



УДК 577.352.2

© 1993 А. И. Полозова*, Г. Э. Дубачев,
Т. Н. Симонова, Л. И. Барсуков

АНОМАЛЬНОЕ ТЕРМОТРОПНОЕ ПОВЕДЕНИЕ БИНАРНЫХ СМЕСЕЙ НАСЫЩЕННЫХ ФОСФАТИДИЛХОЛИНОВ С ХОЛАТОМ НАТРИЯ

Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва;

**Московский физико-технический институт*

Методами турбидиметрии, дифференциальной сканирующей калориметрии и электронной микроскопии исследовано термотропное поведение смесей дипальмитоил- и димиристоилфосфатидилхолина с холатом натрия. Установлено, что при определенных соотношениях детергент/липид эти смеси ведут себя необычным образом, резко изменяя свое состояние в узком температурном интервале. Показано, что такое поведение изученных систем обусловлено обратимой трансформацией мицеллярных структур в ламеллярные, причем тип и морфология ламеллярных структур, формирующихся при температурных воздействиях, зависят от соотношения детергент/липид в смешанной системе. Эта трансформация непосредственно связана с фазовым переходом липидных молекул из гелевого состояния в жидкокристаллическое, хотя и не является прямым следствием этого перехода. Описанные системы представляют интерес для изучения переходных состояний и смешанных структур, формирующихся на различных этапах самосборки мембран при реконструкции.

В настоящее время значительное внимание уделяется изучению свойств смешанных липид-детергентных систем. Особый интерес в этом отношении представляют системы, содержащие соли желчных кислот, которые широко используются при реконструкции мембран [1]. Несмотря на активные исследования в этой области, полного описания систем такого рода не существует до сих пор, а теоретические модели, построенные на основе имеющихся экспериментальных данных, имеют много неясностей и противоречий.

В своих исследованиях, направленных на разработку новых подходов к реконструкции мембран, мы провели детальное изучение бинарных смесей, состоящих из насыщенных фосфолипидов — димиристоилфосфатидилхолина (DMPC), дипальмитоилфосфатидилхолина (DPPC) и холата натрия (ChNa). При проведении этих исследований нам удалось обнаружить интересные, ранее не описанные особенности поведения таких систем в области фазового перехода гель — жидкий кристалл, непосредственно связанные с процессом трансформации смешанных липид-детергентных мицелл в ламеллярные структуры. Результаты, полученные в настоящей работе, показывают, что переход мицеллы — ламеллярные структуры

Сокращения: DPPC — дипальмитоилфосфатидилхолин, DMPC — димиристоилфосфатидилхолин, ChNa — холат натрия, ККМ — критическая концентрация мицеллообразования, ДСК — дифференциальная сканирующая калориметрия.

в определенных условиях может быть индуцирован только за счет температурных воздействий, что открывает новые возможности для изучения природы этого перехода, а также для реконструкции мембран без изменения соотношения детергент/липид в исходной смеси.

Известно, что характер агрегации молекул в детергент-липидных системах зависит от соотношения образующих их компонентов [2—6]. При избытке детергента такие системы находятся в мицеллярном состоянии с частицами малых размеров, которые слабо рассеивают свет в видимой области, и поэтому мицеллярные растворы выглядят практически прозрачными. При избытке липида светорассеяние резко возрастает вследствие агрегации молекул в крупные частицы, которые, как полагают, имеют ламеллярную структуру. При постоянной температуре поведение изученных нами смесей холата натрия с насыщенными фосфатидилхолинами ничем не отличается от поведения других липид-детергентных систем. Так, при фиксированной концентрации фосфолипида рост содержания детергента в смеси сопровождается характерными изменениями мутности с резким ее уменьшением в области перехода ламеллярных структур в смешанные мицеллы.

Нормальным образом, т. е. в соответствии со своим фазовым и агрегатным состоянием, ведут себя типично ламеллярные и мицеллярные системы и при изменении температуры. В случае мицелл светорассеяние образцов при повышении температуры практически не меняется (рис. 1, кривые 5), тогда как для ламеллярных структур наблюдается небольшое уменьшение светорассеяния в области фазового перехода гель — жидкий кристалл (рис. 1, кривые 1), ранее описанное в литературе для водных дисперсий насыщенных фосфолипидов [7]. Однако в определенном и достаточно узком интервале соотношений детергент/липид мицеллярные системы, образуемые насыщенными фосфатидилхолинами с холатом натрия, начинают вести себя неожиданным образом, резко изменяя свою мутность даже при сравнительно небольших изменениях температуры.

На рис. 1 показаны типичные изменения светорассеяния образцов, содержащих 20 мМ насыщенный фосфатидилхолин (DPPC и DMPC) и различные концентрации холата натрия, в зависимости от температуры. Характерная особенность большинства полученных кривых — скачкообразное возрастание светорассеяния при повышении температуры образца всего на 1—2° С; при этом оптическая плотность, как правило, достигает значений, соответствующих типично ламеллярным структурам. Такое поведение свойственно только насыщенным фосфатидилхолинам и не наблюдается в случае смесей яичного фосфатидилхолина с холатом натрия (данные не приведены). Скачкообразные изменения мутности образцов обратимы, и при понижении температуры их светорассеяние вновь возвращается к значениям, характерным для исходных мицеллярных систем. Кривые, отвечающие нагреванию и охлаждению образца, полностью совпадают, если скорость изменения температуры не превышает 0,33° С/мин. Это означает, что в указанных условиях такие системы находятся в квазистационарном состоянии и успевают прийти в равновесие в процессе температурного сканирования.

Вид турбидиметрических кривых и их положение вдоль оси температур зависят от концентрации детергента в смеси. При малом содержании холата натрия они имеют плавный характер (см. кривые 2 на рис. 1) и растянуты по температурной шкале. При увеличении концентрации детергента изменения мутности происходят более резко и в меньшем температурном диапазоне. При этом наблюдается поступательное смещение всех кривых в область более высоких температур (см. кривые 3 и 4 на рис. 1). В случае DPPC все полученные кривые попадают в интервал 38—43° С, близкий к температуре основного фазового перехода гель — жидкий кристалл для этого фосфолипида (41,5° С). В то же время для смесей DMPC — ChNa лишь кривые, отвечающие малому содержанию детергента (2 и 3 на рис. 1б), находятся в области фазового перехода этого липида (23,5° С), тогда как остальные сильно смещены в сторону более высоких температур. Так, при максимальной концентрации холата натрия 10 мМ, при которой зависящий от температуры скачок в светорассеянии образца еще на-

A 450

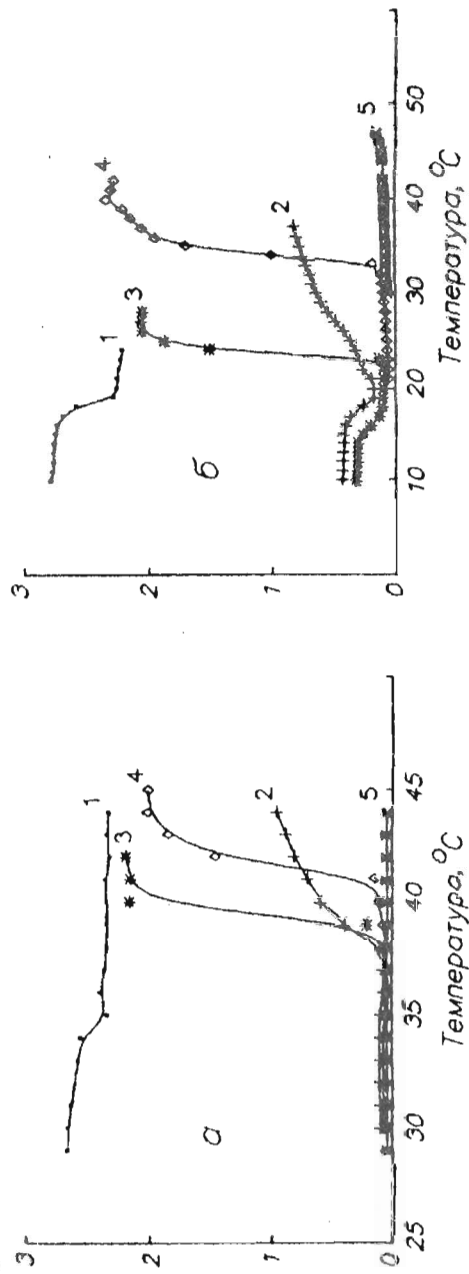


Рис. 1. Зависимость мутности смесей холода натрия с DPPC (а) и DMPC (б) от температуры. Скорость изменения температуры 0,33° С/мин. Концентрация DPPC и DMPC — 20 мМ. Концентрация холода натрия (мм): а — 7 (1), 9 (2), 10 (3), 11 (4), 12 (5); б — 4 (1), 5 (2), 6 (3), 9 (4), 11 (5)

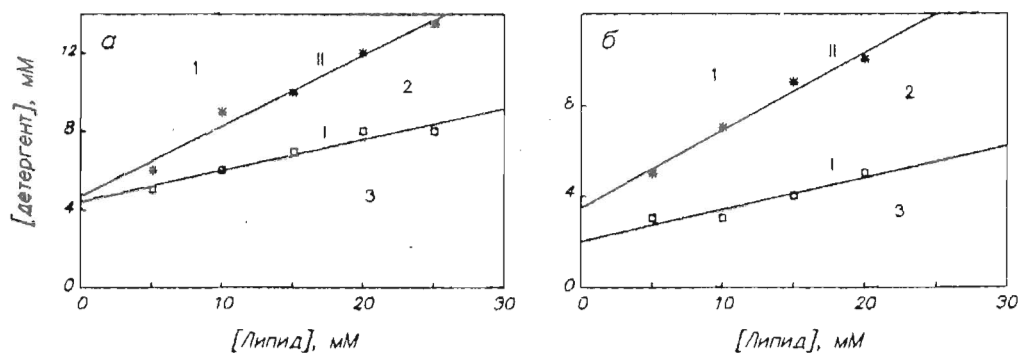


Рис. 2. Фазовые диаграммы для смесей холата натрия с DPPC (а) и DMPC (б). I и II — нижняя и верхняя границы систем 2, чувствительных к изменениям температуры. I и 3 — нечувствительные к изменениям температуры мицеллярные и ламеллярные системы соответственно

блюдается, кривая лежит в области $40-45^{\circ}\text{C}$, что почти на 20°C превышает температуру фазового перехода DMPC.

Аналогичные кривые получены и для других концентраций DMPC и DPPC в диапазоне $5-25$ мМ. По мере уменьшения концентрации фосфолипида происходит сужение интервала концентраций холата натрия, при которых изменяется светорассеяние липид-детергентных смесей. На фазовой диаграмме (рис. 2), построенной в координатах липид/детергент, системы, чувствительные к температуре, занимают область, ограниченную прямыми линиями I и II, которые, как показано ниже, отвечают фазовым границам между мицеллами и ламеллярными структурами при низкой и высокой температурах соответственно. В целом эта фазовая диаграмма сходна с типичными фазовыми диаграммами, описывающими трансформацию мицеллы — ламеллярные структуры в липид-детергентных смесях [2—4]. Данные, подтверждающие связь обнаруженного нами перехода именно с этой трансформацией, были получены с помощью лазерной корреляционной спектроскопии и электронной микроскопии.

По данным квазиупругого лазерного светорассеяния, образец, состоящий из смеси 20 мМ DPPC и 10 мМ холата натрия, при 20°C содержит частицы со средним размером около 10 нм, что существенно меньше минимального диаметра бислойных везикул ($20-25$ нм), образуемых этим фосфолипидом. После нагревания до 45°C тот же образец содержит две популяции частиц со средними размерами около 70 нм (85%) и 250 нм (15%), характерными для типично везикулярных структур. По данным электронной микроскопии, исследуемый образец при 20°C не содержит везикулярных структур (рис. 3а). В то же время на микрофотографиях образца, нагретого до 45°C , ясно видны такие структуры, образованные замкнутым липидным бислоем (рис. 3б), причем их размеры соответствуют данным, полученным при помощи лазерного светорассеяния.

Более сложная картина имеет место для образцов, содержащих DMPC. Предварительные результаты показали, что в этом случае в нагретых образцах кроме мономембранных везикул наблюдаются крупные структуры типа многослойных липосом, а также образования, напоминающие стопки бислойных дисков и сетчатые структуры, образованные длинными извивающимися нитями бимолекулярной толщины. Пока не ясно, действительно ли все эти структуры формируются в процессе термоиндуцируемой трансформации смешанных липид-детергентных мицелл или часть из них являются артефактами. Для ответа на эти вопросы потребуются дополнительные исследования, но уже сейчас очевидно, что необычное поведение смесей насыщенных фосфолипидов с холатом натрия связано с превращением малых мицеллярных агрегатов в более крупные частицы, имеющие преимущественно ламеллярную мембранную структуру.

Поскольку область индуцируемых температурой изменений оптической плот-

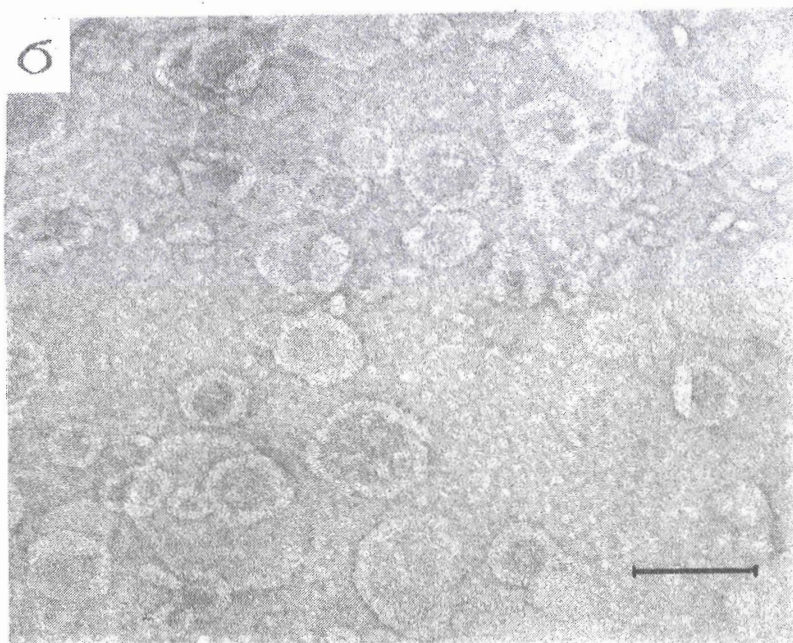


Рис. 3. Электронные микрофотографии для смеси 20 мМ DPPC и 10 мМ холата натрия, обработанной уранилацетатом при 20 (а) и 45° С (б). Масштаб 100 нм

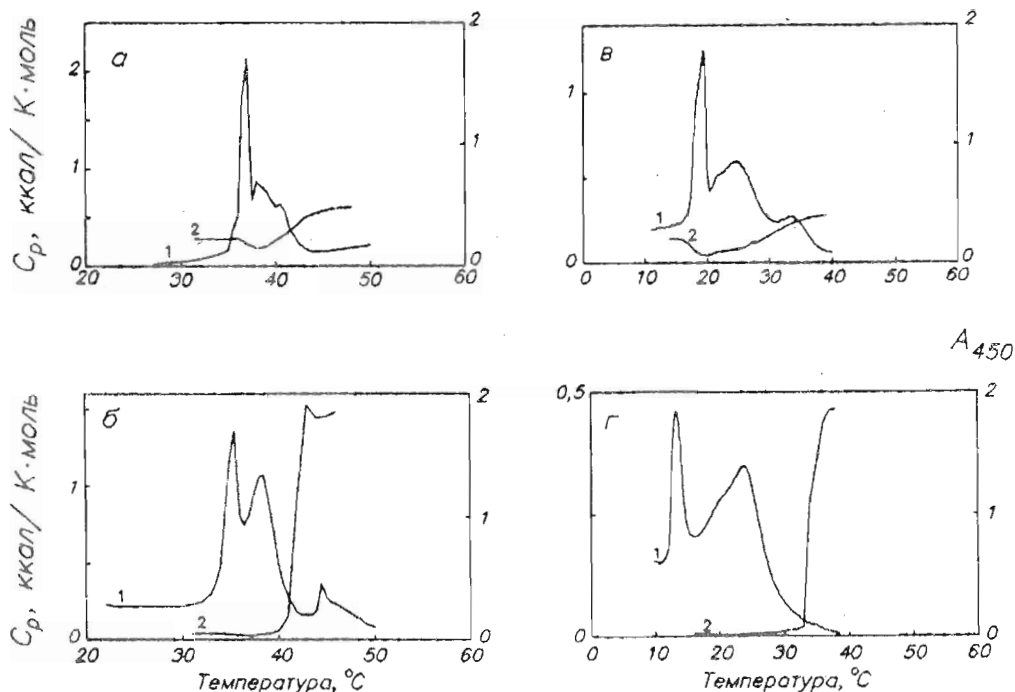


Рис. 4. Зависимость теплоспоглащения (1) и мутности (2) смесей DPPC—ChNa (а, б) и DMPC—ChNa (в, г) от температуры. Концентрация DPPC и DMPC — 10 мМ, концентрация холата натрия (мМ): а, г — 6; б — 8; в — 3

ности липид-детергентных смесей перекрывается с диапазоном основного фазового перехода гель — жидкий кристалл для изучаемых насыщенных фосфолипидов, представляло интерес выяснить, в какой мере плавление углеводородных цепей липидных молекул сопряжено с трансформацией липид-детергентных мицелл в ламеллярные структуры. С этой целью методом дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК) были изучены системы, дающие четко выраженный переход по оптической плотности при изменениях температуры.

Термограммы, отвечающие плавному и скачкообразному изменению мутности (рис. 4), показывают, что светорассеяние образцов нарастает лишь после того, как основной фазовый переход в значительной мере уже завершен. Это означает, что переход из гелевого состояния в жидкокристаллическое — необходимое, но не достаточное условие трансформации мицелл в ламеллярные структуры. Этот вывод дополнительно подтверждается тем, что в случае яичного фосфатидилхолина, находящегося в изучаемом диапазоне температур в жидкокристаллическом состоянии, его смеси с холатом натрия, претерпевающие ламеллярно-мицеллярный переход, как отмечалось выше, не дают аномальных изменений мутности при сканировании по температуре. С другой стороны, данные калориметрических измерений говорят о том, что сам процесс трансформации не сопровождается какими-либо значительными тепловыми эффектами. В то же время более сложный характер термограмм липид-детергентных смесей по сравнению с фазовым переходом самих фосфолипидов указывает на гетерогенность упаковки молекул в составе мицеллярных агрегатов, по-видимому обусловленную доменной организацией этих структур.

Таким образом, проведенные нами исследования показали, что в определенном диапазоне концентраций и температур в бинарных смесях насыщенных фосфатидилхолинов с холатом натрия происходит обратимая трансформация смешанных мицелл в ламеллярные структуры. Эта трансформация непосредственно связана

с фазовым переходом фосфолипидных молекул из гелевого состояния в жидкокристаллическое, хотя и не является прямым следствием этого перехода.

Следует отметить, что зависящая от температуры трансформация смешанных мицелл в везикулы была недавно описана для смесей октилглюкозида с яичным фосфатидилхолином [8]. Но в отличие от изученной нами трансформации это явление, по-видимому, иной природы, так как оно имеет место не при повышении, а при понижении температуры и никак не связано с изменением фазового состояния липидных молекул. Вероятно, основная движущая сила в этом случае — сильная зависимость критической концентрации мицеллообразования (ККМ) октилглюкозида от температуры [8], приводящая при небольшом изменении температуры к значительному сдвигу равновесного распределения молекул детергента между водной и липидной фазой.

В случае холата натрия, ККМ которого слабо зависит от температуры, такого изменения равновесия не происходит. Об этом свидетельствует анализ фазовых диаграмм, представленных на рис. 2. Коэффициент наклона на диаграммах такого типа интерпретируется как критическое соотношение детергент/липид в смешанных структурах, при котором начинается переход системы из мицеллярного состояния в ламеллярное, а точка пересечения фазовой границы с осью детергента отвечает концентрации свободного детергента в водной среде в момент этого перехода [2]. Тот факт, что фазовые границы I и II сходятся по направлению к оси детергента, говорит о том, что в процессе трансформации смешанных мицелл концентрация свободного детергента существенно не меняется. В случае DPPC она составляет около 4,5 мМ, а для DMPC лежит в пределах 2—3,5 мМ. В то же время значения критического соотношения детергент/липид для низко- и высокотемпературной фазовых границ различаются довольно значительно. Так, например, для DMPC соответствующие значения составляют 0,14 и 0,33, что отвечает изменению мольного соотношения детергент/липид в смешанных структурах от 1 : 7 до 1 : 3. Таким образом, при трансформации мицелл в ламеллярные структуры общее распределение детергента между водной и липидной фазой практически не меняется, но, по-видимому, происходит существенное изменение его сольбилизирующей способности по отношению к липидной фазе, претерпевающей переход из гелевого в жидкокристаллическое состояние.

Молекулярные механизмы, лежащие в основе мицеллярно-ламеллярного превращения липид-детергентных систем, пока еще неясны. Данные настоящей работы показывают, что процесс трансформации мицелл в организованные бислои сложнее, чем это представлялось ранее. По-видимому, он включает в себя широкий набор различных переходных состояний и промежуточных структур, формирующихся за счет предшествующей реорганизации исходных мицеллярных агрегатов. В этом отношении обнаруженное нами явление весьма интересно, так как дает уникальную возможность изучать эти структуры и их превращения на различных этапах трансформации за счет простого варьирования температуры, сохраняя неизменным соотношение компонентов в исходной смеси. Обычно для проведения такой трансформации приходится прибегать к более сильным воздействиям на изучаемую систему, сопряженным с удалением детергента с помощью диализа, гель-фильтрации или адсорбции на гидрофобных смолах, что приводит к значительному нарушению равновесия, искажению кинетики процесса и невозможности выделить его отдельные стадии для более детального изучения.

Представляет также интерес дальнейшее изучение этого явления с целью разработки нового подхода к реконструкции мембран. Так, проведенные нами предварительные эксперименты показали, что методом термотропной трансформации мицеллы — бислои могут быть получены протеолипосомы, содержащие функционально активный бактериородопсин. В настоящее время мы продолжаем эти исследования и детально изучаем поведение липид-детергентных систем в аномальной области методами ДСК, ЯМР и электронной микроскопии.

Экспериментальная часть

В работе использовали синтетический дипальмитоилфосфатидилхолин, синтетический димиристоилфосфатидилхолин и холат натрия фирмы Serva. Чистоту липидов контролировали методом ТСХ на пластинках фирмы Merck с закрепленным слоем силикагеля в системе хлороформ — метанол — вода (65 : 25 : 4, по объему).

Смеси фосфолипида с детергентом готовили диспергированием липидов, нанесенных в виде тонкой пленки на стенках круглодонной стеклянной колбы, в 10 мМ трис-буфере (рН 8,1), содержащем 1 мМ EDTA, 75 мМ NaCl, 0,02% NaN₃ и подходящее количество холата натрия. Для получения липидной пленки навеску липида растворяли в смеси хлороформ — метанол (2 : 1, по объему), удаляли растворитель на роторном испарителе при 45° С в течение 1 ч и высушивали остаток на масляном насосе в течение 2 ч при 10 Па и 20° С.

Непосредственно перед измерениями липид-детергентную смесь выдерживали 1 ч при 45° С, затем охлаждали до комнатной температуры и оставляли на 1 ч для уравнивания. Эти операции имеют целью приведение липид-детергентных систем к стандартному исходному состоянию. Образцы, подготовленные таким образом, дают хорошую воспроизводимость турбидиметрических измерений в режиме температурного сканирования.

Турбидиметрические измерения проводили на спектрофотометре Hitachi 220А (Япония) с термостатируемым кюветным отделением, оборудованным магнитной мешалкой, при длине волны 450 нм, нагревая образцы с постоянной скоростью 0,33° С/мин при непрерывном перемешивании.

Для электронной микроскопии препараты негативно контрастировали 2% водным раствором уранилацетата при 20 и 45° С в изотермическом режиме. Образцы исследовали в электронном микроскопе JEM-100 CX-2 (Jeol, Япония) при ускоряющем напряжении 80 кВ.

Гидродинамические размеры частиц измеряли методом лазерной корреляционной спектроскопии на приборе Coulter N4MD (Франция) при угле рассеяния 62,6° и времени накопления 200 с. Усреднение результатов проводили по трем отдельным измерениям.

Калориметрические исследования проводили на микрокалориметре ДАСМ-4А. Данные выводили на самописец, подвергали цифровому преобразованию при помощи графопостроителя с разрешением 250 точек на линию и затем компьютерной обработке. Непосредственно перед проведением измерений образцы инкубировали 1 ч при 45° С, затем помещали в камеру калориметра и первый прогрев осуществляли со скоростью 4° С/мин, а последующие сканирования проводили со скоростью 0,25° С/мин. Такой режим измерений обеспечивал полную воспроизводимость термограмм при нескольких последовательных сканированиях одного и того же образца.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Moller J. V., Maire M., Anderson J. P. // Progress in Protein-Lipid Interactions. V. 2/Eds Watts A., De Pout F. F. H. M. Elsevier Science Publishers BV (Biomedical Division), 1986. P. 147—196.
2. Mazer N. A., Benedek G. B., Carey M. C. // Biochemistry. 1980. V. 19. № 4. P. 601—615.
3. Schurtenberger P., Mazer N. A., Kanzig W. // J. Phys. Chem. 1985. V. 89. № 6. P. 1042—1049.
4. Schurtenberger P., Bertani R., Kanzig W. // J. Coll. Inter. Sci. 1986. V. 114. № 1. P. 82—87.
5. Almog S., Litman B. J., Wimley W., Colien J., Wachtel E. J., Barenholz Y., Ben-Shaul A., Lichtenberg D. // Biochemistry. 1990. V. 29. № 19. P. 4582—4592.
6. Walter A., Vinson P. K., Kaplan A., Talmon Y. // Biophys. J. 1991. V. 60. № 6. P. 1315—1325.
7. Inoue T., Miyakawa K., Shimozawa R. // Chem. Phys. Lip. 1986. V. 42. № 4. P. 261—270.
8. Miguel M. G., Eidelman O., Ollivon M., Walter A. // Biochemistry. 1989. V. 28. № 22. P. 8921—8928.

Поступила в редакцию
3.III.1993

A. I. Polozova*, G. E. Dubachev, T. N. Simonova,
L. I. Barsukov

ANOMALOUS THERMOTROPIC BEHAVIOUR OF BINARY MIXTURES
OF SATURATED PHOSPHATYDYLCHOLINES WITH SODIUM CHOLATE

M. M. Shemyakin and Y. A. Ovchinnikov *Institute of Bioorganic Chemistry,
Russian Academy of Sciences, Moscow;*

**Moscow Institute of Physics and Technology*

Binary mixtures of dipalmitoyl- and dimyristoylphosphatidylcholines with sodium cholate were studied by turbidity measurements, differential scanning calorimetry and electron microscopy. At definite detergent/lipid ratios, the mixtures display unusual thermotropic behaviour changing their aggregation state in a narrow temperature range. This behaviour was shown to be related to a reversible micellar-lamellar transformation. The structure and the morphology of the lamellar aggregates formed depend on the detergent/lipid ratio in mixed systems. The transformation is clearly connected with the phospholipid main phase transition although is not directly induced by the latter. The systems described give an opportunity to model various steps of the membrane reconstitution process solely by the temperature effect without changing actual detergent/lipid ratio in the incubation medium.