

## НОВЫЙ СПОСОБ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ СОСТАВА СМЕШАННЫХ ЛИПИД-ДЕТЕРГЕНТНЫХ АГРЕГАТОВ

Ю. В. Храмцов (1), 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

Понимание структуры и функций большинства мембранных белков было во многом достигнуто благодаря их выделению с помощью детергентов из нативных мембран и последующей реконструкции этих белков в липосомы с известным липидным составом путём удаления детергента [1]. К сожалению, механизмы солюбилизации и реконструкции мембран с участием детергентов пока полностью не ясны даже для смешанных липид-детергентных систем, не говоря уж о системах содержащих белок [2-4]. Однако, их исследование существенно облегчилось с открытием трансформации между мицеллами и везикулами, вызываемой простым изменением температуры [5, 6]. Понимание структурообразования в смешанных липид-детергентных системах необходимо и во многих других практических приложениях. Так, например, в настоящее время смешанные бислойные липид-детергентные агрегаты, способные ориентироваться в магнитном поле, получившие название бицеллы, широко используются для структурного исследования как растворимых, так и мембранных белков с помощью метода ядерного магнитного резонанса [7]. Причём, магнитное ориентирование наблюдается только в определённом диапазоне температур и концентраций детергента и липида. Поэтому для более эффективного практического использования бицелл необходимо понимание их строения при различных условиях.

Известно, что равновесное строение липид-детергентных агрегатов во многом определяется их составом, а именно мольным отношением детергент/липид в смешанных агрегатах, которое обозначается  $R_e$  [8]. Концентрацию детергента в водной фазе при этом обычно обозначают  $D_w$ . Для детергентов с высокой критической концентрацией мицеллообразования  $R_e$  сильно отличается от общего отношения детергент/липид в смеси благодаря тому, что часть молекул детергента находится в водной фазе в виде мономеров. Параметры  $R_e$  и  $D_w$  широко используют, как в различных практических приложениях, так и при теоретическом описании структурного поведения смешанных

липид-детергентных систем [8-10]. В связи с этим необходим простой и надёжный способ определения этих параметров по экспериментальным данным. Причём, желательно знать, как эти параметры зависят от температуры, особенно при изучении термоиндуцируемых структурных переходов. Кроме того, эти параметры, вообще говоря, могут зависеть от фазового состояния липид-детергентной системы. Поэтому, целями нашей работы являлись разработка эффективного способа определения параметров  $R_c$  и  $D_w$  и изучение зависимости этих параметров от температуры и фазового состояния липида на примере системы димиристоилфосфатидилхолин-холат натрия (ДМФХ-ХН), изученной методом дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК). Для того, чтобы определить эти параметры в широких диапазонах концентраций компонентов и температур существующими способами обычно необходимо проанализировать большое число экспериментальных данных, и как следствие этого, эти оценки занимают много времени [8, 11-13]. Поэтому, также нужно было минимизировать необходимое при расчётах число липид-детергентных смесей.

### **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 получения смеси с требуемым соотношением липид/детергент сначала готовили водный 10 мМ Трис-буфер (pH 8 – 8.1), содержащий 1 мМ EDTA и 75 мМ NaCl. Далее готовили концентрированные растворы холата натрия (100 мМ) и ДМФХ (50 мМ или 100 мМ) в данном буфере. Прежде всего, путём смешивания концентрированных растворов холата натрия и липида с буфером в необходимых соотношениях, получались исходные смеси с концентрацией липида 15 мМ и различными концентрациями детергента, лежащими в диапазоне от 0 до 17 мМ. Все остальные образцы, были получены из исходных, путём разведения последних либо буфером, либо раствором холата натрия определённой концентрации.

Перед измерениями образцы уравнивались 30 – 40 мин при температуре 50 - 60°C и затем охлаждались до комнатной температуры с целью приведения липид-детергентных систем к стандартному исходному состоянию. Образцы, приготовленные таким образом, дают довольно хорошую воспроизводимость в режиме температурного сканирования.

Калориметрические измерения проводились на микрокалориметре ДАСМ-4А со скоростью сканирования  $0.27^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ , при которой заведомо устанавливается равновесие в системе. В измерительной ячейке создавалось повышенное давление в 2.6-2.8 атм, что позволило проводить измерения в диапазоне температур от  $7^{\circ}\text{C}$  до  $105^{\circ}\text{C}$ . Термограммы, представляющие собой зависимости теплоемкости смеси от температуры, преобразовывались в цифровую форму и обрабатывались с помощью программы Origin5.0. Эта программа использовалась и при интерполяции с помощью метода наименьших квадратов экспериментальных данных в соответствии с предложенной зависимостью.

### **Результаты и обсуждения**

При изменении концентрации холата натрия в смесях с определённой концентрацией димиристоилфосфатидилхолина наблюдалось существенное изменение вида кривых ДСК (рис. 1а). При этом, на кривых ДСК можно выделить три основных пика, положение, форма и площадь которых могут меняться по мере добавления детергента (рис. 1а). Для сравнения липид-детергентных смесей системы ДМФХ-ХН на кривых ДСК были выбраны характеристические точки. Исходя из соображений воспроизводимости и точности определения температур этих точек, ими были выбраны максимумы трёх основных пиков на кривых ДСК, имеющие температуры  $T_1$ ,  $T_2$  и  $T_3$  (рис.

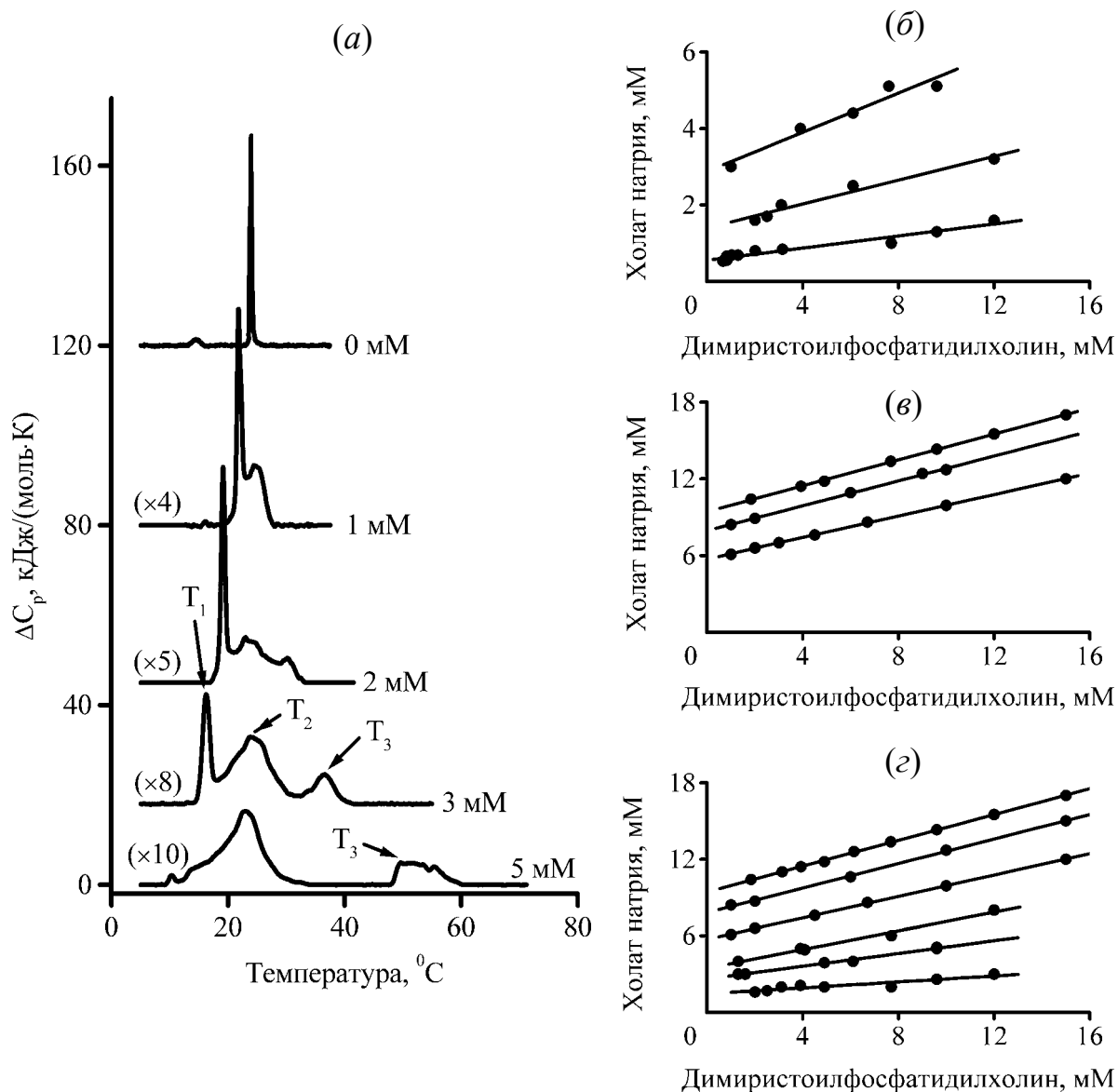


Рис. 1. Внешний вид кривых ДСК, полученных для системы ДМФХ-ХН при различных концентрациях холата натрия в смеси (а). Концентрация ДМФХ составляет 3 мМ. На кривых указаны, во сколько изменен масштаб кривых и концентрация холата натрия в смеси. Кривые сдвинуты друг относительно друга для удобства. Указаны температуры максимумов трёх основных пиков на кривых ДСК:  $T_1$ ,  $T_2$  и  $T_3$ . Линейные зависимости, полученные для смесей ДМФХ-ХН с одинаковой температурой  $T_1$  (б),  $T_2$  (в) или  $T_3$  (г).

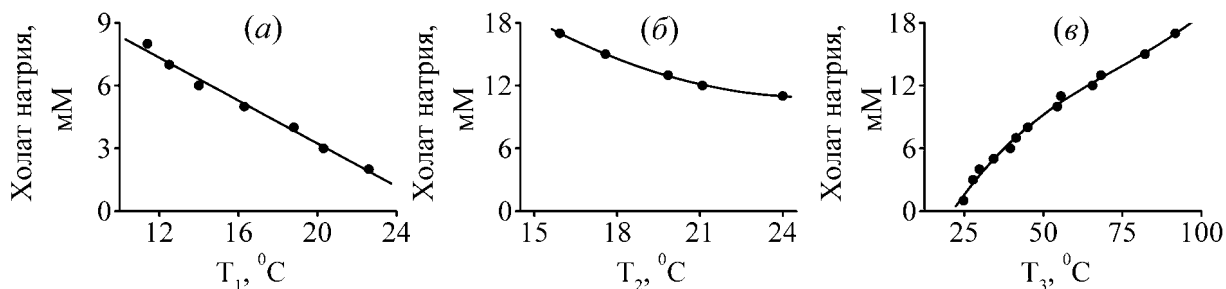


Рис. 2. Зависимости между концентрацией холата натрия и температурами характеристических точек  $T_1$  (а),  $T_2$  (б) и  $T_3$  (в) для набора смесей с постоянной концентрацией липида равной 15 мМ.

1а). Когда высокотемпературный пик на кривых ДСК имел усечённую форму, то за  $T_3$  принимали температуру, при которой избыточная теплоёмкость смеси выходит на приблизительно постоянный уровень (рис. 1а, 5 мМ).

Далее для множества смесей с различными концентрациями детергента и липида (от 1 до 15 мМ для ДМФХ и от 0 до 17 мМ для ХН) сравнивались температуры характеристических точек  $T_i$ . Из всех изученных смесей были отобраны те смеси, у которых одна из температур  $T_i$  совпадает. Оказалось, что смеси с приблизительно одинаковой температурой  $T_1$ ,  $T_2$  или  $T_3$  довольно хорошо ложатся на одну прямую, построенную в координатах липид-детергент (рис. 1б, 1в и 1г). При этом, если обозначить  $\Delta T_i$  разность соответствующих температур двух произвольно взятых липид-детергентных смесей, то для любой пары смесей, принадлежащих одной из представленных прямых,  $\Delta T_1 \leq 1^\circ\text{C}$ ,  $\Delta T_2 \leq 0.9^\circ\text{C}$ ,  $\Delta T_3 \leq 1.9^\circ\text{C}$ . Эти значения лежат в пределах ошибок измерения данных температур. Известно, что подобные линейные зависимости, в принципе, могут нарушаться при очень низких концентрациях липида [14]. Однако, для системы ДМФХ-ХН в диапазоне концентраций липида 1-15 мМ заметных отклонений от линейности не обнаружено.

Линейную зависимость между концентрациями детергента ( $D$ ) и липида ( $L$ ) для смесей с одинаковой  $T_i$  можно записать в виде:

$$D = D_w^i(T_i) + R_e^i(T_i) \cdot L \quad (1)$$

Наклон этой зависимости,  $R_e^i$ , задаёт эффективное молярное отношение детергент/липид в смешанных агрегатах, а пересечение этой зависимости с осью ординат,  $D_w^i$ , концентрацию детергента в водной фазе [11, 13]. Эти параметры зависят как от выбора

характеристической точки,  $i$ , так и от температуры этой характеристической точки,  $T_i$ . Характеристическая точка отвечает определённому физическому процессу. Следовательно, параметры  $D_w^i$  и  $R_e^i$  определяются с одной стороны при определённой температуре, а с другой стороны для конкретного физического процесса.

Способ определения параметров  $R_e^i$  и  $D_w^i$ , основанный на отборе липид-детергентных смесей с приблизительно одинаковой температурой характеристической точки  $T_i$ , требует изучения большого числа экспериментальных смесей. Кроме того, из-за ограниченного числа этих смесей он не позволяет получить параметры  $R_e^i$  и  $D_w^i$  во всех точках изучаемой области фазовой диаграммы. Однако, эти проблемы можно решить с помощью интерполяции экспериментальных данных в соответствии с определёнными математическими зависимостями. Для этого нужно определить конкретный вид зависимостей  $D_w^i(T_i)$  и  $R_e^i(T_i)$  в выражении (1).

Изучение системы ДМФХ-ХН проводили на наборах смесей с постоянной концентрацией липида и переменной концентрацией детергента. Для каждого такого набора строили зависимости между концентрацией детергента в смеси и одной из температур характеристических точек  $T_1$ ,  $T_2$  или  $T_3$  (рис. 2). При этом, выбирался только тот диапазон концентраций детергента, где зависимость между концентрацией холата натрия и  $T_i$  является взаимнооднозначной. Так, например, для построения зависимости между концентрацией холата натрия и  $T_2$  был исключён тот диапазон концентраций, где  $T_2$  является приблизительно постоянной и равной 23-24°C. Математический вид зависимости между концентрацией холата натрия и  $T_i$  искался в классе полиномов. Было получено, что для  $T_1$  (рис. 2а) экспериментальные данные для всех изученных наборов смесей хорошо описываются полиномами первой степени, для  $T_2$  – полиномами второй степени (рис. 2б, выше 10 мМ), а для  $T_3$  (рис. 2в) – полиномами третьей степени.

Из (1) понятно, что если зависимость  $D = D(T_i, L)$  является полиномом степени  $n$  при любой постоянной концентрации липида  $L$ , то зависимости  $D_w^i(T_i)$  и  $R_e^i(T_i)$  тоже будут полиномами степени не выше, чем  $n$ . Таким образом, интерполяция экспериментальных данных проводилась с помощью метода наименьших квадратов в соответствии с зависимостью:

$$c_{\text{ХН}} = a_1 + a_2 \cdot T_i + a_3 \cdot T_i^2 + a_4 \cdot T_i^3 + (b_1 + b_2 \cdot T_i + b_3 \cdot T_i^2 + b_4 \cdot T_i^3) \cdot c_{\text{ДМФХ}} \quad (2),$$

где  $c_{\text{ХН}}$  и  $c_{\text{ДМФХ}}$  – концентрации холата натрия и димиристоилфосфатидилхолина, соответственно. При интерполяции считалось, что для  $T_1$  параметры  $a_3 = a_4 = b_3 = b_4 = 0$  (3), а для  $T_2$  параметры  $a_4 = b_4 = 0$  (4). Если при интерполяции ошибка какого-нибудь параметра была больше значения этого параметра, то этот параметр для определённости полагали равным нулю.

Оказалось, что экспериментальные данные хорошо описываются зависимостью (2). Так, во всех случаях коэффициент корреляции был больше 0.994. А среднеквадратичное отклонение экспериментальных точек от зависимости (2) (0.21-0.33 мМ) было той же величины, что и ошибки приготовления образцов (0.2-0.3 мМ). Кроме того, максимальное отклонение экспериментальных точек от зависимости (2) (0.38-0.56 мМ) тоже не сильно отличалось от ошибок приготовления образцов. Параметры зависимости (2) не зависели от начальных условий интерполяции, и можно было считать, что они определяются однозначно.

Зависимость (2), ничто иное, как задание в неявном виде зависимостей  $T_1$ ,  $T_2$  или  $T_3$  от концентрации липида и детергента в смеси. Поэтому, для любой липид-детергентной смеси из исследуемого диапазона концентраций можно определить параметры  $D_w^i$  и  $R_e^i$  по формулам:

$$D_w^i = a_1 + a_2 \cdot T_i + a_3 \cdot T_i^2 + a_4 \cdot T_i^3 \quad (5),$$

$$R_e^i = b_1 + b_2 \cdot T_i + b_3 \cdot T_i^2 + b_4 \cdot T_i^3 \quad (6).$$

При этом, данные параметры, вообще говоря, определяются при температуре  $T_i$ .

Программа Origin5.0 позволяет не только определить ошибки параметров при интерполяции, но и получить ковариационную матрицу ошибок. Используя эту матрицу и выражения (5) и (6) можно легко рассчитать среднеквадратичные ошибки определения параметров  $R_e^i$  и  $D_w^i$  при любом значении  $T_i$ . Больше всего они были при использовании температуры характеристической точки  $T_3$  и составляли 0.1-0.3 мМ для  $D_w$  и 0.011-0.047 для  $R_e$ . Иными словами, предложенный способ позволяет определить параметры  $D_w$  и  $R_e$  с высокой точностью.

При использовании температуры характеристической точки  $T_1$ , исходя из выражения (2) и условия (3), можно заключить, что минимальное число экспериментальных смесей,

для определения предложенным способом параметров  $R_e$  и  $D_w$ , составляет 4. Однако, для надежного определения этих параметров, число экспериментальных смесей должно быть, по крайней мере, вдвое большим.

Для выяснения зависимостей  $R_e$  и  $D_w$  от температуры было проведено сравнение результатов, полученных для системы ДМФХ-ХН по трём различным характеристическим точкам. На рис. 3 представлены рассчитанные с помощью выражений (2), (5) и (6) зависимости параметров  $D_w^i$  и  $R_e^i$  от концентрации холата натрия для смесей с концентрацией димиристоилфосфатидилхолина 5 мМ. Зависимости  $D_w^i$  от концентрации холата натрия в смеси, полученные по  $T_2$  и  $T_3$ , в пределах ошибок измерения совпадают (рис. 3а). Это наблюдается и для зависимостей  $R_e^i$  от концентрации холата натрия, полученных по  $T_2$  и  $T_3$  (рис. 3б). Средний и высокотемпературный пики на кривых ДСК, по которым определены  $T_2$  и  $T_3$ , отвечают различным физическим процессам. Так, низкотемпературный и средний пики можно объяснить фазовым переходом липида гель-жидкий кристалл в липид-детергентных агрегатах [13]. А, высокотемпературный пик, не может быть обусловлен фазовым переходом липида гель-жидкий кристалл, т.к. его температура может превышать  $100^\circ\text{C}$ , что значительно выше температуры плавления чистого липида при избытке воды ( $24^\circ\text{C}$ ). Если  $R_e^i$ , отвечающие двум разным физическим процессам совпадают, то, скорее всего, они совпадают со средним  $R_e$  для данной липид-детергентной смеси. Кроме того, температуры  $T_2$  и  $T_3$  могут отличаться на  $80^\circ\text{C}$  и более. Поэтому, хорошее совпадение параметров  $R_e^i$  и  $D_w^i$ , полученных по  $T_2$  и  $T_3$ , говорит о том, что для изученных смесей ДМФХ-ХН  $R_e$  и  $D_w$  практически не зависят от температуры.



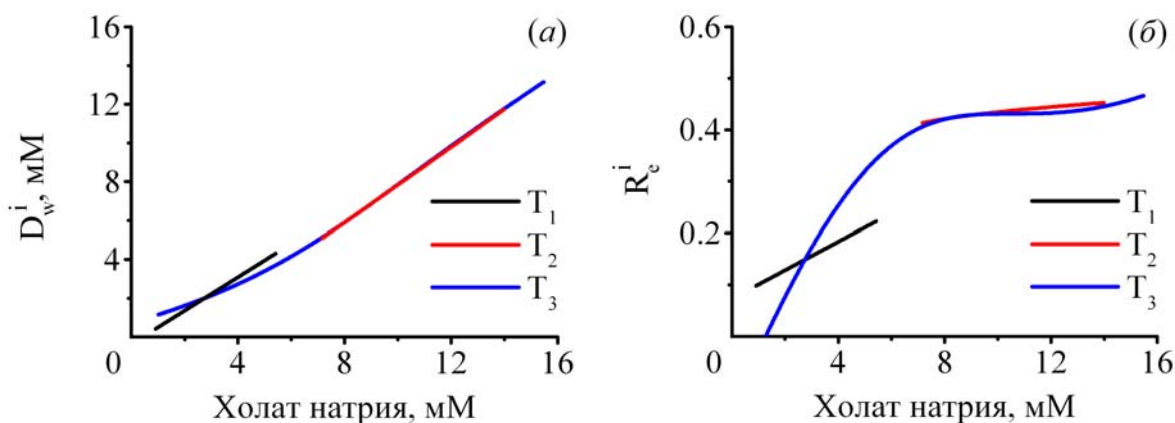


Рис. 3. Зависимости параметров  $D_w^i$  (а) и  $R_e^i$  (б) от концентрации холата натрия для смесей с концентрацией липида 5 мМ, полученные по выражениям (2), (5) и (6) для  $T_1$ ,  $T_2$  и  $T_3$ .

Зависимости  $D_w^i$  от концентрации холата натрия в смеси, полученные по  $T_1$  и  $T_3$ , отличаются друг от друга не достоверно (рис. 3а). Однако, зависимость  $R_e^i$  от концентрации холата натрия, полученные по  $T_1$  и  $T_3$ , достоверно ( $p < 0.05$ ) отличаются друг от друга при низких (меньше 1.6 мМ) и высоких (больше 3.5 мМ) концентрациях детергента (рис. 3б). При этом, следует отметить, что при температуре  $T_1$  липид в системе находится преимущественно в гелевом состоянии. В то время, как при температуре  $T_3$ , липид находится уже в жидкокристаллическом состоянии. Этим можно объяснить отличия между  $R_e^i$ , полученными по  $T_1$  и  $T_3$ .

### Выводы

Разработан новый эффективный способ количественного определения состава липид-детергентных агрегатов. Его достоинствами являются точность определения параметров  $R_e$  и  $D_w$ , оценка зависимости этих параметров от температуры и небольшое число липид-детергентных смесей, необходимых для анализа (минимум 4). Данный способ был описан на примере анализа данных дифференциальной сканирующей калориметрии, но его легко можно обобщить и на другие физико-химические методы анализа. Главное при этом, правильно выбрать характеристические точки на соответствующих кривых. Так, например, используя метод турбидиметрии и выбрав в качестве характеристической точки начало роста оптической плотности смеси, в нашей лаборатории были получены сходные параметры  $R_e$  и  $D_w$  (не опубликованные данные).

Еще одним существенным достоинством предложенного способа является то, что он позволяет оценить «локальное»  $R_e$ , которое непосредственно влияет на данный физический процесс. Благодаря этому, для системы ДМФХ-ХН, было показано, что соотношение детергент/липид в смешанных агрегатах может отличаться в гелевом и жидкокристаллическом состоянии липида. Кроме того, для системы ДМФХ-ХН было установлено, что в жидкокристаллическом состоянии липида  $R_e$  и  $D_w$  не зависят от температуры.

### Список литературы

1. 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.
2. Almgren M. Mixed micelles and other structures in the solubilization of bilayer lipid membranes by surfactants // Biochim. Biophys. Acta 2000. V. 1508, P. 146-163.
3. Leng J., Egelhaaf S.U., Cates M.E. Kinetics of the micelle-to-vesicle transition: aqueous lecithin-bile salt mixtures // Biophys. J. 2003. V. 85, P. 1624-1646.
4. Stuart M.C.A., Boekema E.J. Two distinct mechanisms of vesicle-to-micelle and micelle-to-vesicle transition are mediated by the packing parameter of phospholipid-detergent systems // Biochim. Biophys. Acta 2007. V. 1768, P. 2681-2689.
5. 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.
6. Inoue T., Kawamura H., Okukado S., Shimosawa R. Characterization of molecular assemblies formed in aqueous  $C_{10}E_7$ /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.
7. 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.
8. Lichtenberg D., Opatowski E., Kozlov M.M. Phase boundaries in mixtures of membrane-forming amphiphiles and micelle-forming amphiphiles // Biochim. Biophys. Acta 2000. V. 1508, P. 1-19.

9. Andelman D., Kozlov M.M., Helfrich W. Phase transition between vesicles and micelles driven by competing curvatures // *Europhys. Lett.* 1994. V. 25, P. 231-236.
10. Гольцов А.Н., Кондратьева О.В., Барсуков Л.И. Структурный переход мицеллы-везикулы в смешанной системе, состоящей из димиристоил-фосфатидилолина и холата натрия // *Нелинейные явления в открытых системах.* Москва, 1997. Вып. 8, С. 87-101.
11. Lasch J. Interaction of detergents with lipid vesicles // *Biochim. Biophys. Acta* 1995. V. 1241, P. 269-292.
12. 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.
13. 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.
14. Roth Y., Opatowski E., Lichtenberg D., Kozlov M.M. Phase behavior of dilute aqueous solutions of lipid-surfactant mixtures: effects of finite size of micelles // *Langmuir* 2000. V. 5, P. 2052-2061.