

УДК 577.352.2

ИССЛЕДОВАНИЕ САМОДИФФУЗИИ ЛИПИДОВ В БИСЛОЯХ ПРИ ИХ ВЗАИМОДЕЙСТВИИ С ЗАРЯЖЕННЫМ ПОЛИПЕПТИДОМ

И.Ю. Десятникова, Б.В. Мунавиров, А.В. Филиппов

Аннотация

Методом ядерного магнитного резонанса с импульсным градиентом магнитного поля изучена латеральная диффузия в ориентированных мультибислоях цвиттерионного (диолеоилфосфатидилхолин) и заряженного (диолеоилфосфатидилглицерин) липидов в присутствии заряженного полипептида полилизина с $M = 25.2$ кДа. Полилизин не изменяет ламеллярной структуры исследуемых систем, вместе с тем, в его присутствии происходит изменение формы диффузионного затухания (ДЗ) стимулированного спинового эха, свидетельствующее о появлении набора коэффициентов латеральной диффузии (КЛД) липидов. Анализ формы ЯМР-спектра, интенсивности сигнала, зависимости формы ДЗ от времени диффузии показывает, что наиболее вероятной причиной появления набора КЛД является образование доменов бислоев при адсорбции полилизина, при этом адсорбированный полипептид, по-видимому, также образует агрегаты вблизи поверхности мембраны. Таким образом, впервые по данным изменения трансляционной подвижности молекул липидов обнаружено образование латеральных доменов в результате взаимодействия периферического полипептида с биомембраной. Основной вклад в образование доменов вносят электростатические взаимодействия полипептида и липидов. Определены параметры самодиффузии липидов в доменах и окружающей их мембране в интервале температур 293–333 К.

Ключевые слова: модельные биомембраны, ЯМР, диффузия липидов, формирование липидных доменов, липид-полимерные взаимодействия.

Введение

В последние годы наблюдается большой интерес к липидным композициям, модифицированным био- и синтетическими полимерами [1–11]. Объясняется это тем, что указанные системы являются перспективными моделями, отражающими суть явлений, происходящих в биологических мембранах, а именно: липид-протеиновые взаимодействия и взаимодействия биомембран с молекулами лекарств. В частности, в случае наличия нескомпенсированного заряда у молекул липидов (около 10% всех липидов биомембраны) или полимеров (большинство природных полипептидов), важную роль играют взаимодействия электростатического характера. Актуальность исследований обусловливается также практическим интересом к липидным композициям, содержащим заряженные макромолекулы, как к перспективным системам доставки лекарств.

Наиболее удобным модельным объектом для исследования электростатического взаимодействия периферических протеинов с липидными бислоями является полипептид полилизин (ПЛ). Это обусловлено тем, что его мономер лизин

обладает сильным положительным зарядом [1, 2]. Кроме того, ПЛ является хорошей моделью цитолитических и антибактериальных пептидов, поскольку он способен принимать все характерные для полипептидов конформации (α -спираль, β -складки, случайный клубок) [1–5]. Известно, что функции протеинов и их характер взаимодействия с молекулами липидов зависят от их вторичной структуры, которая, в свою очередь, зависит от внешних условий, таких, как температура, pH, концентрация ионов [1, 2]. Известно также, что взаимодействие полилизина с липидами может оказывать влияние на свойства самой мембраны [6–8]. Однако, несмотря на интенсивные исследования подобных систем, до сих пор остается неясным, каким образом полилизин взаимодействует с липидными бислоями: носит ли это взаимодействие гидрофобный характер или полилизин, возможно, частично проникает в гидрофобную область бислоев [7, 9, 10]. При этом взаимодействие полилизина с бислоями сильно зависит от природы полярных «голов» липидов и длины цепи самого полилизина [11]. Показано, что полилизин влияет на изменение фазового состояния, кривизну мембраны, может приводить к изменению адгезии, разрывам и разрушению бислоев, изменению проницаемости мембраны [4, 9, 11, 12].

Большой интерес вызывает возможность формирования латеральных доменов в бислоях, состоящих из смеси нескольких типов липидов, при адсорбции полилизина на поверхности мембраны [4]. Латеральные липидные домены представляют собой ограниченные области липидного бислоя, отличающиеся по физико-химическим характеристикам от остальной части бислоя. В частности, латеральные домены могут отличаться по составу, толщине гидрофобной части бислоя, плотности и степени упорядоченности упаковки молекул липидов в бислое в области доменов [13].

В предшествующих исследованиях для изучения липидных доменов применялся широкий спектр различных методов, таких, как ^2H ЯМР- [14], ИК- [4], Рамановская спектроскопия [15], флуоресценция [16], ЭПР [6]. Несмотря на то что некоторые методы (ЭПР, ЯМР, флуоресценция) восприимчивы к наличию латеральных доменов в жидкокристаллической структуре липидных бислоев, механизмы образования и сама природа липидных доменов остаются мало изученными.

Особое место среди перечисленных методов занимает ЯМР-диффузометрия [17]. Данный метод позволяет получить информацию о трансляционной динамике молекул исследуемой системы. Наличие набора коэффициентов самодиффузии может свидетельствовать о фазовом разделении [18]. В данной работе изучалась особенность латеральной диффузии липидов и возможность образования латеральных доменов в однокомпонентных (цвиттерионный липид-ДОФХ, заряженный липид-ДОФГ) мембранах в присутствии полипептида (полилизина).

1. Материалы и методы

Использовались диолеилфосфатидилхолин (ДОФХ) и диолеилфосфатидилглицерин (ДОФГ), приобретенные в Avanti Polar Lipids (Birmingham, AL). Полилизин (ПЛ) с молекулярной массой $M = 25.2$ кДа был приобретен в Sigma, St. Louis, MO. Структурные формулы молекул используемых веществ представлены на рис. 1.

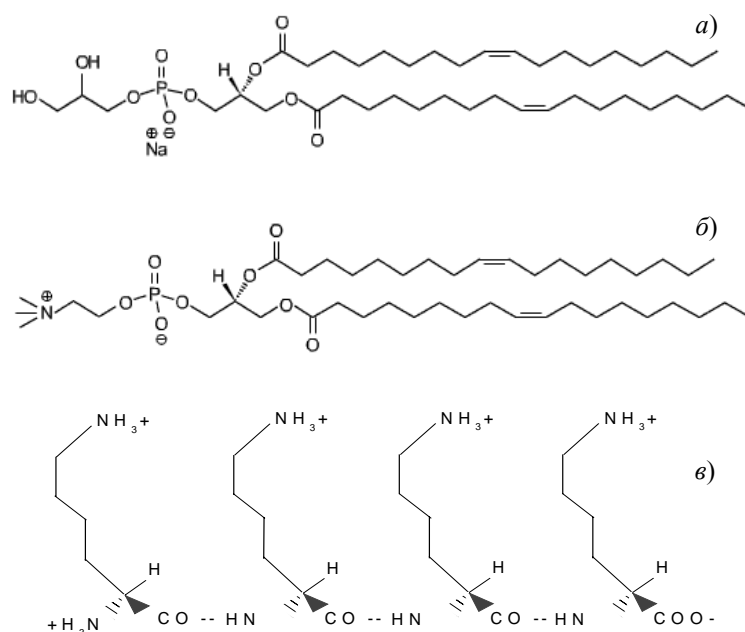


Рис. 1. Структура ДОФГ (а), ДОФХ (б), полилизина (в)

В качестве образцов для исследования использовались макроскопически ориентированные на стеклянных пластинках мультибислои липидов. Образцы готовились следующим образом. Липиды растворяли в смеси метанола и пропанола (1 : 4) в соотношении 10 мг липида на 700 мл растворителя и помещали в колбу. Растворитель удаляли в потоке газа азота, а затем образец вакууммировали. Далее в колбу добавлялся водный раствор полилизина необходимой концентрации. При этом использовалась дейтерированная вода, чтобы сигнал от протонов воды в системе был минимальным. Сначала полученная суспензия везикул перемешивалась механически с помощью шейкера, затем она обрабатывалась ультразвуком в течение 3–5 мин для более тонкого диспергирования. Полученная суспензия наносилась по 37 мкл на каждую из 50 стеклянных пластинок (5 × 14 мм). После высушивания пластинок на воздухе при температуре около 50 °С все пластинки были собраны в стопку и помещены в пробирку с влажной атмосферой (D₂O) на 3–5 суток для насыщения водой и формирования ориентированных мультибислоев. Эксперимент проводился на образцах с содержанием воды 45% по массе. Степень гидратации образца контролировалась взвешиванием. Детальное описание процедуры приготовления и контроля качества ориентации ориентированных мультибислоев липидов приводится в литературе [17].

Исследования проводились методом ЯМР с импульсным градиентом магнитного поля (ЯМР ИГМП) [19], который позволяет получать информацию о самодиффузии молекул в жидкофазных системах [17]. Использовалась трехимпульсная последовательность стимулированного эха, 90°–τ–90°–τ₁–90°–τ–эха. Диффузионное затухание стимулированного спинового эха (ДЗ) в случае однокомпонентной неассоциированной жидкости представляет собой зависимость

амплитуды эхо (A) от параметров последовательности (δ , g , t_d) и коэффициента самодиффузии молекул (D , КСД):

$$A(2\tau, \tau_1, g) = \frac{A(0)}{2} \exp\left(-\frac{2\tau}{T_2} - \frac{\tau_1}{T_1}\right) \exp(-\gamma^2 \delta^2 g^2 D t_d), \quad (1)$$

где T_1 и T_2 – времена спин-спиновой и спин-решеточной релаксации соответственно, γ – гиромагнитное отношение, g – амплитуда градиентного импульса, δ – длительность импульса градиента, t_d – время диффузии. Время диффузии при проведении эксперимента варьировали в интервале 7–250 мс.

Эксперименты выполняли на ЯМР-диффузомере, работающем на частоте 64 МГц для ^1H , оснащенный блоком импульсного градиента магнитного поля. Амплитуда импульса градиента $g_{\max} = 30$ Тл/м. С помощью ЯМР-датчика со встроенным гониометром производили ориентирование образца относительно направления вектора напряженности магнитного поля. Часть эксперимента выполняли в Университете Умео (Швеция) на ЯМР-спектрометре CMX Varian/Chemagnetic с частотой 100 МГц на протонах, с $g_{\max} = 1.15$ Тл/м.

Поскольку исследовалась латеральная диффузия липидов в жидкокристаллических ориентированных бислоях, сигнал ^1H ЯМР от липидов зависит от ориентации нормали к липидному бислою относительно направления постоянного магнитного поля [20–22]. При ориентации под «магическим углом» (54.7°) быстрое вращение молекулы липида вокруг своей оси приводит к частичному усреднению диполь-дипольных взаимодействий протонов [23], при этом эхо-сигнал возрастает в сотни раз и удается получить уширенный спектр ^1H ЯМР от липидов. Коэффициент латеральной диффузии липидов (КЛД) и измеряемый под «магическим углом» КСД липидов связаны следующим образом: $D_L = 1.5 \cdot D$ [17].

Биологическая мембрана реализует свои функции в ламеллярной жидкокристаллической фазе, поэтому при исследовании взаимодействия молекул полипептида и липида в мембране одним из важных вопросов является: не изменяет ли присутствие полипептида фазовое состояние мембраны. Изменение фазового состояния в липидной системе влияет на подвижность липидов, в частности на их самодиффузию [21]. Признанным методом, с помощью которого можно получить информацию о фазовом состоянии липидной системы, является ^{31}P -ЯМР спектроскопия, так как форма ^{31}P ЯМР-спектра зависит от геометрии фазы [21]. Для получения ^{31}P ЯМР-спектров был использован многофункциональный импульсный ЯМР-спектрометр с Фурье-преобразованием «Unity-300» («Varian Associates Inc.»), рабочая частота 121.4 МГц на ядрах ^{31}P , при записи одномерных спектров применялись 90° -импульсы, задержки между сканами 1–2 с. Отсчет химических сдвигов в спектрах ЯМР ^1H проводился от реперного соединения (ортофосфорной кислоты).

3. Результаты и обсуждение

3.1. Однокомпонентные бислои ДОФХ и ДОФГ. Диффузионные затухания эхо-сигнала ЯМР для липидов в однокомпонентных бислоях ДОФХ и ДОФГ были получены в интервале температур 20–60 °С. В координатах $\ln A - \gamma^2 \delta^2 g^2 t_d$ они имели линейный вид. Следовательно, каждое ДЗ может быть описано

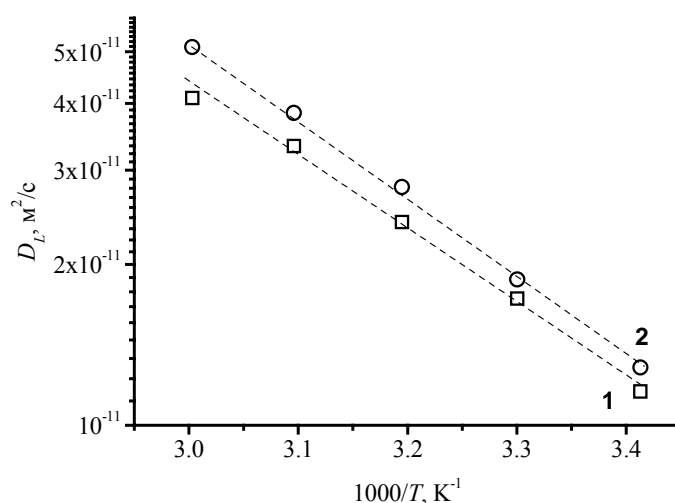


Рис. 2. Температурные зависимости коэффициентов латеральной диффузии ДОФХ (1) и ДОФГ (2). Пунктирные линии – аппроксимации экспериментальных зависимостей с помощью уравнения типа Аррениуса (2) с кажущимися энергиями активации для латеральной диффузии 26.4 и 28.8 кДж/(моль·К) для ДОФХ и ДОФГ соответственно

уравнением (1) с единственным КСД, который определяется из наклона соответствующего диффузионного затухания. Коэффициенты латеральной диффузии ДОФХ совпадали с литературными значениями [20].

Для бислоев ДОФГ коэффициенты латеральной диффузии при тех же условиях были в 1.15–1.3 раза больше, чем для ДОФХ. Наиболее вероятная причина этого заключается в электростатическом отталкивании заряженных голов молекул этого липида. В самом деле, холиновая группа ДОФХ представляет собой электрический диполь, но в целом электрически нейтральна, а глицериновая группа ДОФГ диссоциирует в водной среде с высвобождением иона натрия, при этом сама приобретает отрицательный заряд [24]. Взаимное отталкивание одноименно заряженных молекул ДОФГ должно увеличивать площадь поверхности бислоя, приходящуюся на одну молекулу липида. Согласно теории свободного объема [25], коэффициент латеральной диффузии липидов увеличивается пропорционально свободной поверхности, приходящейся на молекулу липида в бислое. Это предположение подтверждается данными из литературы: площадь поверхности, приходящейся на одну молекулу ДОФХ в бислое около 65 \AA^2 [26], а для ДОФГ – $70\text{--}80 \text{ \AA}^2$ [27].

Температурные зависимости D_L для бислоев ДОФХ и ДОФГ представлены на рис. 2. Из рисунка видно, что при повышении температуры D_L увеличивается. Для анализа температурных зависимостей коэффициента самодиффузии часто используют [20, 28] соотношения типа Аррениуса:

$$D = D_0 \exp\left(-\frac{E_D}{RT}\right), \quad (2)$$

где D_0 – постоянная, независящая от температуры, E_D – кажущаяся энергия активации самодиффузии, R – универсальная газовая постоянная. Оценки показывают,

что E_D для ДОФХ и ДОФГ принимают значения 26.4 и 28.8 кДж/(моль·К), соответственно. Значение E_D для ДОФХ близко к ранее полученным в работах [20, 29].

3.2. Бислои ДОФГ с полилизинном: образование латеральных доменов липидов. Прежде чем перейти к анализу влияния полилизина на диффузию липидов в бислоях, необходимо определить, не приводит ли присутствие полилизина к появлению неламеллярных фаз липидов [21]. С этой целью были произведены измерения и получены ^{31}P ЯМР-спектры ориентированных под магическим углом бислоев ДОФХ и ДОФГ без полилизина и в его присутствии. Во всех случаях наблюдали ^{31}P ЯМР-спектр, представляющий собой один уширенный анизотропный пик (анизотропия химического сдвига σ около 50 мд), расположенный в области 20–25 мд с характерным плечом в низкополевой области. Он соответствует ламеллярной жидкокристаллической фазе липидного бислоя [30]. Для обоих типов липидов (ДОФХ, ДОФГ) в присутствии различных концентраций ПЛ спектры совпадали по форме, положению и относительной интенсивности отдельных линий, из чего можно сделать вывод, что добавление полилизина в бислои не приводит к появлению неламеллярных фаз липидов. Это позволяет нам перейти непосредственно к анализу диффузионных затуханий и интерпретировать получаемые коэффициенты самодиффузии липидов без учета изменения фазового состояния системы.

Типичный вид ДЗ для бислоев ДОФГ с полилизинном показан на рис. 3. Видно, что диффузионные затухания приобретают неэкспоненциальный вид. Для объяснения усложнения формы ДЗ были сделаны следующие предположения.

1. В сигнал стимулированного эха могут давать вклад и липиды и протеин. Поскольку липиды и полилизин сильно отличаются по размерам и по массе, то различаются их КСД.

2. Возможно, что в присутствии ПЛ образуются неподвижные домены протеина, которые выполняют роль механических препятствий: сами не дают вклада в сигнал ЯМР, однако приводят к «негауссову» характеру перемещения липидов в жидкой фазе с кажущимся распределением КСД.

3. Возможное объяснение заключается также в появлении набора КЛД молекул липидов вследствие взаимодействия части их с адсорбированным на поверхности бислоев полипептидом. В этом случае один из вариантов – образование латеральных комплексов, включающих в себя некоторое количество молекул полипептида и липида, перемещающихся по поверхности мембраны как целое. Вследствие того, что масса комплекса больше массы липида, коэффициент диффузии комплекса будет понижен по сравнению с КЛД индивидуальных молекул липидов.

4. Еще один возможный результат взаимодействия – адсорбция липида на поверхности бислоя и образование латеральных доменов (или подфаз жидкокристаллической фазы). В этом случае липиды не образуют долговременных контактов с полипептидом, поэтому движущейся единицей является молекула липида, а не комплекс. Однако при адсорбции полипептида меняются свойства подфазы, которые приводят к понижению КЛД липидов в пределах подфазы (доменов).

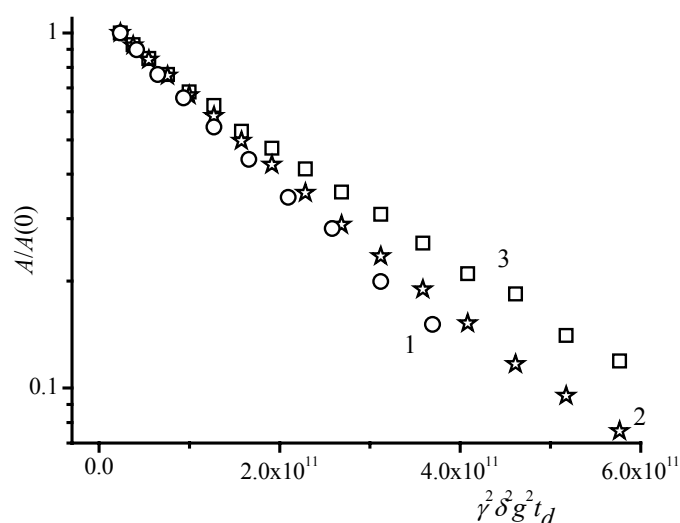


Рис. 3. Диффузионные затухания стимулированного спинового эхо для бислоев ДОФГ без ПЛ (1) и бислоев ДОФГ с ПЛ при молярном соотношении липида и мономерных звеньев полипептида 1 : 0.12 (2) и 1 : 0.5 (3). Время диффузии 111 мс, температура 293 К

Полилизин с $M = 25.2$ кДа – это довольно крупная по сравнению с липидами молекула, поэтому можно предположить, что она имеет малые по сравнению с липидами времена релаксации и сигнал от полипептида в системе будет много меньше, чем от липидов. Чтобы убедиться в этом, мы приготовили раствор полипептида с наибольшей из использованных концентрацией в приготовлении ориентированных мультибислоев и попытались получить от него сигнал, используя последовательность стимулированного спинового эха с теми же параметрами, которые использовались при измерении самодиффузии в ориентированных мультибислоях. Условия для формирования эхо-сигнала ЯМР от полипептида в растворе оказались более благоприятными по сравнению с условиями, когда полипептид находится в ориентированных мультибислоях, так как в растворе меньше неоднородностей магнитной восприимчивости и механических ограничений, обусловленных присутствием стеклянных пластинок и липидных бислоев. Однако сигнал от ПЛ в растворе наблюдать не удалось. Следовательно, и в случае мультибислоев липидов в присутствии ПЛ сигнал стимулированного эхо получается только от липидов.

Для выяснения влияния возможного присутствия неподвижных препятствий на наблюдаемую форму ДЗ были проведены измерения во всем интервале доступных времен диффузии. При этом зависимость формы ДЗ от времени диффузии не наблюдалась. Следовательно, эту причину неэкспоненциальности ДЗ можно также исключить из рассмотрения.

Среди двух оставшихся возможных причин неэкспоненциальности ДЗ (образование комплексов полипептида с липидами и образование латеральных подфаз, доменов) наиболее вероятным нам представляется образование латеральных доменов, так как ранее в подобной системе латеральное фазовое разделение регистрировалось методом ^2H ЯМР-спектроскопии [14]. Кроме того, в двухкомпонентном и однофазном липидном бислое коэффициенты диффузии

компонент обычно демонстрируют тенденцию к сближению [23], при том что в нашем случае (показано ниже) при разложении ДЗ на две компоненты одна из них характеризуется КЛД чистого бислоя, без ПЛ. Для двухфазного жидкокристаллического бислоя диффузионные затухания могут быть описаны уравнением, представляющим собой сумму выражений типа (1) [18, 28]. Используя такой подход, мы попытались представить экспериментальные ДЗ в виде суммы компонент, характеризующихся двумя коэффициентами самодиффузии липидов, назовем их «быстрый» D_f и «медленный» D_s , с соответствующими им населенностями A_f, A_s :

$$A(g) = A_f \exp(-\gamma^2 \delta^2 g^2 t_d D_f) + A_s \exp(-\gamma^2 \delta^2 g^2 t_d D_s), \quad (3)$$

где $A_f + A_s = 1$. Анализ ДЗ показал, что двухкомпонентная форма диффузионного затухания (3) наблюдается во всей области температур 293–333 К. Наличие двух компонент КСД, D_f и D_s , свидетельствует о том, что в бислоях существуют области, характеризующиеся отличными коэффициентами самодиффузии липидов. При этом можно определить соответствующие значения коэффициентов латеральной диффузии D_{Lf} и D_{Ls} .

Известно, что при добавлении в бислои, состоящие из заряженных липидов, полилизин адсорбируется на поверхности бислоев в результате электростатического притяжения между мономерами полилизина и «головами» липидов [3, 9, 15, 31–40], что может приводить к образованию латеральных доменов, в которых подвижность липидов «затруднена» по сравнению со «свободной» поверхностью мембраны. Поскольку диффузия липидов в таких латеральных доменах меньше, чем в окружении, ее описывают «медленной» компонентой КЛД, D_{Ls} [13, 41–43]. Латеральную диффузию липидов в областях бислоев, где нет адсорбированного полилизина, описывают D_{Lf} .

Средний коэффициент латеральной диффузии липидов:

$$\bar{D}_L = P_f \cdot D_{Lf} + P_s \cdot D_{Ls}. \quad (4)$$

При повышении доли ПЛ в мембране средний коэффициент латеральной диффузии липидов уменьшается. Рассмотрим более подробно, как зависят D_{Lf} и D_{Ls} и населенности компонент от температуры при изменении концентрации полипептида в мембранах (рис. 4).

Из рис. 4, а видно, что D_{Lf} липидов в бислоях ДОФГ + ПЛ практически совпадает с КЛД липидов в бислоях без полилизина. Энергия активации для «быстрого» коэффициента составляет порядка 27.9 кДж/(моль·К), что вполне соответствует значениям E_D для D_L липидов ДОФГ и совпадает с тем, что наблюдалось ранее [20, 29]. Это означает, что заряженные мономеры адсорбированного полипептида не взаимодействуют с заряженными «головами» липидов вне латеральных доменов, образуемых при адсорбции.

В присутствии полилизина значения «медленных» коэффициентов D_{Ls} меньше D_{Lf} в 2.7–3.1 раза при тех же условиях эксперимента. Уменьшение коэффициента самодиффузии липидов в доменах при увеличении концентрации полилизина может быть связано с уменьшением площади поверхности бислоя, приходящейся на одну молекулу липидов. Из рис. 4, б видно, что большее количество полилизина в системе приводит к увеличению доли доменов в липидных

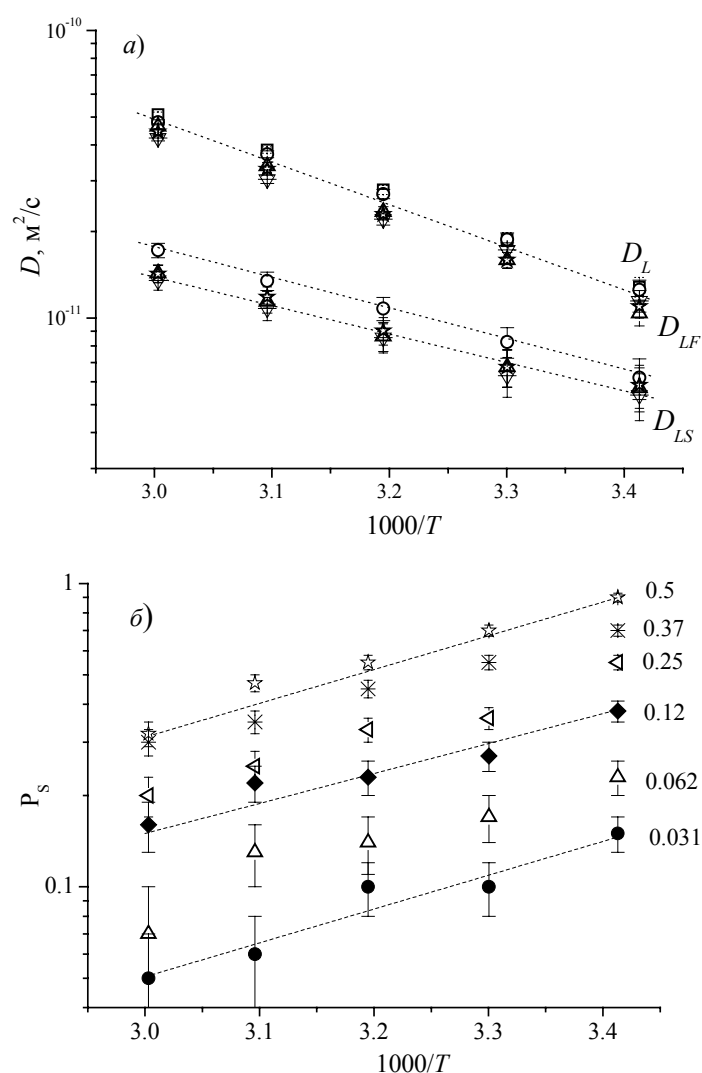


Рис. 4. Температурные зависимости: а) КЛД (D_L) ДОФГ, быстрой (D_{LF}) и медленной (D_{LS}) компонент КЛД в бислоях ДОФГ с ПЛ; б) населенности компоненты с пониженным коэффициентом латеральной самодиффузии. Пунктирные линии – наилучшая аппроксимация экспериментальных результатов. Кажущаяся энергия активации для быстрой компоненты составляет 27.9 кДж/(моль·К), для медленной компоненты – 17.8 кДж/(моль·К). \square – ДОФГ; \circ – ДОФГ + ПЛ, 1 : 0.062; Δ – ДОФГ + ПЛ, 1 : 0.125; \star – ДОФГ + ПЛ, 1 : 0.25; ∇ – ДОФГ + ПЛ, 1 : 0.5. Вертикальными отрезками на графиках указаны стандартные отклонения

бислоях, так же как и понижение температуры. Следовательно, объяснением изменений коэффициентов самодиффузии липидов в доменах и соответствующих населенностей P_s при увеличении концентрации полилизина может служить уплотнение липидного бислоя в области доменов.

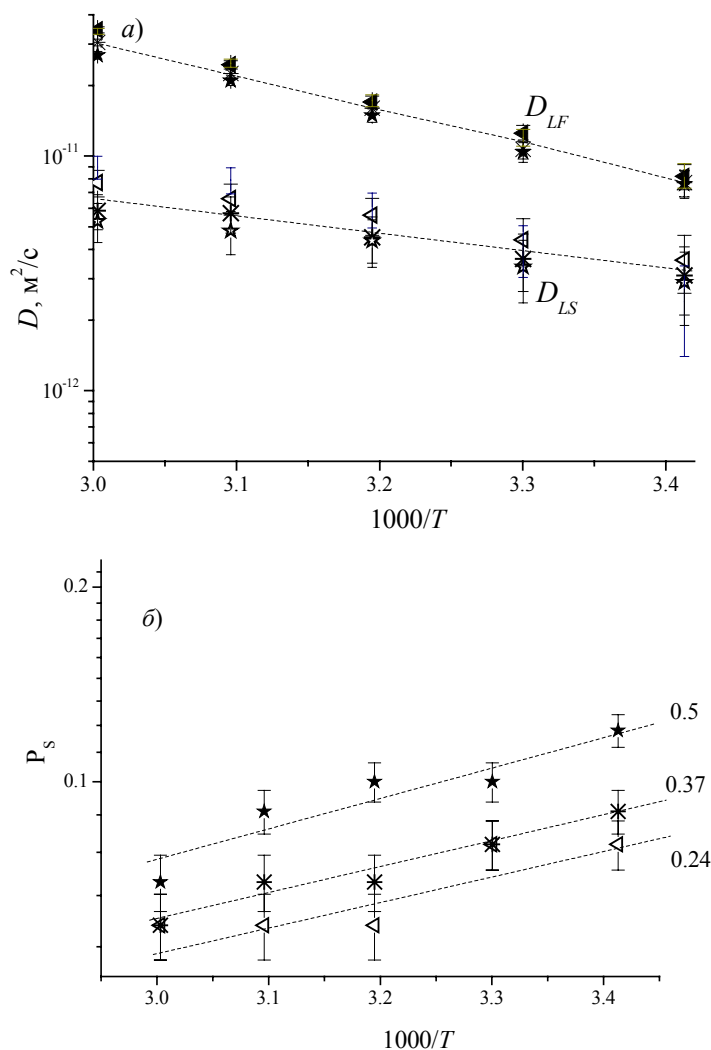


Рис. 5. Температурные зависимости: а) «быстрой» (D_f) и «медленной» (D_s) компонент ДЗ липидов в бислоях DOPC в зависимости от концентрации ПЛ; б) населенности компоненты с пониженным коэффициентом латеральной самодиффузии Пунктирные линии – аппроксимация экспериментальных результатов. Быстрые коэффициенты самодиффузии липидов D_f близки к значениям D_L липидов DOPC в бислоях без полилизина. Энергия активации составляет 26 и 13.4 кДж/(моль·К) для «быстрого» и «медленного» коэффициентов соответственно. Вертикальными отрезками на графиках указаны стандартные отклонения

3.3. Бислои ДОФХ с полилизинном. В присутствии полилизина в бислоях ДОФХ диффузионные затухания также имеют неэкспоненциальный вид во всем температурном интервале 293–333 К. Добавление полилизина в бислои ДОФХ также приводит к образованию областей с различающимися коэффициентами латеральной диффузии липидов.

Температурные зависимости значений коэффициентов D_{LS} и D_{LF} представлены на рис. 5, а. Видно, что характер зависимости компонентов D_L от температуры

и концентрации ПЛ в системе аналогичен бислоям ДОФГ. Значения энергии активации E_D , соответствующие диффузии части липидов в мембранах ДОФХ с полилизинном и характеризующие области вне латеральных доменов, составляют около 26 кДж/(моль·К), что вполне совпадает с данными для «чистого» ДОФХ [20, 29]. С ростом концентрации протеина в мультибислоях ДОФХ медленная компонента ДЗ уменьшается (D_{LS} (1 : 0.125) превышает D_{LS} (1 : 0.5) в 1.7–1.9 раза при тех же значениях T). Оценки E_D для медленной компоненты дают значения порядка 13.4 кДж/(моль·К). С увеличением концентрации полилизина в системе липидных бислоев ДОФХ наблюдается увеличение населенности, соответствующей доменам (P_S) (см. рис. 5, б).

3.4. Домены полипептида в бислоях ДОФГ и ДОФХ с полилизинном.

Мы получили диффузионные затухания стимулированного спинного эха для однокомпонентных бислоев ДОФХ и ДОФГ в присутствии полилизина, установили, что ДЗ имеют неэкспоненциальную форму и могут быть представлены в виде суммы компонент, характеризующихся «медленным» D_{LS} и «быстрым» D_{Lf} коэффициентами латеральной диффузии липидов. При этом коэффициент D_{Lf} совпадает по величине с КЛД липидов в бислоях без полилизина. Анализ возможных причин появления «медленной» компоненты ДЗ позволил сделать предположение о существовании в бислоях областей (липидных доменов) с пониженным коэффициентом самодиффузии.

Большая фракция сигнала, соответствующего доменам (P_S), наблюдается в мультибислоях заряженного липида ДОФГ (рис. 4, б), следовательно, воздействие полилизина на бислои определяется в большей степени электростатическими взаимодействиями. Это согласуется с известными представлениями о взаимодействии заряженного полипептида с биомембранами [32, 44, 45].

Из рис. 4, а и 5, а видно, что и коэффициент самодиффузии липидов в доменах, и коэффициент самодиффузии липидов в областях вне доменов слабо зависят от концентрации полипептида, в то время как фракция доменов возрастает при увеличении концентрации полипептида. С учетом того, что латеральная диффузия липидов достаточно высока (за время измерения молекула липида перемещается на расстояние несколько мкм), при этом большинство молекул липидов не меняют подфазу жидкокристаллической фазы, можно прийти к выводу, что и полипептиды, взаимодействующие с липидами, также образуют домены с размерами больше пространственного разрешения ЯМР ИГМП (нескольких мкм). Образование полилизинном макроагрегатов возможно благодаря тому, что в области адсорбции полилизина плотность поверхностного заряда бислоев больше по сравнению с окружением.

Заключение

Методом ЯМР с импульсным градиентом магнитного поля исследована самодиффузия липидов в ориентированных бислоиных однокомпонентных мембранах, состоящих из отрицательно заряженного или цвиттерионного липидов в присутствии периферического (заряженного) полипептида. По замедлению трансляционной подвижности липидов обнаружены образование латеральных доменов липидов и связанное с ним образование латеральных доменов поли-

пептида, обусловленные в основном электростатическими взаимодействиями липидов с полипептидом. Определены характеристики латеральной диффузии липидов в доменах и вне них.

Работа выполнена при частичной поддержке гранта РНП. Авторы благодарят проф. Линдблома (Университет Умео, Швеция) за предоставленную возможность выполнить часть измерений самодиффузии липидов на спектрометре ЯМР в его лаборатории.

Summary

I.Y. Desyatnikova, B.V. Munavirov, A.V. Filippov. Investigation of Lipid Self-Diffusion in Bilayers at Their Interaction with Charged Polypeptide.

Lateral diffusion in oriented zwitterionic (DOPC) and charged (DOPG) lipid multilayers was studied in the presence of charged polypeptide polylysine with $M = 25.2$ kDa by means of Pulsed Field Gradient Nuclear Magnetic Resonance (PFG NMR). Polylysine does not change the lamellar structure of studied systems; along with that, the form of stimulated spin echo signal diffusion decay (DD) does change. This implies the appearance of ensemble of lateral diffusion coefficients (D_L) of lipids. The analysis of NMR spectra form, signal intensity, and the dependence of DD form on diffusion time shows that the most probable reason of D_L ensemble appearing is bilayer domains formation upon polylysine adsorption. Thereat, adsorbed polypeptide is also likely to form aggregates close to membrane surface. The main contribution to domain formation is made by electrostatic interaction of lipid and polypeptide. The parameters of lipid self-diffusion in domains and surrounding membrane are determined in the temperature interval of 293–333 K.

Key words: model membranes, NMR, lipid diffusion, lipid domains formation, lipid-polymer interaction.

Литература

1. *Greenfield N., Fasman G.D.* Computed circular dichroism spectra for the evaluation of protein conformation // *Biochem.* – 1969. – V. 8, No 10. – P. 4108–4116.
2. *Jackson M., Haris P.I., Chapman D.* Conformational transitions in poly(L-lysine): studies using Fourier transform infrared spectroscopy // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1989. – V. 998, No 1. – P. 75–79.
3. *Heimburg T., Angerstein B., Marsh D.* Binding of peripheral proteins to mixed lipid membranes: Effect of lipid demixing upon binding // *Biophys. J.* – 1999. – V. 76, No 5. – P. 2575–2586.
4. *Schwieger C., Blume A.* Interaction of poly(L-lysines) with negatively charged membranes: an FT-IR and DSC study // *Europ. Biophys. J.* – 2007. – V. 36, No 4–5. – P. 437–450.
5. *Wang J., Gambhir A., McLaughlin S., Murray D.* A computational model for the electrostatic sequestration of PI(4,5)P2 by membrane-adsorbed basic peptides // *Biophys. J.* – 2004. – V. 86, No 4. – P. 1969–1986.
6. *Galla H.J., Sackmann E.* Chemically induced lipid phase separation in model membranes containing charged lipids: a spin label study // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1975. – V. 401, No 3. – P. 509–529.
7. *Hartmann W., Galla H.J.* Binding of polylysine to charged bilayer membranes. Molecular organization of a lipid-peptide complex // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1978. – V. 509, No 3. – P. 474–490.

8. *Takahashi H., Yasue T., Ohki K., Hatta I.* Structure and phase behaviour of dimyristoylphosphatidic acid/poly(L-lysine) system // *Mol. Membr. Biol.* – 1996. – V. 13, No 4. – P. 233–240.
9. *Carrier D., Pézolet M.* Investigation of polylysine-dipalmitoylphosphatidylglycerol interactions in model membranes // *Biochem.* – 1986. – V. 25, No 14. – P. 4167–4174.
10. *Schiller P., Mögel H.-J., Wahab M., Reimer U.* Cooperative effects induced by adsorbed polypeptides in mixed membranes // *J. Phys. Chem. B.* – 2002. – V. 106, No 47. – P. 12323–12330.
11. *de Kruijff B., Cullis P.R.* The influence of poly(L-lysine) on phospholipid polymorphism. Evidence that electrostatic polypeptide-phospholipid interactions can modulate bilayer/non-bilayer transitions // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1980. – V. 601, No 1. – P. 235–240.
12. *Menger F.M., Seredyuk V.A., Kitaeva M.V., Yaroslavov A.A., Melik-Nubarov N.S.* Migration of poly-L-lysine through a lipid bilayer // *J. Amer. Chem. Soc.* – 2003. – V. 125, No 10. – P. 2846–2847.
13. *May S., Harries D., Ben-Shaul A.* Lipid demixing and protein-protein interactions in the adsorption of charged proteins on mixed membranes // *Biophys. J.* – 2000. – V. 79, No 4. – P. 1747–1760.
14. *Franzin C.M., Macdonald P.M.* Polylysine-induced H-2 NMR-observable domains in phosphatidylserine/ phosphatidylcholine lipid bilayers // *Biophys. J.* – 2001. – V. 81, No 6. – P. 3346–3362.
15. *Carrier D., Pézolet M.* Raman spectroscopic study of the interaction of poly-L-lysine with dipalmitoylphosphatidylglycerol bilayers // *Biophys. J.* – 1984. – V. 46, No 4. – P. 497–506.
16. *Carrier D., Dufourcq J., Faucon J.-F., Pezolet M.* A fluorescence investigation of the effects of polylysine on dipalmitoylphosphatidylglycerol bilayers // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1985. – V. 820, No 1. – P. 131–139.
17. *Orädd G., Lindblom G.* Lateral diffusion studied by pulsed field gradient NMR on oriented lipid membranes // *Magn. Reson. Chem.* – 2004. – V. 42, No 2. – P. 123–131.
18. *Filippov A., Orädd G., Lindblom G.* Lipid lateral diffusion in ordered and disordered phases in raft mixtures // *Biophys. J.* – 2004. – V. 86, No 2. – P. 891–896.
19. *Tanner J.E.* Use of the stimulated echo in NMR diffusion studies // *J. Chem. Phys.* – 1970. – V. 52, No 5. – P. 2523–2526.
20. *Filippov A., Orädd G., Lindblom G.* The effect of cholesterol on the lateral diffusion of phospholipids in oriented bilayers // *Biophys. J.* – 2003. – V. 84, No 5. – P. 3079–3086.
21. *Lindblom G., Killian J.A., Lindblom G.* Nuclear magnetic resonance spectroscopy and lipid phase behaviour and lipid diffusion // *Advances in lipid methodology* / Ed. W.W. Christie. – Dundee: Oily Press, 1998. – P. 133–209.
22. *Orädd G., Lindblom G.* NMR in macroscopically oriented lyotropic systems // *NMR of orientationally ordered liquids* / Eds. E.E. Burnell, C.A. de Lange. – Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2003. – P. 399–418.
23. *Orädd G., Lindblom G., Westerman P.W.* Lateral diffusion of cholesterol and dimyristoylphosphatidylcholine in a lipid bilayer measured by pulsed field gradient NMR spectroscopy // *Biophys. J.* – 2002. – V. 83, No 5. – P. 2702–2704.
24. *Beschiaschvili G., Seelig J.* Peptide binding to lipid bilayers. Nonclassical hydrophobic effect and membrane-induced pK shift // *Biochem.* – 1992. – V. 31, No 41. – P. 10044–10053.
25. *Vaz W.L.C., Clegg R.M., Hallmann D.* Translational diffusion of lipids in liquid crystalline phase phosphatidylcholine multibilayers. A comparison of experiment with theory // *Biochem.* – 1985. – V. 24, No 3. – P. 781–786.

26. *Tristram-Nagle S., Petrache H.I., Nagle J.F.* Structure and interactions of fully hydrated dioleoylphosphatidylcholine bilayers // *Biophys. J.* – 1998. – V. 75, No 2. – P. 917–925.
27. *Oellerich S., Lecomte S., Paternostre M., Heimburg T., Hildebrandt P.* Peripheral and integral binding of cytochrome c to phospholipids vesicles // *J. Phys. Chem.* – 2004. – V. 108, No 112. – P. 3871–3878.
28. *Filippov A., Orädd G., Lindblom G.* Domain formation in model membranes studied by pulsed-field gradient-NMR: The role of lipid polyunsaturation // *Biophys. J.* – 2007. – V. 93, No 9. – P. 3182–3190.
29. *Filippov A., Orädd G., Lindblom G.* Influence of cholesterol and water content on phospholipid lateral diffusion in bilayers // *Langmuir.* – 2003. – V. 19, No 16. – P. 6397–6400.
30. *Seelig J.* ³¹P nuclear magnetic resonance and the head group structure of phospholipids in membranes // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1987. – V. 515, No 2. – P. 105–140.
31. *Carbone M.A., Macdonald P.M.* Cardiotoxin II segregates phosphatidylglycerol from mixtures with phosphatidylcholine: P-31 and H-2 NMR spectroscopic evidence // *Biochemi.* – 1996. – V. 35, No 11. – P. 3368–3378.
32. *Denisov G., Wanaski S., Luan P., Glaser M., McLaughlin S.* Binding of basic peptides to membranes produces lateral domains enriched in the acidic lipids phosphatidylserine and phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate: An electrostatic model and experimental results // *Biophys. J.* – 1998. – V. 74, No 2, Pt. 1. – P. 731–744.
33. *Dias R.S., Pais A.A.C.C., Linse P., Miguel M.G., Lindman B.* Polyion adsorption onto catanionic surfaces. A Monte Carlo study // *J. Phys. Chem. B.* – 2005. – V. 109, No 23. – P. 11781–11788.
34. *Domanov Y.A., Molotkovsky J.G., Gorbenko G.P.* Coverage-dependent changes of cytochrome c transverse location in phospholipid membranes revealed by FRET // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2005. – V. 1716, No 1. – P. 49–58.
35. *Fukushima K., Sakamoto T., Tsuji J., Kondo K., Shimosawa R.* The transition of alpha-helix to beta-structure of poly(L-lysine) induced by phosphatic-acid vesicles and its kinetics at alkaline pH // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1994. – V. 1191, No 1. – P. 133–140.
36. *Hinderliter A., Almeida P.F.F., Creutz C.E., Biltonen R.L.* Domain formation in a fluid mixed lipid bilayer modulated through binding of the C₂ protein motif // *Biochem.* – 2001. – V. 40, No 13. – P. 4181–4191.
37. *Hinderliter A., Biltonen R.L., Almeida P.F.F.* Lipid modulation of protein-induced membrane domains as a mechanism for controlling signal transduction // *Biochem.* – 2004. – V. 43, No 22. – P. 7102–7110.
38. *Kleinschmidt J.H., Marsh D.* Spin-label electron spin resonance studies on the interactions of lysine peptides with phospholipid membranes // *Biophys. J.* – 1997. – V. 73, No 5. – P. 2546–2555.
39. *Laroche G., Carrier D., Pézolet M.* Study of the effect of poly(L-lysine) on phosphatic acid and phosphatidylcholine/phosphatidic acid bilayers by Raman spectroscopy // *Biochem.* – 1988. – V. 27, No 17. – P. 6220–6228.
40. *Mosior M., McLaughlin S.* Binding of basic peptides to acidic lipids in membranes: effect of inserting alanine(s) between the basic residues // *Biochem.* – 1992. – V. 31, No 6. – P. 1767–1773.
41. *Ben-Tal N., Honig B., Peitzsch R.M., Denisov G., McLaughlin S.* Binding of small basic peptides to membranes containing acidic lipids: theoretical models and experimental results // *Biophys. J.* – 1996. – V. 71, No 2. – P. 561–575.
42. *May S.* Stability of macroion-decorated lipid membranes // *J. Phys.: Condens. Matter.* – 2005. – V. 17, No 32. – P. R833–R850.

43. *Mbamala E.C., Ben-Shaul A., May S.* Domain formation induced by the adsorption of charged proteins on mixed lipid membranes // *Biophys. J.* – 2005. – V. 88, No 3. – P. 1702–1714.
44. *May S., Harries D., Ben-Shaul A.* The phase behavior of cationic lipid-DNA complexes // *Biophys. J.* – 2000. – V. 78, No 4. – P. 1681–1697.
45. *Murray D.* Electrostatic properties of membranes containing acidic lipids and adsorbed basic peptides: Theory and experiment // *Biophys. J.* – 1999. – V. 77, No 6. – P. 3176–3188.

Поступила в редакцию
28.10.08

Десятникова Ирина Юрьевна – аспирант кафедры молекулярной физики Казанского государственного университета.

E-mail: irina.desyatnikova@ksu.ru

Мунавиров Булат Васильевич – студент физического факультета, инженер кафедры молекулярной физики Казанского государственного университета.

E-mail: bmunavirov@yahoo.com

Филиппов Андрей Васильевич – доктор физико-математических наук, доцент кафедры молекулярной физики Казанского государственного университета.

E-mail: andrey.filippov@ksu.ru