

ВЛИЯНИЕ СОЛЕЙ ЖЕЛЧНЫХ КИСЛОТ НА СТРУКТУРУ МОДЕЛЬНОЙ КЛЕТОЧНОЙ МЕМБРАНЫ

Захарченко Н.Л., Идиятуллин Б.З., Зуев Ю.Ф.

ФГБУН Казанский институт биохимии и биофизики КазНЦ РАН

ул. Лобачевского, д. 2/31, г. Казань, 420111, РФ

e-mail: natasha@kibb.knc.ru

Аннотация. Соли желчных кислот (СЖК) являются природными амфифильными веществами, которые играют важную роль в транспорте и адсорбции липидов, являются солюбилизаторами холестерина, обеспечивают вывод лекарств и токсичных веществ из организма. Исследование взаимодействия СЖК с обратной микроэмульсией на основе Аэрозоля ОТ (АОТ) открывает возможности для понимания их функционирования на границе раздела фаз, вблизи клеточной мембраны, на примере простой модельной системы. Получены температурные зависимости электропроводности обратной микроэмульсии АОТ в декане в области электрического перколяционного перехода в присутствии ряда СЖК, различающихся количеством и положением гидроксильных групп относительно стеранового остова молекулы. Проведено сравнение количественных параметров, применяемых для описания электрической перколяции, а также энергии активации перехода. Обнаружено, что встраивание молекул всех исследованных СЖК в поверхностный слой мицелл АОТ в большей или меньшей степени способствует перколяционному переходу в системе. Методом ЯМР спектроскопии показано, что добавление СЖК в микроэмульсию влияет на коэффициенты самодиффузии компонент и на размеры мицелл.

Ключевые слова: соли желчных кислот, перколяция, поверхностный слой, диффузия в мицелле.

BILE SALTS INFLUENCE ON THE STRUCTURE OF MODEL CELL MEMBRANE

Zakharchenko N.L., Idiyatullin B.Z., Zuev Y.F.

Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics KSC RAS

Lobachevskogo str., 2/31, Kazan, 420111, Russia

e-mail: natasha@kibb.knc.ru

Abstract. Bile salts are the natural amphiphilic detergents that participate in numerous processes such as intestinal hydrolysis, dispersion, and digestion of lipids, cholesterol solubilization, and drug absorption. Investigation of the interaction of bile salts with a reverse microemulsion based on Aerosol OT (AOT) opens up opportunities for understanding their functioning at the interface, near the cell membrane, with using of the simple model system. The conductivity of water/AOT/decane microemulsions at the temperature induced percolation conditions are obtained in the presence of some bile salts, which differs by the number and position of the hydroxyl groups for sterane backbone of the molecule. The quantitative parameters used to describe electric percolation are compared, as well as the activation energy of the transition. It was found that the incorporation of molecules of the investigated bile salts into the interface of AOT micelles favors more or less to the percolation transition in the system. NMR spectroscopy showed that the addition of bile salts into the microemulsion influences the self-diffusion coefficients of the components and the dimensions of the micelles.

Key words: bile salts, electric percolation, surfactant layer, diffusion in micelle.

Обратные мицеллы поверхностно-активных веществ (ПАВ), благодаря их уникальным свойствам, широко используют как модельные системы, позволяющие изучать процессы, происходящие на границе раздела фаз, например, вблизи клеточной мембраны [1]. Одними из наиболее исследуемых являются микроэмульсии на основе анионного ПАВ натриевой соли сульфоянтарной кислоты (АОТ) из-за простоты приготовления и возможности варьирования в широких пределах размеров и солюбилизационной емкости получаемых мицелл. Добавление в обратные микроэмульсии солей желчных кислот (СЖК) может оказывать значительное влияние на структуру и физико-химические свойства мицелл [2]. Будучи природными амфифильными веществами, СЖК обладают мицеллообразующими свойствами. Мицеллы СЖК играют важную роль в транспорте и адсорбции липидов, являются солюбилизаторами холестерина, обеспечивают вывод лекарств и токсичных веществ из организма [3]. Исследование влияния СЖК на свойства обратной микроэмульсии АОТ позволит с помощью модельной системы приблизиться к пониманию взаимодействия веществ, обладающих амфифильными свойствами, с липидной мембраной клетки.

Методы исследования. Исследовали обратную микроэмульсию, содержащую 0.3 М АОТ. Молярное соотношение воды к ПАВ составляло $W=[H_2O]/[AOT]=25$. В качестве дисперсной фазы использовался декан.

В работе использовали следующие СЖК: дезоксихолат натрия (NaDC), хенодезоксихолат натрия (NaCDC), гидрат холата натрия (NaCH), тауролитохолат натрия (NaTLC). Все СЖК имеют сходное строение, различающееся количеством и положением гидроксильных групп относительно стеранового остова молекулы. При растворении СЖК в микроэмульсии АОТ раствор нагревался до 40-50⁰С и многократно перемешивался. Диоктилсульфосукцинат натрия (АОТ), NaDC, NaCDC, NaCH, NaTLC (все Sigma) и декан использовались без дополнительной очистки.

Измерения электропроводности производили на кондуктомере Cond 7310 (Xylem). Температура измерений варьировалась от 10 до 55 °С. Спектры ЯМР получали на ядрах ¹H на спектрометре AVANCE III фирмы Bruker с частотой резонанса протонов 600 МГц.

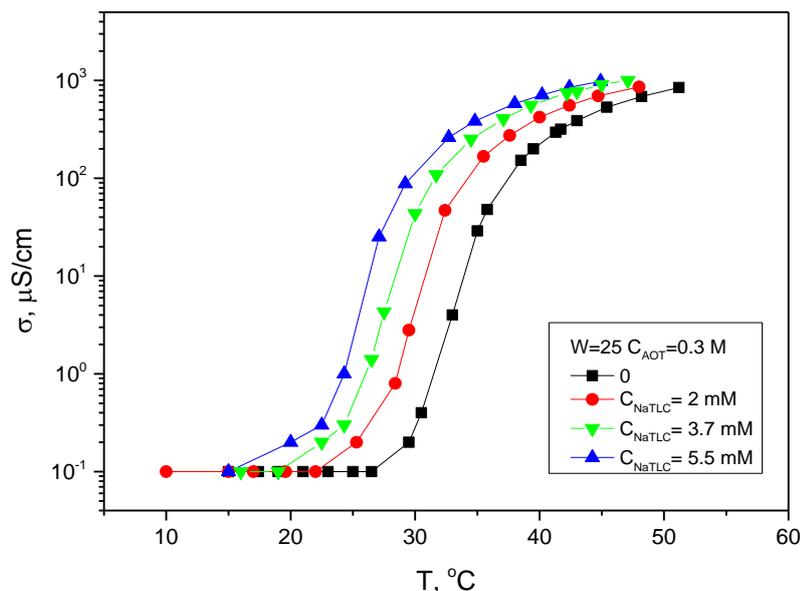


Рисунок 1 – Зависимость удельной электропроводности микроэмульсии на основе АОТ ($W = 25$, $C_{\text{АОТ}} = 0.3 \text{ M}$) от температуры с добавлением разных концентраций NaTLC . Для остальных СЖК зависимости аналогичны

Результаты и обсуждение. Обратные микроэмульсии представляют собой водные микрокапли, окруженные монослоем ПАВ, диспергированные в неполярном растворителе. Одной из особенностей обратных микроэмульсий является электрическая перколяция, которая заключается в резком увеличении на несколько порядков электропроводности системы при достижении пороговых значений температуры или объемной доли дисперсной фазы. Электропроводность растет в результате образования динамических кластеров из микрокапель, внутри которых происходит обмен содержимым, в том числе заряженными частицами [4]. Температурные зависимости удельной электропроводности, полученные для микроэмульсий с СЖК, демонстрируют более низкие температуры порога перколяции по сравнению с контролем. С ростом концентрации СЖК температурный сдвиг увеличивается (см. рис. 1).

Температурная перколяция описывается скейлинговым выражением [5]

$$\sigma = P(T - T_p)^n \quad (1)$$

где T – температура, соответствующая значению электропроводности σ . T_p – температура порога перколяции, которую определяли как максимум зависимости производной ($\delta \ln \sigma / \delta T$) от T , P и n – константы. Значения этих констант определяли графически из логарифмической формы выражения (1).

$$\ln \sigma = \ln P + n \ln(T - T_p) \quad (2)$$

Энергии активации электрической перколяции получали из зависимости Аррениуса:

$$\sigma = A e^{-E_p/RT} \quad (3)$$

В таблице 1 собраны полученные значения констант, температуры порога перколяции и энергии активации перехода.

Таблица 1 – Сравнение температур перколяционного перехода, энергий активации и параметров скейлинга для микроэмульсии вода/АОТ/декан с добавлением различных концентраций СЖК

СЖК	$C_{\text{СЖК}}$, мМ	T_p , °C	E_p , кДж/М	$\ln P$	n
-	-	33	696	2.28 ± 0.05	1.59 ± 0.02
NaDC	3	27	672	0.59 ± 0.08	2.27 ± 0.04
	5	22.8	796	1.03 ± 0.12	2.18 ± 0.08
	10	16.8	766	3.05 ± 0.05	1.34 ± 0.02
NaCH	3	24.5	751	2.16 ± 0.05	1.7 ± 0.02
NaTaLC	2	28.4	772	0.83 ± 0.03	2.17 ± 0.02
	3.7	26.5	732	1.44 ± 0.06	1.93 ± 0.03
	5.5	24.3	730	1.5 ± 0.17	1.83 ± 0.07
NaChenD C	2.5	28	818	1.25 ± 0.06	1.98 ± 0.03
	5.3	22.5	802	1.61 ± 0.07	1.89 ± 0.04

Сравнивая полученные параметры, можно отметить однонаправленный сдвиг температур порога перколяции с добавлением СЖК. Из рисунка 2 видно, что значения T_p для всех СЖК с точностью до ошибки эксперимента ложатся на одну прямую, что позволяет сделать вывод о сходном воздействии СЖК на процесс слияния и распада микрокапель в перколирующей микроэмульсии. О том же свидетельствуют и близкие значения энергий активации для всего ряда СЖК. По всей видимости, вследствие своей амфифильности, молекулы СЖК встраиваются в поверхностный слой АОТ, изменяя его локальные свойства, и нарушая плотную упаковку молекул.

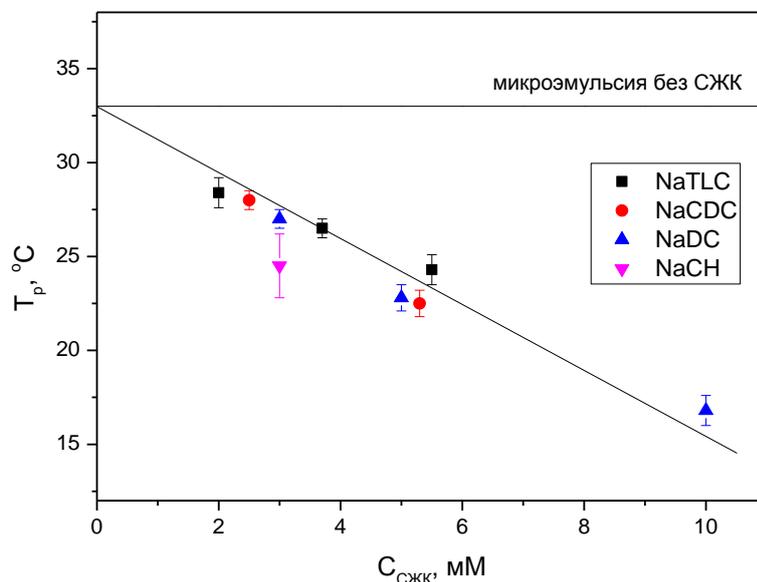


Рисунок 2 – Температуры перколяционного перехода для всего ряда используемых СЖК

Значения констант $\ln P$ меняются разнонаправленно, но их значения для микроэмульсий с добавками в основном ниже, чем для контрольной микроэмульсии. Параметр n выше, чем для контроля, и варьируется вокруг значения 1.9, характерного для статической перколяции [5]. Из общей картины несколько выбиваются значения для 10 мМ NaDC. Возможно, это связано с тем, что при повышении концентрации СЖК становится значащим вклад от ионов натрия в составе NaDC, увеличивающий общую электропроводность системы.

Методом ЯМР была исследована микроэмульсия с 5 мМ дезоксихолата натрия. В полученном спектре ЯМР не удалось в явном виде выделить сигнал от NaDC. Однако, были обнаружены характерные отличия в зависимостях

коэффициентов самодиффузии (КСД) компонент микроэмульсии от температуры в присутствии NaDC по сравнению с контролем (см. рис. 3).

Зависимость коэффициента диффузии декана как в микроэмульсии с СЖК, так и без, представляет собой аррениусовскую кривую с энергией активации 6 кДж/М. КСД воды и АОТ в области низких температур близки, так как в случае воды мы наблюдаем диффузию капли как целого, а не движение воды внутри капли. С повышением температуры наблюдается более быстрый рост КСД воды, чем КСД АОТ, так как в средневзвешенный коэффициент диффузии воды дает вклад движение воды между микрокаплями в процессе кластерообразования [6]. С повышением температуры микрокапли образуют все более протяженные кластеры, внутри которых вода движется практически свободно, а КСД воды внутри кластеров стремится к КСД свободной воды. При добавлении в микроэмульсию NaDC наблюдается сдвиг зависимости КСД воды в область низких температур, что согласуется с данными по электропроводности и означает, что процесс образования кластеров микрокапель начинается при более низких температурах.

При рассмотрении зависимости для АОТ наблюдается снижение КСД при низкой температуре, связанное с тем, что при образовании первых кластеров вязкость системы увеличивается и диффузия замедляется. Затем с увеличением количества и размеров кластеров микрокапель наблюдается рост КСД АОТ, так как определяющим становится вклад от диффузии молекул ПАВ по поверхности кластеров. Важно отметить, что для микроэмульсии с СЖК, в области низких температур, где мы наблюдаем диффузию отдельных микрокапель, КСД АОТ ниже, чем в контрольной микроэмульсии. Объяснить это можно тем, что встраиваясь в поверхностный слой мицеллы, молекулы СЖК, тем самым, увеличивают ее радиус, что, согласно выражению Стокса-Энштейна (4), приводит к снижению КСД.

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta R} \quad (4)$$

Здесь D- коэффициент самодиффузии, R- радиус частицы. Также как и для воды, для АОТ наблюдается сдвиг зависимости микроэмульсии с СЖК, в сторону низких температур.

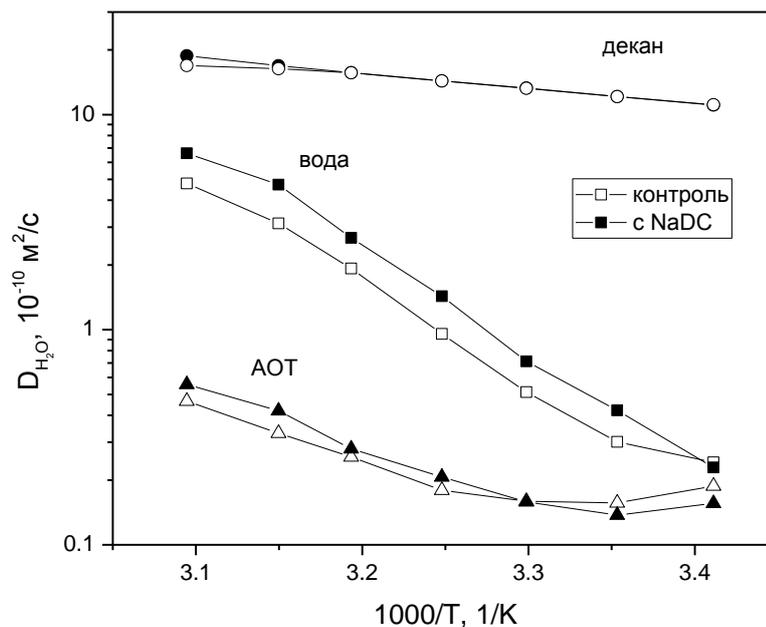


Рисунок 3 – КСД отдельных компонент микроэмульсии вода-АОТ-декан $W = 25$ $C_{AOT} = 0.3$ М в зависимости от температуры

Таким образом, при добавлении СЖК в обратную микроэмульсию АОТ молекулы соли встраиваются в поверхностный слой мицелл, изменяют его структуру и увеличивают размер мицелл. В свою очередь это облегчает слияние микрокапель и способствует образованию динамических кластеров микрокапель, ускоряя электрическую перколяцию системы. Все исследованные СЖК оказывали однонаправленное влияние на свойства микроэмульсии, в независимости от положения и количества гидроксильных групп в структуре СЖК.

Работа выполнена при поддержке РФФИ, гранты № 15-29-01239 офи_м и № 15-44-02230-рег.

Список литературы / References:

1. Menger F.M., Yamada K. Enzyme catalysis in water pools. *J. Am. Chem. Soc.*, 1979, vol. 101, pp .6731-6734.
2. Lee S.S., Rideau A.M., McGown L.B. Toward building a better microreactor: increasing microenvironmental diversity in AOT reversed micelles using a bile salt cosurfactant. *J. Phys. Chem.*, 1996, vol. 100, pp. 5880-5887.

3. Zhao Y. Facial amphiphiles in molecular recognition: From unusual aggregates to solvophobic driven foldamers. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.*, 2007, vol. 12, pp. 92-97.
4. Feldman Y., Kozlovich N., Garti N., Archipov V., Idiyatullin Z., Zuev Y., Fedotov V. Mechanism of transport of charge carriers in the sodium bis(2-ethylhexyl) sulfosuccinate-water-decane microemulsion near the percolation temperature threshold. *J. Phys. Chem.*, 1996, vol. 100, pp. 3745-3748.
5. Moulik S.P., De G.C., Bhowmik B.B., Panda A.K. Physicochemical studies on microemulsions. 6. Phase behavior, dynamics of percolation, and energetics of droplet clustering in water/AOT/ n-heptane system influenced by additives (sodium cholate and sodium salicylate). *J. Phys. Chem.*, 1999, vol. 103, pp. 7122-7129.
6. Архипов В.П., Идиятуллин З.Ш., Архипов Р.В., Захарченко Н.Л., Зуев Ю.Ф., Федотов В.Д. Диффузия воды в микроэмульсии вода-АэрозольОТ-декан. *Коллоид. журнал*, 2000, т. 62, с. 456-463. [Archipov V.P., Idiyatullin Z.Sh., Archipov R.V., Zakharchenko N.L., Zuev Y.F., Fedotov V.D. Diffusion of water in the water-AOT-decane microemulsion. *Colloid journal*, 2000, vol. 62, pp. 456-463 (In Russ.)]

РАЗРАБОТКА ПОДХОДА К КОЛИЧЕСТВЕННОЙ ОЦЕНКЕ ХИРАЛЬНОЙ АСИММЕТРИИ В ИЕРАРХИЯХ БЕЛКОВЫХ СТРУКТУР

Котов А.Р., Сидорова А.Э., Твердислов В.А., Устинин М.Н.

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Физический факультет

ул. Ленинские Горы, 1, стр. 2, г. Москва, 119234, РФ

Институт прикладной математики им. М.В.Келдыша РАН

Миусская площадь, 4, г. Москва, 125047, РФ

e-mail: kotov_alexey@inbox.ru

Аннотация. Предпосылками для представленного исследования явились работы, в которых была выявлена системная закономерность смены знака хиральности при переходе на более высокий уровень структурно-функциональной организации в белках и нуклеиновых кислотах (В.А. Твердислов и соавт., 2012, 2017). Предложен новый подход к оценке знака хиральности (спиральности и суперспиральности) в структурной иерархии белков. Для определения знака и величины хиральности вторичной и третичной структуры белков проведен анализ взаимного расположения α -углеродов. Угол между вектором направления спирали и вектором суммы векторных произведений позволяет однозначно идентифицировать направление вращения спирали в молекуле. Предложен способ построения «карт хиральности», наглядно демонстрирующий области, соответствующие узкому диапазону возможного угла для двух типов вторичной спиральной структуры.

Ключевые слова: белки, хиральность, энантиомеры, альфа-углерод, правая альфа-спираль, левая полипролиновая спираль, векторное произведение, вектор направления, карта хиральности.

DEVELOPMENT OF THE APPROACH TO QUANTITATIVE ASSESSMENT OF CHIRAL ASYMMETRY IN HIERARCHIES OF PROTEIN STRUCTURES

Kotov A.R., Sidorova A.E., Tverdislov V.A., Ustinin M.N.

Lomonosov Moscow State University, Faculty of Physics

Leninskie Gory St., 1, bld. 2, Moscow, 119991, Russia

Keldysh Institute of Applied Mathematics RAS

Miusskaya sq., 4, Moscow, 125047, Russia

e-mail: kotov_alexey@inbox.ru

Abstract. The prerequisites for the presented research were the works in which the system regularity of the chirality sign change in the transition to a higher level of structural and functional organization in proteins and nucleic acids (V.A. Tverdislov et al., 2012, 2017) was revealed. A new approach to the evaluation of the sign of chirality (helicity and supercoiling) in the structural hierarchy of proteins is proposed. An analysis of the mutual arrangement of α -carbon atoms was carried out to determine the sign and magnitude of the chirality of the secondary and tertiary structure of proteins. The angle between the vector of the direction of the helix and the vector of the sum of vector products makes it possible to uniquely identify the direction of rotation of the helix in the molecule. A method for constructing "chirality maps" which clearly demonstrates the areas corresponding to a narrow range of the possible angle for the two types of secondary spiral structure is proposed.

Key words: proteins, chirality, enantiomers, alpha-carbon atom, right-handed alpha helix, left-handed polyproline helix, cross product, direction vector, chirality map.

Введение. Предпосылками для написания данной статьи явились работы В.А. Твердислова и его коллег [1-3], в которых была выявлена закономерность смены знака хиральности (спиральности и суперспиральности) при переходе на более высокий уровень структурно-функциональной организации в белках и нуклеиновых кислотах. Несмотря на убедительность качественных наблюдений в данной теории, принципиально необходимо получить количественные оценки доли и знака хиральности структур разных уровней. Эту проблему можно иначе сформулировать следующим образом: требуется выработать общий подход к количественной оценке смены симметрий (спиральных, суперспиральных) на всех уровнях организации макромолекул. На сегодняшний день