнивали по температуре T_4 (рис. 4). Считалось, что смеси с одинаковой T_4 имеют одинаковый состав агрегатов (R_e). Причём, при этой температуре он равен R_e^{sol} , а концентрация детергента в воде – D_w^{sol} .

В координатах липид-детергент смеси с одинаковой T_4 хорошо ложились на одну прямую (рис. 11). Тангенс угла наклона этой прямой задаёт R_e^{sol} , а точка её пересечения с осью ординат – D_w^{sol} (рис. 11). Иными словами: $D = D_w^{\text{sol}}(T_4) + R_e^{\text{sol}}(T_4) \cdot L$ (9), где D и L – концентрации детергента и липида в

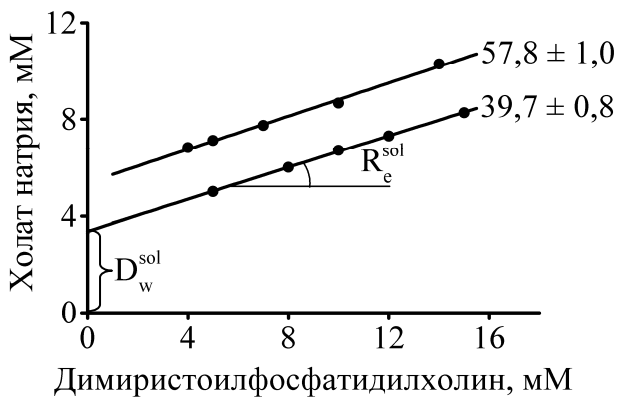


Рис. 11. Линейные зависимости, полученные между концентрациями детергента и липида для смесей ДМФХ–ХН с одинаковой температурой T_4 (указана рядом с прямыми в градусах Цельсия).

смеси. Для наборов смесей с постоянной L и переменной D строили зависимости $D(T_4)$ там, где они взаимнооднозначные. Оказалось, что при любой L зависимости $D(T_4)$ являются полиномами первой степени. Следовательно, зависимости $D_w^{\text{sol}}(T_4)$ и $R_e^{\text{sol}}(T_4)$ тоже будут полиномами первой или меньшей степени. Поэтому, интерполяция экспериментальных данных проводилась зависимостью: $D = a_1 + a_2 \cdot T_4 + (b_1 + b_2 \cdot T_4) \cdot L$ (10). Она хорошо описывала экспериментальные данные ($r = 0,998$, $SD = 0,2$ мМ, ошибка приготовления образцов $0,1-0,3$ мМ).

Зная параметры зависимости (10) определили $D_w^{\text{sol}}(T) = a_1 + a_2 \cdot T$ (11) и $R_e^{\text{sol}}(T) = b_1 + b_2 \cdot T$ (12). А ошибки $\sigma_{D_w^{\text{sol}}} = 0,09-0,21$ мМ и $\sigma_{R_e^{\text{sol}}} = 0,009-0,019$ определены, используя ковариационную матрицу ошибок a_i и b_i .

Состав агрегатов определили предложенным способом также по данным ДСК. В этом случае, смеси разного состава сравнивали по одной из температур максимумов трёх основных пиков на кривых ДСК – T_1 , T_2 или T_3 (рис. 3). Совпадение в пределах ошибок эксперимента состава агрегатов, определённого при температурах T_2 и T_3 (отличие десятки градусов), позволило заключить, что в смесях ДМФХ–ХН состав агрегатов и связанная с ним концентрация детергента в воде от температуры не зависят. Следовательно, в этой системе переход мицеллы-везикулы при нагревании вызван не изменением концентрации детергента в воде, а другими факторами.

Итак, предложен новый способ определения температурной зависимости состава смешанных липид-детергентных агрегатов в условиях перехода мицеллы-везикулы. Для смесей ДМФХ–ХН показано, что изменением состава агрегатов при нагревании можно пренебречь.

Использование предложенной модели для определения основных параметров, характеризующих процесс самосборки мембран

Зная R_e^{sol} , исходя из предложенной математической модели можно определить площадь a_d , а из неё для липид-детергентных систем, содержащих соли желчных кислот, – долю α . Кроме этих основных параметров, характеризующих процесс самосборки мембран, предложенная модель позволяет предсказать условия формирования смешанных везикул, т.е. условия самосборки мембран в смешанных липид-детергентных системах.

Таблица. Экспериментальные и расчетные характеристики липид-детергентных систем.

Система	R_e^{sol} эксперимент	$a_d, \text{Å}^2$		R_e^{sat}	
		расчёт	эксперимент	расчёт	эксп.
ДМФХ- $C_{12}E_8$	0,70 ^a (25°C)	63	60 ± 2 (25°C)	0,45 ± 0,12	–
ДМФХ- $C_{12}E_7$	1,29 ^a (25°C)	52	54 ± 3 (25°C)	0,8 ± 0,2	–
ДМФХ-ОГ	1,79 (27°C)	48	51 ± 3 (23°C)	1,0 ± 0,3	1,56
	2,03 (70°C)	47	–	1,1 ± 0,4	1,66
ДМФХ-ДСН	0,82 ^a (30°C)	59	55 (30°C)	0,51 ± 0,13	–
	0,69 (30°C)	63		0,44 ± 0,12	0,32
	0,63 (60°C)	65	–	0,40 ± 0,12	0,59
	1,52 (60°C, 0,1 M NaCl)	50	–	0,9 ± 0,2	1,05
ДМФХ-ДТАБ	0,79 (30°C)	60	68	0,50 ± 0,13	0,42
ДМФХ-ТТАБ	0,63 (30°C)	66	–	0,40 ± 0,12	0,46
ДПФХ-ДТАБ	1,0 (45°C)	56	–	0,6 ± 0,2	0,34
ДПФХ-ТТАБ	1,0 (45°C)	56	–	0,6 ± 0,2	0,36
ДПФХ-ГТАБ	1,0 (45°C)	56	–	0,6 ± 0,2	0,45
ДПФХ-МЕГА-8	1,7 (45°C)	49	44,9 (30°C)	1,0 ± 0,3	–
ДПФХ-МЕГА-9	1,6 (45°C)	50	46,4 (30°C)	0,9 ± 0,2	–
ДПФХ-МЕГА-10	1,6 (45°C)	50	45,2 (30°C)	0,9 ± 0,2	–
ДПФХ-ДМ	1,4 (37°C)	51	54 (37°C)	0,8 ± 0,2	–

^a Данные настоящей работы

Используя как полученные в настоящей работе, так и литературные значения R_e^{sol} , с помощью выражения (6) определили a_d для различных липид-детергентных систем (см. Таблицу). Оказалось, что для детергентов совершенно разного строения эти расчётные значения a_d хорошо согласуются с литературными данными, полученными в экспериментах на мономолекулярных пленках или с помощью малоуглового рентгеновского рассеяния (см. Таблицу, $SD = 4,5 \text{ Å}^2$). Но определение a_d предложенным способом имеет целый ряд преимуществ перед другими методами, т.к. позволяет получить эти значения непосредственно в липид-детергентных агрегатах разного строения для разбавленных водных систем и в широком диапазоне температур.

Для ДСН ($\sim 0 \text{ Å}^2/\text{°C}$) и ОГ ($-0,02 \text{ Å}^2/\text{°C}$) было получено, что a_d практически не зависит от температуры. Для систем, содержащих эти детергенты, с температурой существенно изменялось только D_w^{sol} , поэтому основным фактором, вызывающим самосборку мембран в этом случае, вероятно, является изменение водной концентрации детергента при нагревании. Для многих детергентов наоборот, концентрация детергента в воде не изменялась, в то время, как a_d заметно уменьшалась при нагревании, как, например, для додецилмальтозида (ДМ, $-0,5 \text{ Å}^2/\text{°C}$), для изученных C_nE_m ($-0,3$ – $0,8 \text{ Å}^2/\text{°C}$) и для холата натрия ($-0,3 \text{ Å}^2/\text{°C}$ для ДМФХ-ХН). Если для C_nE_m или ДМ уменьшение

a_d можно связать с дегидратацией полярных головок детергента при нагревании, то для холата натрия оно, вероятно, вызвано переориентацией молекул детергента относительно молекулы липида (рис. 10).

Из выражения (8), используя экспериментальные значения R_e^{sat} , получили в среднем, что $\gamma_2 = 0,59 \pm 0,03$ (\pm SD). Используя это значение в выражении (8), получили зависимость R_e^{sat} от a_d . А a_d определяли с помощью выражения (6) по R_e^{sol} . Т.е., для любой липид-детергентной системы можно оценить R_e^{sat} , зная величину R_e^{sol} . Сравнение расчётных значений R_e^{sat} с экспериментальными показывает, что в целом теоретический расчёт даёт разумные оценки R_e^{sat} , которые в большинстве случаев достаточно близки к экспериментально найденным величинам (см. Таблицу). Существует достоверная ($p < 0,05$) корреляция ($r = 0,911$) между расчётными и экспериментальными значениями R_e^{sat} .

Значения параметра γ_2 уточнили, определив температурный диапазон, в котором наблюдается переход мицеллы-везикулы, $\Delta T_{\text{пр}}$ (рис. 4). Для изученных систем ФХ–С_nE_m, где R_e не зависит от температуры, из выражения (8) была определена температура T_5 , при которой $R_e^{\text{sat}}(T_5) = R_e^{\text{sol}}(T_4)$, т.е. оценен $\Delta T_{\text{пр}} = T_5 - T_4$. Оказалось, что при $\gamma_2 = 0,621$ расчётные значения $\Delta T_{\text{пр}}$ отличаются от экспериментальных меньше, чем на 9 % от величины $\Delta T_{\text{пр}}$.

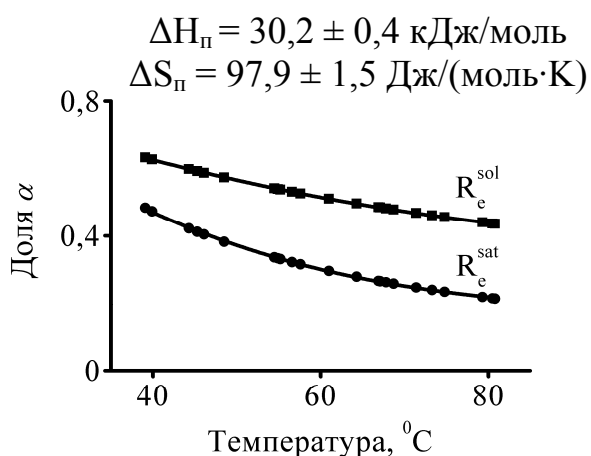


Рис. 12. Зависимости доли молекул холата натрия, плоско лежащих на границе раздела фаз в липид-детергентных агрегатах, α , от температуры при R_e^{sat} и R_e^{sol} для системы ДМФХ–ХН. Линиями даны интерполяции зависимостью (13). ΔH_{π} и ΔS_{π} рассчитаны при R_e^{sol} (см. текст).

Для системы ДМФХ–ДСН, где, наоборот, R_e существенно зависит от температуры, а a_d постоянно, используя зависимость $D_w^{\text{sol}}(T)$, выражение (8) для R_e^{sat} ($\gamma_2 = 0,621$) и считая, что при любой температуре $D_w^{\text{sat}} \approx D_w^{\text{sol}}$, в диапазоне концентраций ДСН 8–12 мМ (5 мМ ДМФХ) был оценен $\Delta T_{\text{пр}} = 13,7 \pm 1,9^{\circ}\text{C}$ (\pm SD). По экспериментальным данным $\Delta T_{\text{пр}} = 13 \pm 3^{\circ}\text{C}$ (\pm SD).

Для липид-детергентных систем, содержащих соли желчных кислот, используя экспериментальные зависимости $R_e^{\text{sat}}(T)$ ($\gamma_2 = 0,621$) и $R_e^{\text{sol}}(T)$ по выражению (7) были получены температурные зависимости доли $\alpha(T)$ (рис. 12). Уменьшение α при нагревании можно объяснить сдвигом равновесия между различными

ориентациями молекул солей желчных кислот (рис. 10) в сторону их встраивания в гидрофобную область агрегатов. Предполагая, что между молекулами солей желчных кислот, располагающимися в области полярных головок липида (А), и молекулами этих детергентов, встроенными в гидрофобную область агрегатов (В) существует равновесие вида: $A \leftrightarrow B$, зависимость $\alpha(T)$ можно описать выражением:

$$\alpha(T) = \frac{1 + \alpha_0 \cdot e^{-\frac{\Delta H_{\text{п}} - T\Delta S_{\text{п}}}{RT}}}{1 + e^{-\frac{\Delta H_{\text{п}} - T\Delta S_{\text{п}}}{RT}}} \quad (13),$$

где $\Delta H_{\text{п}}$ и $\Delta S_{\text{п}}$ – изменения энтальпии и энтропии при переориентации молекул холата натрия, соответственно. Считалось, что молекулы детергента, находящиеся на границе между гидрофобной областью ацильных цепей липидной фазы и водой (рис. 10а), в равновесии не участвуют и их доля обозначена за α_0 . При переходе мицеллы-везикулы α существенно уменьшается (рис. 12, ср. кривые 2 и 1). Используя эту разницу в α и полученные значения $\Delta H_{\text{п}}$, определили, что при этом переходе должно поглощаться (\pm SD): $6,2 \pm 1,2$ мДж (5 мМ ДМФХ и 5–10 мМ ХН), $6,9 \pm 1,8$ мДж (5 мМ ДМФХ и 4–6 мМ ДХН) и 14 ± 3 мДж (10 мМ ДПФХ и 7–8 мМ ХН). Эти расчётные значения, полученные на основании данных сканирующей турбидиметрии, хорошо совпадают с экспериментальными значениями, полученными по площади высокотемпературного пика на кривых ДСК (\pm SD): $6,9 \pm 1,5$, $9,9 \pm 1,3$ и 14 ± 2 мДж, соответственно. Более того, расчётная зависимость хорошо описывает изменение количества поглощенного тепла от концентрации детергента в смеси.

Итак, основные характеристики структурных переходов, полученные с помощью метода сканирующей турбидиметрии, и модельное описание этих переходов позволяет получить один из ключевых параметров, влияющих на процесс самосборки мембран, – площадь, приходящуюся на одну молекулу детергента на границе раздела фаз в смешанных агрегатах, a_d . При этом, легко получить её зависимость от внешних условий, например, температуры. Причём, предложенный способ определения a_d , в отличие от существующих методов позволяет определять эту площадь в широком диапазоне температур, в разбавленных водных системах и для смешанных агрегатов различного строения (например, мицеллы или везикулы). Только этот способ позволил определить среднюю площадь, приходящуюся на одну молекулу солей желчных кислот в смешанных агрегатах. Анализ температурной зависимости этой площади показал, что поглощение тепла, наблюдающееся при переходе мицеллы-везикулы в данных системах, обусловлено процессом переориентации молекул детергента относительно молекул липида. Предложенная модель позволяет также предсказать условия самосборки мембран в термочувствительных липид-детергентных системах, а именно, определить диапазон температур, в котором наблюдается процесс самосборки мембран, и оценить состав образующихся при этом везикул, R_e^{sat} .

