

**ТЕРМОИНДУЦИРУЕМЫЕ СТРУКТУРНЫЕ И ФАЗОВЫЕ ПЕРЕХОДЫ В
СМЕШАННОЙ СИСТЕМЕ ДИМИРИСТОИЛФОСФАТИДИЛХОЛИН-ХОЛАТ
НАТРИЯ ПО ДАННЫМ ТУРБИДИМЕТРИИ И ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ
СКАНИРУЮЩЕЙ КАЛОРИМЕТРИИ**

Ю. В. Храмцов (1), Т. Н. Симонова (2), С. В. Суханов (2), Л. И. Барсуков (2)

(1) *Институт биологии гена РАН, Москва
119334, г. Москва, ул. Вавилова, д. 34/5
Телефон: 7(499) 135-98-84*

(2) *Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН,
Москва*

Введение

Изучение структурных переходов в смешанных липид-детергентных системах интересно как для понимания самосборки надмолекулярных агрегатов [1], так и для создания новых систем доставки лекарств, таких как липосомы [2] и смешанные мицеллы [3]. Кроме того, многие липид-детергентные системы успешно используются при кристаллизации мембранных белков [4] и при структурных исследованиях белков с помощью метода ядерного магнитного резонанса [5]. Везикулы известного липидного состава служат удобной модельной системой для исследования структуры и функций мембранных белков [6], а детергенты обычно используются для солюбилизации мембран, выделения и очистки мембранных белков [7].

Образование везикул из смешанных липид-детергентных мицелл, т.е. трансформацию мицеллы-везикулы обычно проводят путем удаления детергента из смешанных агрегатов путем диализа, разбавления или адсорбции на гидрофобных смолах [6]. Однако, оказалось, что зачастую того же самого эффекта можно достичь простым изменением температуры смеси [8-17]. Обнаружение термоиндуцируемой трансформации мицеллы-везикулы открыло новые возможности для изучения промежуточных стадий этого процесса [10, 14] и его кинетики [11]. Чаще всего эта трансформация наблюдается при нагревании [8-15], хотя иногда она может наблюдаться и при охлаждении [16, 17]. Благодаря обратимости этой трансформации [8, 13] ее можно использовать, например, для солюбилизации мембранных белков, охлаждая мембраны, насыщенные детергентом, а так же для встраивания мембранных белков в везикулы путём нагревания смешанных мицелл.

В настоящей работе для изучения термоиндуцируемой трансформации мицеллы-везикулы в системе димиристоилфосфатидилхолин-холат натрия (ДМФХ-ХН) были

использованы методы турбидиметрии и дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК). Метод турбидиметрии чувствителен к изменению размера [8, 9] и с его помощью легко наблюдать за ходом термоиндуцируемой трансформации мицеллы-везикулы. Метод ДСК регистрирует изменение теплоемкости смеси, сопровождающее, например, фазовые переходы липида [8, 9, 18]. Он позволяет установить влияние фазового состояния липида на наблюдаемые термоиндуцируемые структурные переходы, а так же обнаружить тепловые эффекты, сопровождающие эти переходы. Поэтому, методы турбидиметрии и ДСК хорошо дополняют друг друга при изучении данной трансформации.

Целью данной работы являлось изучение влияния состава смеси ДМФХ-ХН на термоиндуцируемые структурные и фазовые переходы в этой системе, а так же, установление возможного теплового эффекта, сопровождающего термоиндуцируемую трансформацию мицеллы-везикулы, и выяснение влияния на эту трансформацию фазового состояния липида.

Материалы и методы

В работе использовали холат натрия (Serva, США), синтетический димиристоилфосфатидилхолин (Sigma, США), Трис (Serva, США), EDTA (Serva, США), NaCl (Sigma, США) и воду, очищенную на системе очистки воды Milli-Q (Millipore, США) до сопротивления 18 мОМ.

Для приготовления смесей использовали 10 мМ Трис-буфер (pH 8-8.1), содержащий 1 мМ EDTA и 75 мМ NaCl. Концентрированные растворы детергента (100 мМ) и суспензии липида (50 мМ и 100 мМ) готовили, растворяя нужное количество вещества в буфере. Липид-детергентные образцы с концентрацией липида 15 мМ готовили путём смешивания концентрированных растворов детергента и липида в нужных пропорциях и разведения буфером до желаемых концентраций липида и детергента в смеси. Все остальные смеси с требуемыми соотношениями детергент/липид готовили из образцов с концентрацией липида 15 мМ путём разбавления буфером или раствором холата натрия определенной концентрации.

Для уравнивания образцов, непосредственно перед измерениями их нагревали до 50-60°C, выдерживали 30-50 мин и затем охлаждали до комнатной температуры и оставляли как минимум на 20 мин. Образцы, приготовленные таким образом, дают довольно хорошую воспроизводимость температуры начала роста оптической плотности смеси и температур максимумов пиков ДСК при повторных температурных сканированиях (различие меньше 2°C).

Турбидиметрические измерения проводили при длине волны 450 нм на спектрофотометре UVIKON 943 (KONTRON Instruments) с термостатируемым кюветным отделением, оборудованным магнитной мешалкой, нагревая образцы в температурном диапазоне от 8 до 85°C со скоростью ~0.8°C/мин при постоянном перемешивании. Постоянная скорость изменения температуры достигалась с помощью программируемого термостата Polystat (Cole Parmer Instrument Co., США). Температуру контролировали непосредственно в кювете с точностью 0.1°C с помощью встроенной в спектрофотометр термопары.

Калориметрические измерения проводили на микрокалориметре ДАСМ-4А со скоростью сканирования 0.27°C/мин в диапазоне температур 7-105°C при повышенном давлении в измерительной ячейке 2.6-2.8 атм. Термограммы, представляющие собой зависимости теплоемкости смеси от температуры, преобразовывались в цифровую форму.

Кривые ДСК и турбидиметрии обрабатывались с помощью программы Origin 5.0.

Результаты и обсуждения

Оптическая плотность водных растворов холата натрия близка к нулю (~ 0.01) и практически не меняется при увеличении температуры. Вероятно, это связано с тем, что холат натрия во всем изучаемом диапазоне температур образует небольшие мицеллы. А оптическая плотность водных суспензий димиристоилфосфатидилхолина (рис. 1, 0 мМ) наоборот высокая (2.89 для 5 мМ ДМФХ при 10°C), что говорит об образовании крупных агрегатов, скорее всего, мультиламеллярных везикул. При нагревании водной суспензии этого липида, дважды наблюдалось падение ее оптической плотности (рис. 1, 0 мМ) при температурах 14.6 и 24.0°C, определённых по точкам перегиба кривой.

В дальнейшем в данной работе, если не оговорено специально, для удобства сравнения основные результаты приведены при 5 мМ липида. При низких температурах (10-15°C), добавление детергента к липиду приводило сначала к некоторому росту оптической плотности смеси (рис. 1, 0.33 мМ по сравнению с 0 мМ), который можно объяснить разбуханием мультислойных агрегатов за счёт встраивания в них отрицательно заряженных молекул холата натрия. При дальнейшем добавлении детергента, наблюдалось падение оптической плотности смеси вплоть до значений, близких к нулю (меньше 0.05 при 3.2 мМ детергента). Его можно объяснить процессом сольubilизации ламеллярных агрегатов с образованием мицелл [1]. Благодаря своим малым размерам мицеллы практически не дают вклада в светорассеяние, и величина оптической плотности смеси определяется долей в ней ламеллярных агрегатов.

При нагревании смесей ДМФХ-ХН, начиная с определённой температуры,

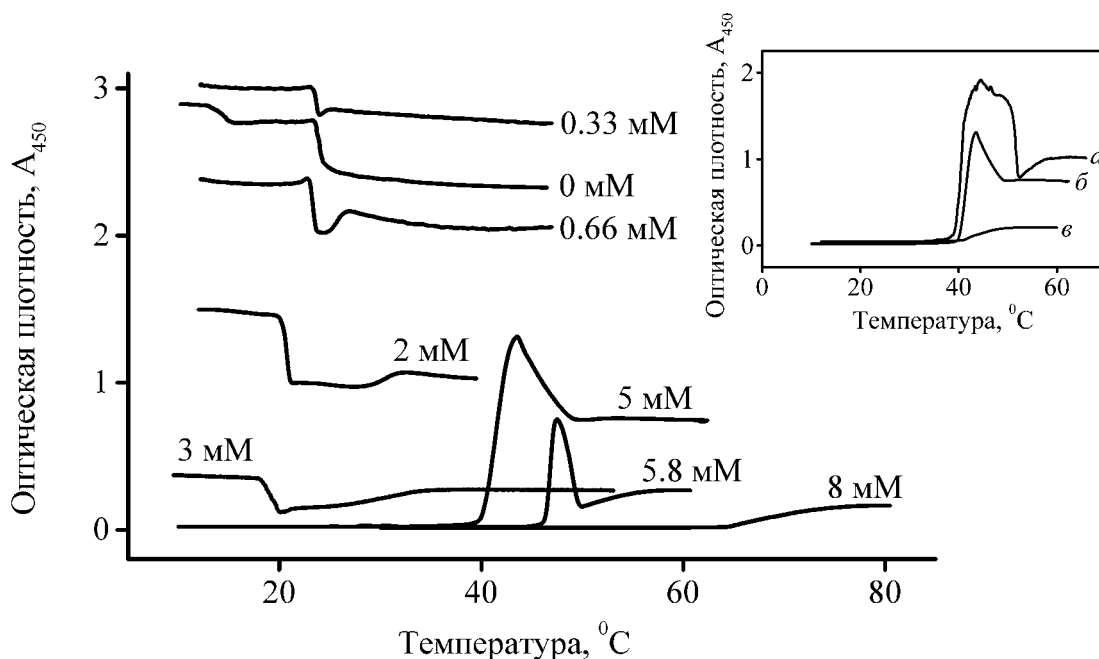


Рис. 1. Турбидиметрические кривые, полученные для системы ДМФХ-ХН в зависимости от концентрации детергента в смеси (указана рядом с кривой). Концентрация ДМФХ составляет 5 мМ. На вставке показано влияние концентрации липида в смеси на вид кривых турбидиметрии. При этом показаны смеси: $c_{\text{ДМФХ}} : c_{\text{ХН}} = 15 : 8$ мМ (а), $c_{\text{ДМФХ}} : c_{\text{ХН}} = 5 : 5$ мМ (б) и $c_{\text{ДМФХ}} : c_{\text{ХН}} = 3 : 4.5$ мМ (с), которые имеют приблизительно одинаковую температуру начала роста оптической плотности $40.0 \pm 1.2^\circ\text{C}$, что указывает на одинаковый состав липид-детергентных агрегатов.

наблюдалось увеличение их оптической плотности (рис. 1). Причём, температура начала этого роста возрастала по мере увеличения концентрации детергента в смеси (рис. 1). В зависимости от концентрации детергента, рост оптической плотности смеси был как монотонным, с последующим насыщением (рис. 1, 8 мМ), так и на кривых турбидиметрии наблюдался пик (рис. 1, 5 и 5.8 мМ). Этот рост оптической плотности указывает на увеличение размеров липид-детергентных агрегатов и может быть объяснён слиянием смешанных липид-детергентных мицелл с образованием везикул. Ранее, при определенных соотношениях детергент/липид в смеси ДМФХ-ХН, образование везикул при нагревании было показано с помощью методов динамического светорассеяния, электронной микроскопии [8-10] и малоуглового рентгеновского рассеяния [11].

Наличие пика на кривых турбидиметрии (рис. 1, 5 и 5.8 мМ) зависело как от соотношения детергент/липид в смеси, так и от абсолютной концентрации липида. Так, этот пик не наблюдался как при относительно низких (рис. 1, меньше 4 мМ), так и при достаточно высоких концентрациях детергента (рис. 1, больше 6 мМ). Кроме того, он пропадал при достаточно низких (меньше 3.5 мМ) концентрациях липида (рис. 1, вставка). При этом, как увеличение соотношения детергент/липид (рис. 1, 5.8 мМ по сравнению с 5 мМ), так и уменьшение концентрации липида (рис. 1, вставка, кривая *б* по сравнению с кривой *а*) приводило к тому, что этот пик сужался и уменьшался по высоте. Наличие этого пика на кривых турбидиметрии являлось необходимым, но не достаточным условием высокой (больше 0.7) амплитуды термоиндуцируемого структурного перехода (разности оптических плотностей смеси при высоких и низких температурах, рис. 1 и вставка). Высокая амплитуда данного перехода говорит об образовании крупных, вероятно, мультиламеллярных везикул.

Возникновение подобного пика на кривых турбидиметрии можно связать с образованием ретикулярной гелевой фазы [19]. Для системы ДМФХ-ХН, подобную фазу наблюдали при определённых температурах с помощью электронной микроскопии [10]. Из-за перемешивания в системе, образуются отдельные глобулы гелевой фазы, которые, по-видимому, имеют достаточно крупные размеры и хорошо рассеивают свет. Исчезновение этого пика может указывать либо на то, что гелевая фаза не образуется, либо на то, что глобулы гелевой фазы становятся достаточно мелкими и не обнаруживаются с помощью метода турбидиметрии. Когда пик на кривых турбидиметрии не наблюдался, то амплитуда термоиндуцируемого структурного перехода была не высокая, что указывает на образование в результате этого перехода небольших, вероятно, моноламеллярных везикул.

Как в случае турбидиметрии, увеличение концентрации детергента в смесях ДМФХ-ХН также приводило к существенному изменению вида кривых ДСК (рис. 2). Так, для чистого липида на кривой ДСК наблюдались два пика (рис. 2, 0 мМ), отвечающие предпереходу и основному фазовому переходу липида гель-жидкий кристалл, имеющие температуры максимумов 14.5 и 23.9°C, соответственно (по литературным данным 13.7 ± 2.2 и 23.6 ± 1.5 °C, соответственно [20]). Добавление даже небольшого количества детергента к липиду (рис. 2, 0.33 мМ) приводило к полному исчезновению предперехода, что указывает на встраивание детергента в бислои. У пика, отвечающего основному фазовому переходу липида гель-жидкий кристалл, при этом, появлялось высокотемпературное плечо (рис. 2, 0.33 мМ). При дальнейшем увеличении концентрации детергента наблюдалось образование двух пиков на кривых ДСК (рис. 2, 0.66 мМ). Причём, низкотемпературный пик по мере увеличения концентрации детергента в смеси постепенно смещался в область низких температур, а высокотемпературный пик в область высоких температур (рис. 2). По мере расхождения этих пиков при увеличении концентрации детергента между ними стал различим еще один пик (рис. 2, 1.3 и 2 мМ).

Площадь низкотемпературного пика при добавлении детергента постепенно уменьшалась (рис. 2) и при 8 мМ детергента он становился практически не наблюдаем (рис. 2, 8 мМ). При концентрациях детергента выше 6.5 мМ, средний пик начинал смещаться в область низких температур (рис. 2, 8 мМ по сравнению с 5 мМ). А высокотемпературный пик продолжал смещаться в область высоких температур, до тех пор, пока он не выходил за верхний предел рабочего диапазона температур (105°C).

Форма высокотемпературного пика на кривых ДСК сильно зависела от концентрации детергента и липида в смеси (рис. 2). Если фиксировать концентрацию липида в смеси, то при низких концентрациях детергента этот пик имел симметричную форму (рис. 2, 0.66-3 мМ). По мере же увеличения концентрации детергента, форма высокотемпературного пика становилась довольно сложной. На вставке рис. 2 показано изменение формы этого пика в зависимости от концентрации липида в смеси. При этом, концентрации детергента подбирались таким образом, чтобы температура начала этого пика была одинаковой (рис. 2, вставка, 56.4 ± 0.6 °C). В этом случае, энтальпия высокотемпературного пика в расчете на моль липида тоже являлась постоянной (рис. 2, вставка, 2.7 ± 0.4 кДж/моль). На вставке рис. 2 видно, что по мере уменьшения

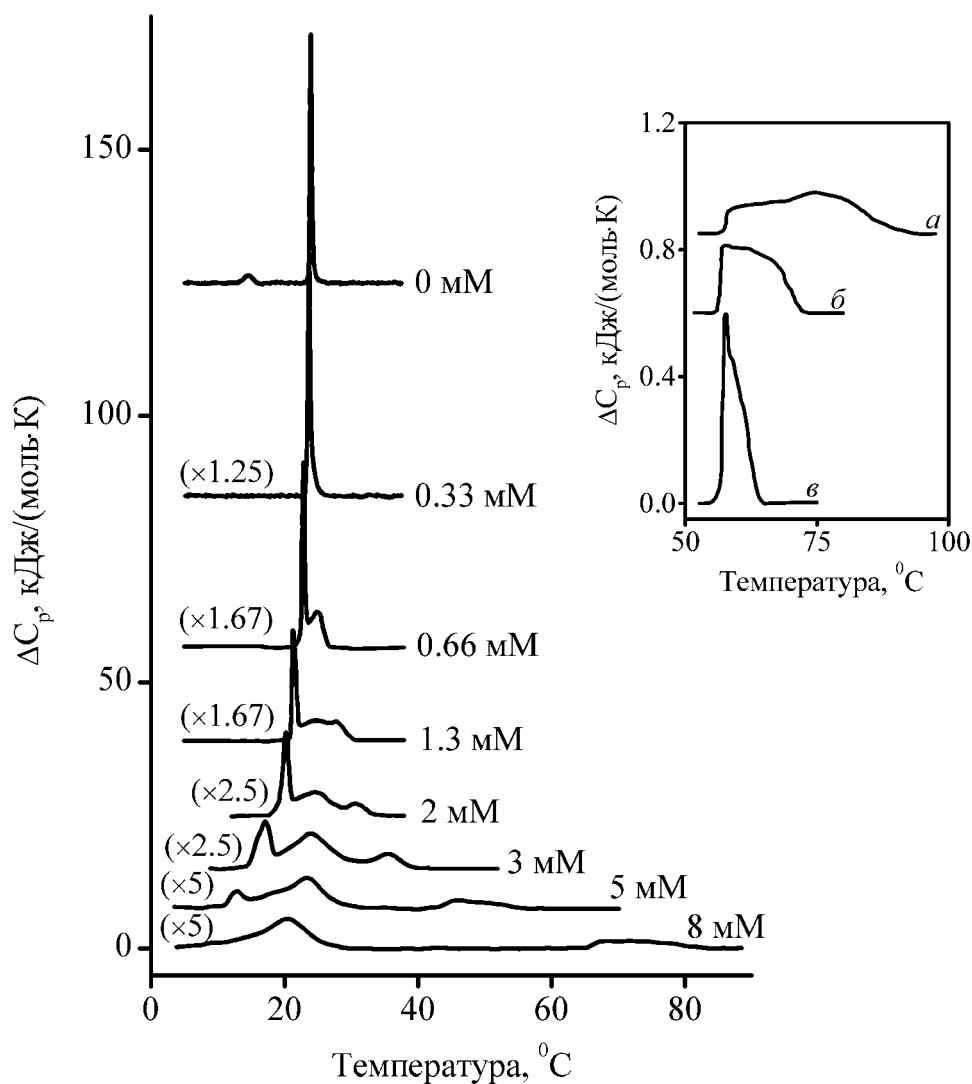


Рис. 2. Кривые ДСК, полученные для системы ДМФХ-ХН, в зависимости от концентрации детергента в смеси (указана рядом с кривой). Кривые смещены друг относительно друга для удобства. Концентрация ДМФХ составляет 5 мМ. В скобках указано, во сколько уменьшен масштаб кривых. Во вставке показано изменение формы высокотемпературного пика при уменьшении концентрации липида в смеси. При этом, показаны смеси: $c_{\text{ДМФХ}} : c_{\text{ХН}} = 12 : 10.8 \text{ мМ}$ (а), $c_{\text{ДМФХ}} : c_{\text{ХН}} = 3.1 : 5 \text{ мМ}$ (б) и $c_{\text{ДМФХ}} : c_{\text{ХН}} = 0.5 : 4 \text{ мМ}$ (с), которые имеют приблизительно одинаковую температуру начала высокотемпературного пика $56.4 \pm 0.6^\circ\text{C}$.

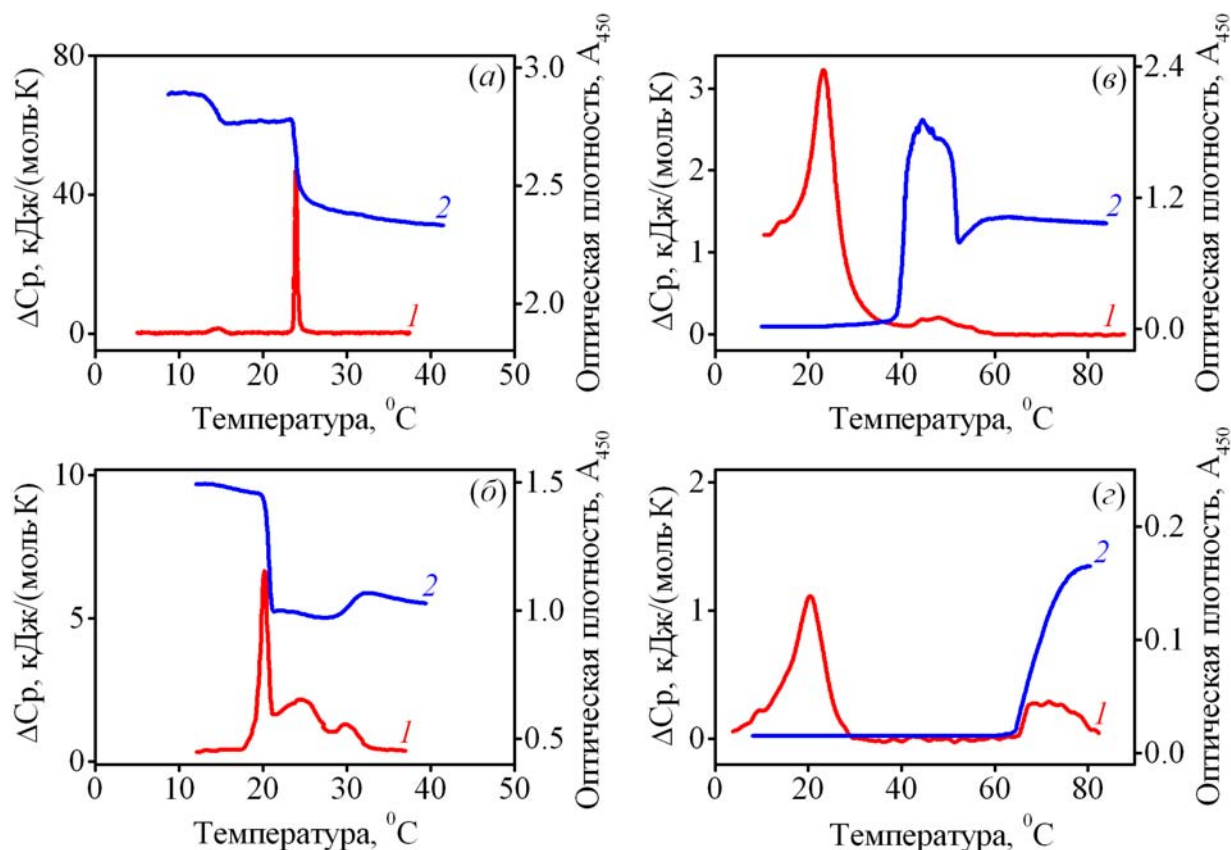


Рис. 3. Наложение кривых ДСК (1) и турбидиметрии (2) для системы ДМФХ-ХН. Показаны смеси: $c_{\text{ДМФХ}} = 5$ мМ (а), $c_{\text{ДМФХ}} : c_{\text{ХН}} = 5 : 2$ мМ (б), $c_{\text{ДМФХ}} : c_{\text{ХН}} = 15 : 8$ мМ (в) и $c_{\text{ДМФХ}} : c_{\text{ХН}} = 5 : 8$ мМ (г).

концентрации липида в смеси высокотемпературный пик сужался и превращался из широкого несимметричного пика (рис. 2, вставка, кривая а) в усеченный пик (рис. 2, вставка, кривая б), а затем в узкий пик с высокотемпературным плечом (рис. 2, вставка, кривая в).

Интерпретацию наблюдаемых фазовых переходов в системе ДМФХ-ХН можно сделать, сопоставляя данные ДСК и турбидиметрии (рис. 3). Для всех изученных образцов низкотемпературный пик на кривых ДСК наблюдался при тех же температурах, что и падение оптической плотности смеси (рис. 3б). Для чистого липида это падение наблюдалось в области основного фазового перехода липида гель-жидкий кристалл в ламеллярных структурах (рис. 3а). Отсюда следует, что низкотемпературный пик на кривых ДСК, скорее всего, связан с фазовым переходом липида гель-жидкий кристалл в ламеллярных структурах. При температурах, когда наблюдался средний пик на кривых ДСК, оптическая плотность смеси существенно не менялась (рис. 3б и 3в). При плавлении липида меняются оптические характеристики липидного бислоя, что и вызывает падение

оптической плотности смеси [21]. Однако, так как мицеллы практически не дают вклада в светорассеяние, то и плавление липида в них не будет вызывать заметного изменения оптической плотности смеси. Таким образом, средний пик на кривых ДСК можно связать с плавлением липида в мицеллах. Возрастание оптической плотности смеси наблюдалось, как правило, при более высоких температурах, чем те, при которых наблюдался средний пик на кривых ДСК (рис. 3). Следовательно, плавление липида в смешанных липид-детергентных мицеллах является необходимым, но не достаточным условием термоиндуцируемой трансформации мицеллы-везикулы.

В отличие от низкотемпературного и среднего пиков, высокотемпературный пик на кривых ДСК не может быть вызван фазовым переходом липида гель-жидкий кристалл. Дело в том, что температура высокотемпературного пика может превышать 100°C, что значительно выше температуры плавления чистого липида (24°C). Такие высокие температуры плавления могут наблюдаться только у сильно дегидратированных липидов, а не в избытке воды, как в рассматриваемом случае.

Высокотемпературный пик на кривых ДСК наблюдался в области сильных изменений оптической плотности смеси, которые можно связать с термоиндуцируемой трансформацией мицеллы-везикулы (рис. 3б, 3в и 3г). Поэтому, можно заключить, что этот пик отвечает некоторому эндотермическому тепловому процессу, происходящему при данной трансформации. Причём, данный процесс происходит кооперативно. А из того, что высокотемпературный пик сужается по мере уменьшения концентрации липида в смеси, следует, что при этом кооперативность этого процесса возрастает. Таким процессом, например, может быть частичная дегидратация молекул детергента. Так, трансформация мицеллы-везикулы в системе ДМФХ-ХН, предположительно, вызвана изменением локализации молекул холата натрия относительно молекул липида, при котором, гидроксильные группы детергента оказываются в липидном окружении [22]. Понятно, что при этом будет происходить частичное разрушение гидратной оболочки этих молекул, что будет сопровождаться поглощением тепла.

Выводы

Концентрации липида и детергента в смеси ДМФХ-ХН существенно влияют на размер везикул, которые образуются в ходе термоиндуцируемой трансформации в этой системе. А именно, крупные, вероятно, мультиламеллярные везикулы образуются только при концентрациях липида больших 3 мМ и в довольно узком диапазоне концентраций детергента (4.5-5.3 мМ при 5 мМ ДМФХ). При этом, им обязательно предшествует

образование крупных глобул ретикулярной гелевой фазы. При всех других концентрациях липида и детергента в смесях ДМФХ-ХН в результате термоиндуцируемой трансформации образуются небольшие, вероятно, моноламеллярные везикулы. В ходе термоиндуцируемой трансформации мицеллы-везикулы наблюдался некоторый кооперативный, эндотермический процесс. Он может быть связан с частичной дегидратацией молекул холата натрия при перемещении их гидроксильных групп в область углеводородных цепей липида. Кооперативность этого процесса возрастает по мере уменьшения концентрации липида в смеси. Интерпретация данных ДСК позволила предположить, что при нагревании смесей ДМФХ-ХН фазовый переход липида геле-жидкий кристалл наблюдается вначале в смешанных ламеллярных структурах, а затем только в смешанных липид-детергентных мицеллах. Причём, плавление липида в мицеллах является необходимым условием для термоиндуцируемой трансформации мицеллы-везикулы.

Список литературы

1. Lichtenberg D. Micelles and Liposomes // Biomembranes. Physical Aspects M. Schinitzky Ed. VCH. 1993. P. 63-95.
2. Storm G., Crommelin J.A. Liposomes: quo vadis? // Pharm. Sci. Technol. Today. 1998. V. 1, P. 19-31.
3. Carey M.C., Small D.M., Bliss C.M. Lipid digestion and absorption // Annu. Rev. Physiol. 1983. V. 45, P. 651-677.
4. Caffrey M. Membrane protein crystallization // J. Struct. Biol. 2003. V. 142, P. 108-132.
5. Prosser R.S., Evanics F., Kitevski J.L., Al-Abdul-Wahid M.S. Current applications of bicelles in NMR studies of membrane-associated amphiphiles and proteins // Biochemistry 2006. V. 45, P. 8453-8465.
6. Rigaud J.L. Membrane proteins: functional and structural studies using reconstituted proteoliposomes and 2-D crystals // Braz. J. Med. Biol. Res. 2002. V. 35, P. 753-766.
7. Garavito R.M., Ferguson-Miller S. Detergents as tools in membrane biochemistry // J. Biol. Chem. 2001. V. 276, P. 32403-32406.
8. Полозова А.И., Дубачев Г.Э., Симонова Т.Н., Барсуков Л.И. Аномальное термотропное поведение бинарных смесей насыщенных фосфатидилхолинов с холатом натрия // Биоорганическая химия 1993. № 19, С. 655-662.

9. Polozova A.I., Dubachev G.E., Simonova T.N., Barsukov L.I. Temperature-induced micellar-lamellar transformation in binary mixtures of saturated phosphatidylcholines with sodium cholate // FEBS Letters 1995. V. 358, P. 17-22.
10. Дубачев Г.Э., Полозова А.И., Симонова Т.Н., Боровякин В.Л., Демин В.В., Барсуков Л.И. Электронно-микроскопическое исследование переходных структур при термоиндуцируемой трансформации мицеллы-везикулы в системе димиристоилфосфатидилхолин – холат натрия // Биологические мембраны 1996. № 13, С. 100-108.
11. Lesieur P., Kiselev M.A., Barsukov L.I., Lombardo D. Temperature-induced micelle to vesicle transition: kinetic effects in the DMPC/NaC system // J. Appl. Crystallogr. 2000. V. 33, P. 623-627.
12. Inoue T., Kawamura H., Okukado S., Shimosawa R. Characterization of molecular assemblies formed in aqueous C₁₀E₇/DPPC mixture by spin label and fluorescence probe techniques and mechanism of micelle-to-vesicle transformation // J. Colloid Interf. Sci. 1994. V. 168, P. 94-102.
13. Majhi P.R., Blume A. Temperature-induced micelle-vesicle transitions in DMPC-SDS and DMPC-DTAB mixtures studied by calorimetry and dynamic light scattering // J. Phys. Chem. B 2002. V. 106, P. 10753-10763.
14. Van Dam L., Karlsson G., Edwards K. Direct observation and characterization of DMPC/DHPC aggregates under conditions relevant for biological solution NMR // Biochem. Biophys. Acta 2004. V. 1664, P. 241-256.
15. Carion-Taravella B., Chopineau J., Ollivon M., Lesieur S. Phase behavior of mixed aqueous dispersions of DPPC and dodecyl glycosides: Aggregation states implicated in the micelle-to-vesicle transition // Langmuir 1998. V. 14, P. 3767-3777.
16. Miguel M., Eidelman O., Ollivon M., Walter A. Temperature Dependence of the Vesicle-Micelle Transition of Egg Phosphatidylcholine and Octyl Glucoside // Biochemistry 1989. V. 28, P. 8921-8928.
17. Schnitzer E., Lichtenberg D., Kozov M.M. Temperature-dependence of the solubilization of dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) by the non-ionic surfactant Triton X-100, kinetic and structural aspects // Chem. Phys. Lipids 2003. V. 126, P. 55-76.
18. Bayerl T.M., Werner G., Sackmann E. Solubilization of DMPC and DPPC vesicles by detergents below their critical micellization concentration: high-sensitivity differential scanning calorimetry. Fourier transform infrared spectroscopy and freeze-fracture electron

- microscopy reveal two interaction sites of detergents in vesicles // *Biochim. Biophys. Acta* 1989. V. 984, P. 214-224.
19. Inoue T., Motoyama R., Totoki M., Miyakawa K., Shimosawa R. Molecular aggregates formed in aqueous mixtures of POE type nonionic surfactants and phosphatidylcholines // *J. Colloid Interf. Sci.* 1994. V. 164, P. 318-324.
 20. Koynova R., Caffrey M. Phases and phase transitions of the phosphatidylcholines // *Biochim. Biophys. Acta.* 1998. V. 1376, P. 91-145.
 21. Yi P.N., Macdonald R.C. Temperature dependence of optical properties of aqueous dispersions of phosphatidylcholine // *Chem.Phys.Lipids* 1973. V. 11, P. 114-134.
 22. Гольцов А.Н., Кондратьева О.В., Барсуков Л.И. Структурный переход мицеллы-везикулы в смешанной системе, состоящей из димиристоилфосфатидилхолина и холата натрия // *Нелинейные явления в открытых системах.* Москва, 1997. Вып. 8, С. 87–101.