

УДК 577.352

Дипольные модификаторы – регуляторы латеральной гетерогенности липидных мембран

С. С. Ефимова, О. С. Остроумова*

Институт цитологии РАН, 194064, Санкт-Петербург, Тихорецкий просп., 4

*E-mail: osostroumova@mail.ru

Поступила в редакцию 19.10.2017

Принята к печати 02.03.2017

РЕФЕРАТ С использованием флуоресцентной конфокальной микроскопии гигантских одноламеллярных липосом, изготовленных из тройных смесей, содержащих холестерин (Хол), фосфолипиды с низкой (ДОФХ, ПОФХ или ДПОФХ) и липиды с высокой (сфингомиелин (СМ) или тетрамиристоилкардиолипин (ТМКЛ)) температурой плавления ацильных цепей, изучены паттерны фазового разделения везикул в мембранах до и после введения в суспензию биологически активных низкомолекулярных соединений амфифильной природы, называемых дипольными модификаторами. Показано, что независимо от вида тугоплавкого липида в ряду ПОФХ, ДОФХ и ДПОФХ содержание липосом, демонстрирующих фазовое разделение, уменьшается. При замене в составе везикул тугоплавкой компоненты, СМ на ТМКЛ, наблюдается усиление фазовой сегрегации липидов. Учитывая, что первый случай соответствует уменьшению толщины мембранных областей, обогащенных легкоплавкими фосфолипидами и находящихся в неупорядоченной жидкой фазе, а второй – снижению толщины упорядоченных липидных доменов, включающих различные тугоплавкие липиды, полученные результаты позволяют связывать сценарий доменной организации везикул с величиной несоответствия между толщиной углеводородного остова мембраны в упорядоченном и неупорядоченном состоянии. Дипольные модификаторы, флавоноиды и стирилпиридиновые красители, ослабляют фазовую сегрегацию мембран, включающих СМ, Хол, ПОФХ или ДОФХ. Остальные протестированные трехкомпонентные липидные системы к действию модификаторов практически не чувствительны. Выдвинуто предположение о связи наблюдаемых эффектов со способностью дипольных модификаторов влиять на величину несоответствия между толщиной мембраны в различном агрегатном состоянии за счет разжижения неупорядоченных и (или) упорядоченных липидных доменов при погружении в мембрану, глубина которого зависит от гидрофобности молекул модификаторов, формы липидов, образующих домены, и плотности их упаковки. Наибольший эффект среди проверенных модификаторов вызывает флоретин, RH 421 и RH 237.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА латеральная неоднородность мембран, липидные бислои, липидные домены, дипольные модификаторы, стирилпиридиновые красители, фазовое разделение, флавоноиды, халконы.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ДОФХ – 1,2-диолеил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин; ПОФХ – 1-пальмитоил-2-олеоил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин; ДПОФХ – 1,2-дипальмитолеоил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин; СМ – сфингомиелин из мозга свиней; ТМКЛ – 1,1',2,2'-тетрамиристоилкардиолипин; Хол – холестерин.

ВВЕДЕНИЕ

Липидный бислой мембраны может иметь доменную структуру в результате сосуществования не смешиваемых липидных фаз, находящихся в различных агрегатных состояниях. Однокомпонентные липидные бислои при температуре ниже температуры плавления липида (T_m) пребывают в твердокристаллическом состоянии. В зависимости от наклона липидных молекул и способа упаковки углеводородных хвостов в твердом бислое выделяют несколько типов фаз: кристаллическую, гель-фазу и промежуточную риппл-фазу, характерную для некоторых

липидов, в частности, насыщенных фосфохолинов [1]. При температуре выше температуры основного фазового перехода липиды в бислое находятся в жидкоподобном состоянии. Фазовое поведение смеси липидов с различной температурой плавления существенно усложняется и в определенном температурном диапазоне (между температурами плавления индивидуальных липидов) в бислое может наблюдаться фазовое разделение: сосуществование твердой (s_o) и жидкой фаз (l_d), обогащенных липидом с высокой и низкой температурой плавления соответственно. Добавление к таким смесям некото-

рых стеринов, в частности холестерина, усиливает их фазовую сегрегацию: возникает промежуточная жидкая упорядоченная фаза (l_o). Установлено, что коэффициент латеральной диффузии липидов в l_o -фазе в 2–3 раза меньше по сравнению с l_a -областями [2]. Считается, что биологическим мембранам также свойственна латеральная сегрегация компонентов. Хотя гель-домены не относятся к уникальным свойствам модельных мембран (они обнаружены и в плазматических мембранах живых клеток [3]), принято думать, что фазовое разделение в биологических мембранах представлено в основном двумя жидкими фазами ($l_a + l_o$) [4]. Поскольку в этом случае латеральной сегрегации подвержены не только мембранные липиды, но и белки, значительное распространение приобрела модель, согласно которой в биологических мембранах возникают белок-липидные нанодомены (рафты). Эти области обогащены тугоплавкими липидами и стеринами и находятся в l_o -состоянии. Интерес к рафтам вызван их предполагаемым участием в таких жизненно важных процессах, как сортировка и доставка белков, клеточная сигнализация, иммунный ответ и др. [5–16]. Однако даже само существование рафтов в клеточных мембранах до сих пор остается дискуссионным. Считается, что сложности с обнаружением рафтов в клеточных мембранах связаны с тем, что их размер может варьировать от единиц до сотен нанометров, и они чрезвычайно динамичны. В липидных же бислоях упорядоченные домены могут достигать значительно больших размеров, что делает возможным их визуализацию методами флуоресцентной микроскопии. Для этого используют гигантские одноламеллярные липосомы [17]. Фазовое разделение в липосомах можно наблюдать, если ввести в мембрану флуоресцентно меченные липиды. Большинство подобных меток предпочитают неупорядоченную жидкокристаллическую фазу, поэтому упорядоченные домены остаются неокрашенными.

Низкомолекулярные соединения амфифильной природы, называемые дипольными модификаторами, в частности некоторые флавоноиды, способны влиять на баланс между фазами. Согласно работе [18], введение в суспензию липосом из бинарных смесей (ДОФХ : СМ (80 : 20 мол. %), ДОФХ : ДМОФХ (50 : 50 мол. %) или ДОФХ : ДПОФХ (50 : 50 мол. %)) флавоноидов, флоретина или биоханина А сопровождается уменьшением относительного числа липидных везикул, имеющих гель-домены. Сходное действие в отношении трехкомпонентных бислоев из ПОФХ, Хол и СМ оказывают флоретин, его гликозид флорицин, кверцетин и мирицетин, а также стирилпиридиновые красители серии RH [19]. Способность указанных дипольных модификаторов влиять на доменную

структуру ПОФХ-мембран, включающих различные стерины и сфинголипиды, была проанализирована в [18], в то время как зависимость наблюдаемых эффектов от вида фосфолипида, образующего неупорядоченную жидкую фазу, не изучена. Цель данной работы состояла в изучении влияния легкоплавкой компоненты на сценарий фазового разделения в липосомах, содержащих Хол и СМ, до и после введения флавоноидов или стирилпиридиновых красителей. Использование различных фосфолипидов, ПОФХ, ДОФХ и ДПОФХ, позволило последовательно изменять толщину обогащенных ими неупорядоченных липидных областей мембраны, находящихся в жидком состоянии. Для варьирования толщины упорядоченных липидных доменов помимо везикул, включающих СМ, были протестированы липидные смеси, содержащие ТМКЛ.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

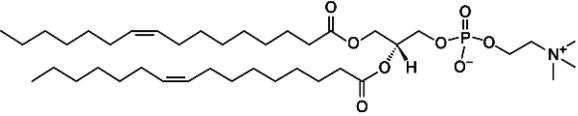
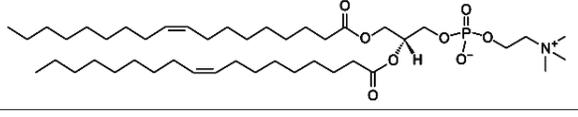
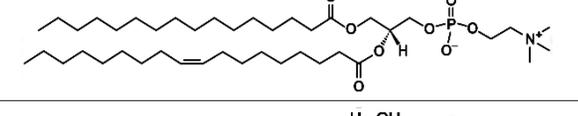
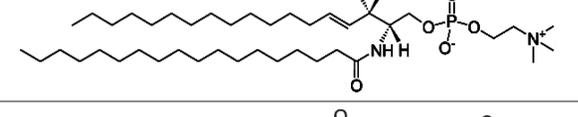
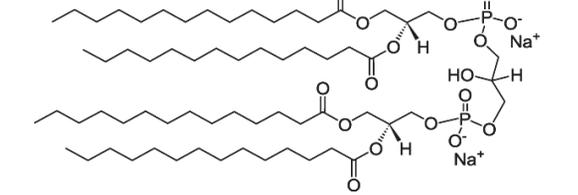
Материалы

В работе использовали следующие реактивы: сорбитол, флоретин, флорицин, кверцетин, мирицетин и RH 421 (Sigma, США); RH 237 (Molecular Probes, США); 1-пальмитоил-2-олеоил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин (ПОФХ), 1,2-диолеоил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин (ДОФХ), 1,2-дипальмитолеоил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин (ДПОФХ), 1,1',2,2'-тетрамиристоилкардиолипид (ТМКЛ), сфингомиелин из мозга свиней (СМ), холестерин (Хол) и 1,2-дипальмитоил-*sn*-глицеро-3-фосфоэтанолламин-N-(лиззамин родамин) (ЛР-ДПФЭ) (Avanti Polar Lipids, США). В таблице представлены некоторые характеристики липидов.

Конфокальная микроскопия гигантских моноламеллярных липосом

Гигантские моноламеллярные липосомы изготавливали методом электроформации с помощью Nanion vesicle prep pro (Германия) на покрытых смесью оксидов индия и титана стеклах (90% оксида индия и 10% оксида титана, размер $29 \times 68 \times 0.9$ мм) с поверхностным удельным сопротивлением 20–30 Ом/см² (стандартный протокол, напряжение 3 В, частота 10 Гц, 1 ч, 25°C). Латеральное фазовое разделение визуализировали путем введения флуоресцентного зонда ЛР-ДПФЭ в исходный липидный раствор тройных смесей из 40 мол. % фосфолипида с низкой температурой плавления (ДОФХ, ПОФХ или ДПОФХ), 40 мол. % липида с высокой температурой плавления (СМ или ТМКЛ) и 20 мол. % Хол в хлороформе (2 мМ). Концентрация ЛР-ДПФЭ в образце составляла 1 мол. %. Суспензию липосом разделяли на аликвоты. В качестве контроля использовала-

Основные характеристики изучаемых липидов

Липид	Химическая структура	C n:m	T _m , °C
ДПОФХ		16 : 1	-36
ДОФХ		18 : 1	-17
ПОФХ		16 : 0–18 : 1	-2
СМ		16 : 1–18 : 0	45
ТМКЛ		14 : 0	47

Примечание. Cn : m – число атомов углерода (n) и число двойных связей (m) в ацильных цепях; T_m – температура главного фазового перехода.

ли аликвоту без модификатора. Экспериментальные образцы содержали 400 мкМ флавоноида (флоретина, флорицина, кверцетина или мирицетина) или 10 мкМ стирилпиридинового красителя (RH 421 или RH 237). Липосомы наблюдали через иммерсионный объектив 100.0 × /1.4 HCX PL в Leica TCS SP5 конфокальной лазерной системы Apo (Leica Microsystems, Германия). Наблюдение препаратов проводили при температуре 25°C. Свечение ЛР-ДПФЭ возбуждали светом с длиной волны 543 нм (гелий-неоновый лазер). Известно, что ЛР-ДПФЭ в бислое с фазовым разделением встраивается преимущественно в жидкую неупорядоченную фазу (l_a) [20]. В то время как жидкая упорядоченная (l_o) и твердая упорядоченная (гель, s_o) фазы остаются неокрашенными [21]. Упорядоченные домены дискриминировали по их морфологии: неокрашенные домены круглой формы считали пребывающими в l_o-состоянии, а неокрашенные области нерегулярной конфигурации относили к s_o-фазе. Образец характеризовали частотой встречаемости (p_i, %) гомогенных и гетерогенных везикул:

$$p_i = \frac{N_i}{N} \cdot 100\%, \quad (1)$$

где i – тип фазового разделения липосом (гомогенные l_a-везикулы или липосомы, включающие l_o или s_o-домены); N_i – число везикул в образце с определенным фазовым сценарием (от 0 до 50), N – общее число липосом в образце (50 в каждой системе). Значения p_i для каждой из систем получали путем усреднения величин, определенных в четырех независимых экспериментах. Результаты для каждой из тестируемых липидных систем представляли в виде круговой диаграммы. Погрешности определения доли липосом с определенным типом фазового разделения приведены на диаграммах.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На рис. 1А (верхняя панель) представлены круговые диаграммы, показывающие возможные паттерны фазовой сегрегации мембран липосом, сформированных с участием сфингомиелина (СМ; 40 мол. %), холестерина (Хол; 20 мол. %) и различных легкоплавких фосфолипидов (ПОФХ, ДОФХ или ДПОФХ; 40 мол. %). (Соответствующие температуры плавления фосфолипидов указаны в таблице.) Примеры микротографий липидных везикул с тем или иным

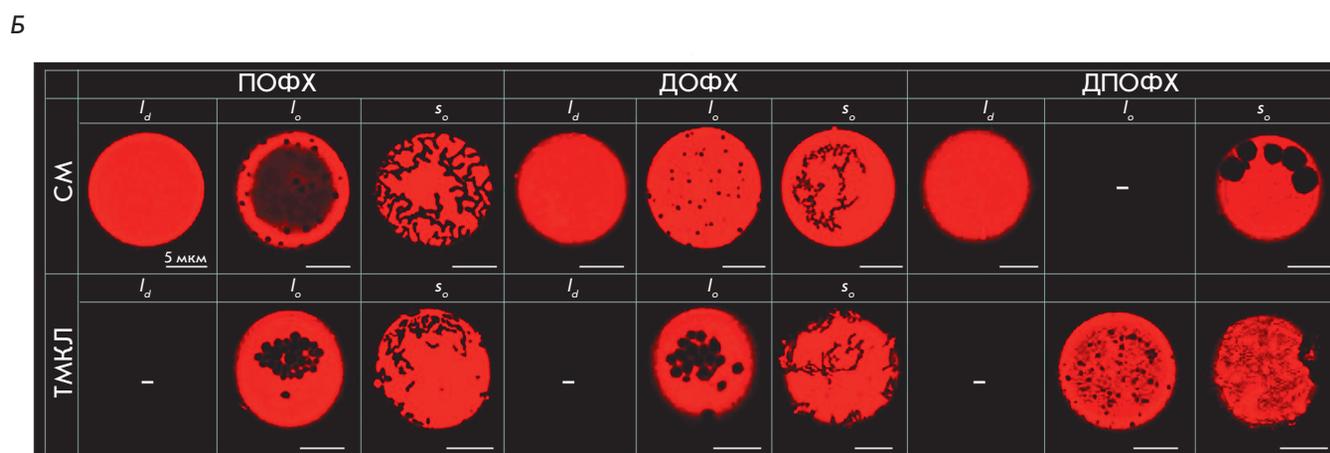
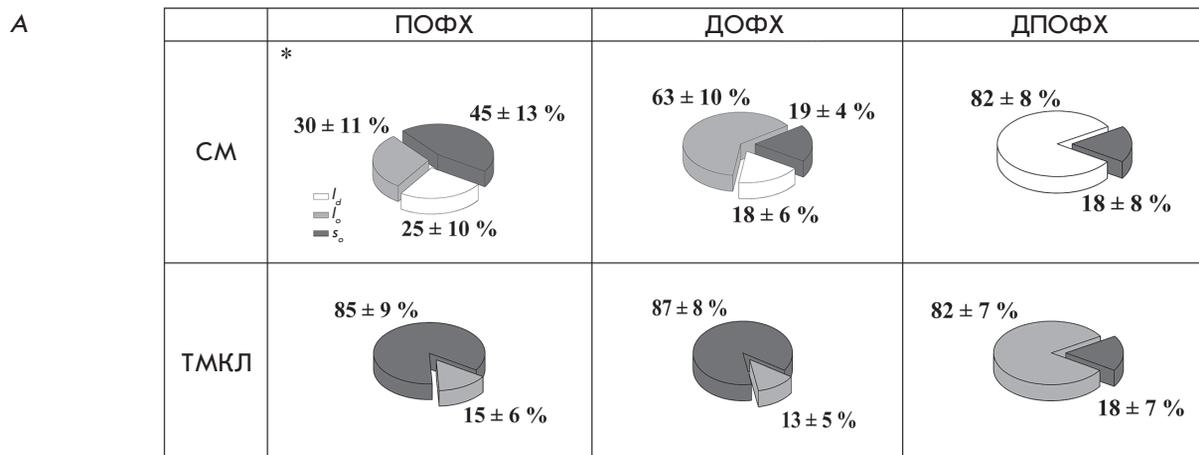


Рис. 1. Круговые диаграммы, показывающие вероятные сценарии фазового разделения в мембранах липосом из смесей сфингомиелина (СМ, 40 мол. %) или тетрамиристоилкардиолипина (ТМКЛ, 40 мол. %) с холестерином (20 мол. %) и различными фосфолипидами (ПОФХ, ДОФХ или ДПОФХ) (40 мол. %) (А), и микрофотографии липосом различного состава, показывающих тот или иной тип фазового разделения в бислое (l_d , l_o , s_o) (Б). Здесь и на рис. 3 и 4 на каждой диаграмме сектор, отвечающий процентному соотношению везикул с твердыми упорядоченными доменами (s_o), окрашен в темно-серый цвет, с жидкими упорядоченными областями (l_o) – в светло-серый цвет, сектор белого цвета характеризует относительное число гомогенно окрашенных флуоресцентным маркером липосом, пребывающих в жидком неупорядоченном состоянии (l_d) без видимого фазового разделения. * – Данные взяты из [19]

видом фазового разделения мембран (l_d , l_o , s_o) представлены на рис. 1Б (верхняя панель). Сценарий фазового разделения в смеси СМ : Хол : ПОФХ изучен нами ранее [19]. Установлено, что 45 ± 13% СМ : Хол : ПОФХ-липосом содержат твердокристаллические домены нерегулярной формы (s_o). Жидкие упорядоченные домены круглой формы (l_o) включают 30 ± 11% ПОФХ : СМ : Хол-везикул. Оставшаяся часть – это гомогенно окрашенные флуоресцентным маркером липосомы (l_d), не показывающие микроскопического фазового разделения. Из рис. 1А (верхняя панель) можно заметить, что замена в мембранообразующей смеси ПОФХ на ДОФХ приводит

к падению доли везикул, включающих s_o -домены (19 ± 4%), и росту числа липосом, содержащих l_o -области (63 ± 10%). В случае ДПОФХ 82 ± 8% везикул гомогенно окрашены, отсутствует видимое фазовое разделение, а оставшаяся часть включает твердые домены. Таким образом, в ряду ПОФХ, ДОФХ, ДПОФХ видимая фазовая сегрегация уменьшается. В указанном ряду толщина углеводородного остова неупорядоченных областей (d_{Ld}), включающих различные легкоплавкие фосфолипиды, снижается, а разница между толщиной гидрофобного региона мембраны в упорядоченном и неупорядоченном состоянии (Δd) растет (рис. 2, левая часть) [22, 23].

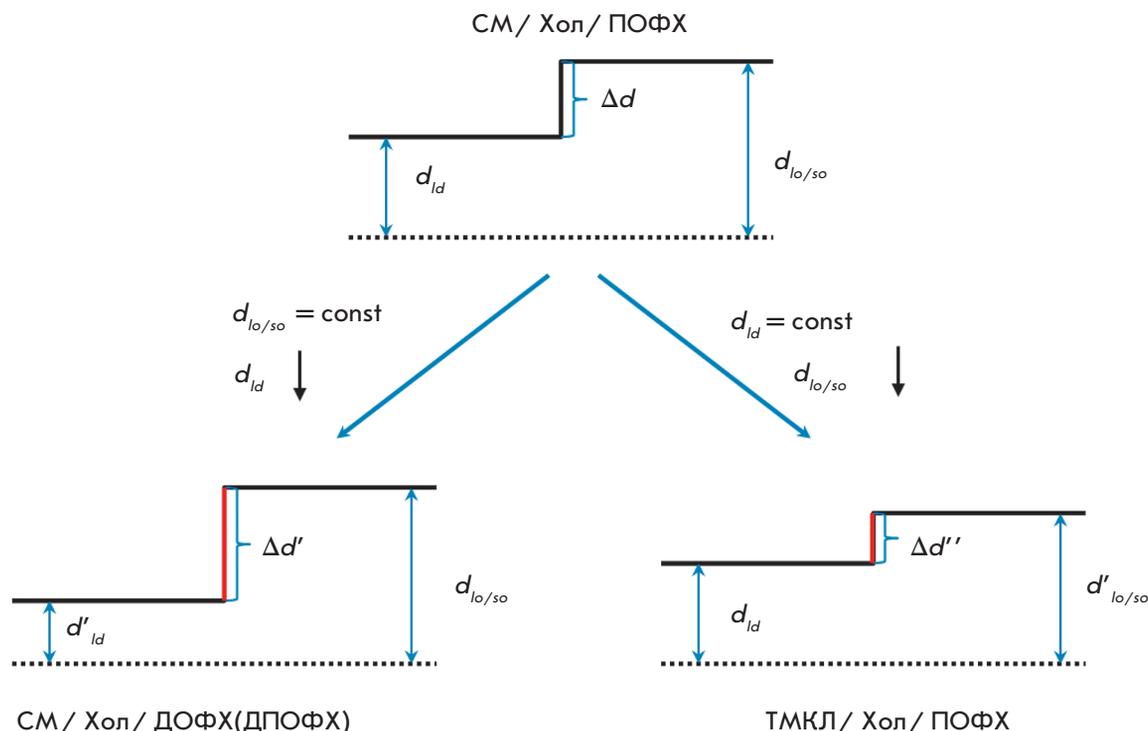


Рис. 2. Схематическое изображение величины несоответствия (Δd) между толщиной углеводородного остова мембраны в упорядоченном ($d_{lo/so}$) и неупорядоченном состоянии (d_{ld}) в зависимости от липидного состава бислоя. Пунктирная линия отмечает центр бислоя, сплошная – границу между полярной и неполярной областями мембраны

В результате формирования границ между упорядоченными и неупорядоченными доменами, предполагающее экспонирование части гидрофобного региона водному раствору, становится чрезвычайно невыгодным, и число липосом, характеризующихся выраженной фазовой сегрегацией, падает. Сходный вывод можно сделать, анализируя результаты, представленные на нижней панели рис. 1, которая показывает результаты исследования фазового разделения в мембранах, включающих тетрамиростилкардиолипид (ТМКЛ; 40 мол. %), Хол (20 мол. %) и различные легкоплавкие фосфолипиды (40 мол. %). Можно заметить, что все ТМКЛ-содержащие липосомы независимо от вида легкоплавкого липида характеризуются фазовым разделением (отсутствуют гомогенно окрашенные маркером липосомы, включающие ТМКЛ). Различия между представленными липидными системами заключаются в процентном соотношении везикул, включающих l_o - и s_o -домены. Как отмечено выше, среди протестированных фосфолипидов l_d -фазу с наименьшей толщиной образует ДПОФХ, что соответствует наибольшей величине Δd , а следовательно, наибольшей энергии формирования упорядоченных доменов. Поэтому липосомы, включающие этот фосфолипид, характеризуются

менее выраженной фазовой сегрегацией ($82 \pm 7\%$ имеют l_o -домены) по сравнению с везикулами, содержащими ПОФХ и ДПОФХ, которые формируют l_d -фазы с большей толщиной и меньшим значением Δd , в результате чего наблюдается фазовое разделение большинства липосом ($85 \pm 9\%$ и $87 \pm 8\%$ соответственно) по типу l_d/s_o .

Сравнение сценариев фазового поведения систем, включающих различные тугоплавкие липиды, также указывает на ключевую роль величины Δd в регуляции латеральной гетерогенности трехкомпонентных мембран. На рис. 1Б (нижняя панель) приведены микрофотографии ТМКЛ-содержащих липосом, включающих различные легкоплавкие фосфолипиды. На рис. 1А видно, что замена в мембранообразующей смеси СМ на ТМКЛ приводит к усилению фазовой сегрегации мембран. В случае ПОФХ- (левый столбец) и ДПОФХ-содержащих бислоев (центральный столбец) увеличивается доля липосом с s_o -доменами, а в случае мембран, включающих ДПОФХ, статистически значимо растет число везикул с l_o -областями (правый столбец). Это обусловлено уменьшением толщины упорядоченной фазы при замене СМ на ТМКЛ, снижением разницы Δd (рис. 2, правая часть) и соответствующим падением

А

Липидный состав везикул (40/20/40 мол. %)	Дипольный модификатор					
	Флоретин	Флорицин	Кверцетин	Мирицетин	RH 421	RH 237
СМ/ Хол/ ПОФХ*	72 ± 11 % 28 ± 12 %	64 ± 12 % 30 ± 10 % 6 ± 3 %	67 ± 7 % 28 ± 8 % 5 ± 3 %	68 ± 13 % 26 ± 14 % 6 ± 3 %	64 ± 13 % 36 ± 12 %	61 ± 9 % 39 ± 9 %
СМ/ Хол/ ДОФХ	69 ± 12 % 31 ± 8 %	45 ± 10 % 43 ± 14 % 12 ± 6 %	45 ± 10 % 30 ± 14 % 25 ± 5 %	49 ± 11 % 28 ± 5 % 23 ± 13 %	44 ± 8 % 47 ± 12 % 9 ± 3 %	45 ± 13 % 47 ± 10 % 8 ± 4 %
СМ/ Хол/ ДПОФХ	93 ± 6 % 7 ± 4 %	96 ± 6 % 4 ± 4 %	86 ± 10 % 14 ± 6 %	89 ± 8 % 11 ± 5 %	95 ± 5 % 5 ± 4 %	96 ± 4 % 4 ± 4 %

Б

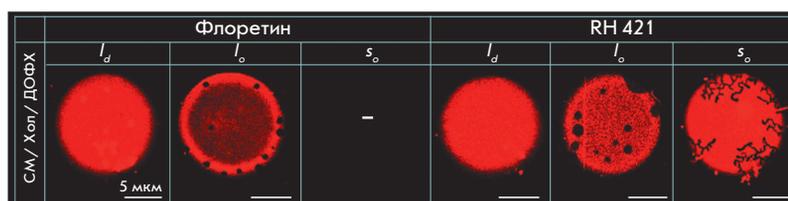


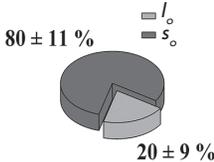
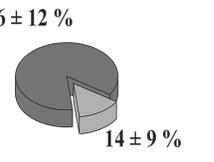
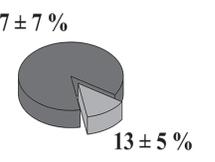
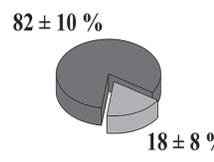
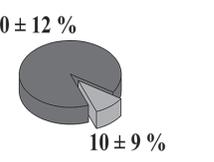
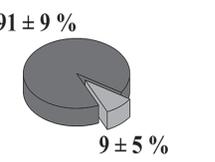
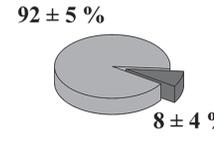
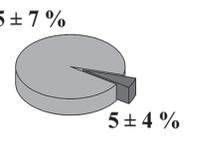
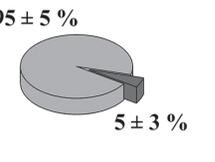
Рис. 3. Круговые диаграммы, показывающие вероятные сценарии фазового разделения в мембранах липосом из смеси сфингомиелина (СМ, 40 мол. %) с холестерином (Хол, 20 мол. %) и различными фосфолипидами (ПОФХ, ДОФХ или ДПОФХ) (40 мол. %) в присутствии дипольных модификаторов (400 мкМ флавоноидов, флоретина, флорицина, кверцетина и мирицетина или 10 мкМ стирилпиридиновых красителей, RH 421 и RH 237) (А), и микрофотографии СМ/Хол/ДОФХ-липосом с тем или иным типом фазового разделения в бислое (l_d , l_o , s_o) в присутствии флоретина и RH 421 (Б). * – Данные взяты из [19]

энергии образования границ упорядоченных доменов. Таким образом, представленные на рис. 1 результаты позволяют связывать сценарий латеральной гетерогенности трехкомпонентных мембран с величиной несоответствия толщины мембраны в упорядоченном и неупорядоченном состоянии: чем меньше Δd , тем сильнее фазовое разделение в бислое.

Учитывая данные о влиянии дипольных модификаторов мембран не только на дипольный потенциал, но и на упаковку мембранообразующих липидов [24–27], мы предположили, что эти агенты способны изменять сценарий фазовой сегрегации. Ранее нами было изучено действие дипольных модификаторов: флоретина, флорицина, кверцетина, мирицетина, RH 421 и RH 237, на сценарий фазового разделения в СМ/Хол/ПОФХ-везикулах [19]. Результаты представлены на рис. 3А (верхняя панель). Видно, что все использованные модификаторы вызывают ослабление фазовой сегрегации мембран, выражающееся в уменьшении доли липосом с гелевыми доменами. При этом при введении флоретина, кверцетина или мирицетина уменьшение числа везикул

с s_o -доменами сопровождается соответствующим ростом процентного содержания гомогенно окрашенных липосом на 40–45%, а в присутствии флорицина, RH 421 и RH 237 – как увеличением доли везикул с l_o -доменами приблизительно на 30–35%, так и незначительным ростом содержания гомогенных липосом (на 5–10%). Наблюдаемый рост относительного числа гомогенно окрашенных ДОФХ-содержащих липосом в присутствии флоретина, флорицина, RH 421 и RH 237 (на 10–30%) и полное исчезновение везикул с s_o -доменами в случае флоретина можно интерпретировать как ослабление фазовой сегрегации мембран после введения дипольных модификаторов, так же как и в случае ПОФХ (рис. 3А, средняя панель). Примеры микрофотографий липидных везикул, включающих ДОФХ, Хол и СМ и показывающих тот или иной сценарий фазовой сегрегации бислоя (l_d , l_o , s_o) в присутствии флоретина и RH 421, представлены на рис. 3Б. Статистически значимых различий в изменении сценария фазовой сегрегации ДОФХ-содержащих мембран в присутствии кверцетина и мирицетина не выявлено.

А

Липидный состав везикул (40/20/40 мол. %)	Дипольный модификатор		
	Флоретин	RH 421	RH 237
ТМКЛ/Хол/ПОФХ			
ТМКЛ/Хол/ДОФХ			
ТМКЛ/Хол/ДПОФХ			

Б

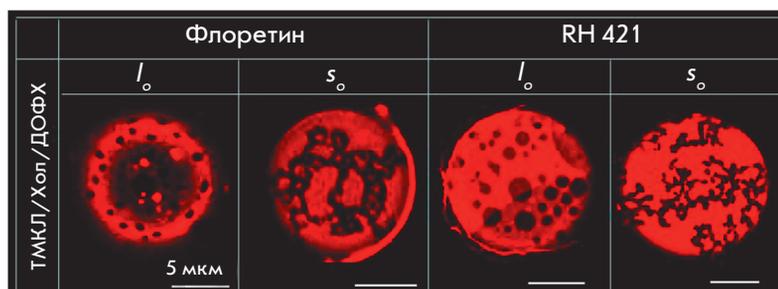


Рис. 4. Круговые диаграммы вероятных сценариев фазового разделения в мембранах липосом из смеси тетра-миристоилкардиолипина (ТМКЛ, 40 мол. %) с холестерином (Хол, 20 мол. %) и различными фосфолипидами (ПОФХ, ДОФХ или ДПОФХ) (40 мол. %) в присутствии дипольных модификаторов (400 мкМ флоретина или 10 мкМ стирилпиридиновых красителей, RH 421 и RH 237) (А) и микрофотографии ТМКЛ/Хол/ДОФХ-везикул, показывающих фазовое разделение по типу l_o/l_o или l_o/s_o и модифицированных флоретином или RH 421 (Б)

Трансформация сценария фазового разделения СМ-содержащих мембран в присутствии модификаторов может быть обусловлена увеличением величины Δd под действием тестируемых агентов. Наиболее вероятным вариантом развития событий является увеличение площади, занимаемой полярными головками мембранообразующих липидов, вызванное погружением модифицирующих агентов в липидный бислой и диполь-дипольным взаимодействием их молекул. Это приведет к относительному росту под-

вижности углеводородных цепей и вызовет падение температуры плавления липидов, показанное методами дифференциальной сканирующей микрокалориметрии [18, 25, 28]. Подобному «более текучему» состоянию липидов в мембране соответствует меньшая толщина бислоя. В таком случае выраженность эффекта модификатора будет зависеть от формы и гидрофобности его молекул, определяющих глубину погружения агента в бислой. По этой причине наиболее сильное воздействие на латеральную гете-

рогенность мембран оказывает относительно гидрофобный флоретин, в то время как эффекты его более гидрофильных аналогов, гликозида флоридина и высокогидроксилированных флавонолов, кверцетина и мирицетина, менее выражены. Длины молекул стирилпиридиновых красителей, RH 421 и RH 237, достаточно для почти полного пронизывания липидного монослоя, а увеличение площади, приходящейся на одну молекулу липида в мембране, обусловлено, главным образом, электростатическим отталкиванием сульфогрупп молекул красителей, локализованных в полярной области бислоя [27].

Помимо типа модификатора, регуляторную роль играют также геометрические характеристики молекул липидов, образующих фазу, куда встраиваются модифицирующие соединения. В случае липидов, имеющих близкую к цилиндрической форму, ДПОФХ, ПОФХ и СМ [29–31] можно ожидать более выраженного «разжижения» l_d -областей по сравнению с упорядоченными доменами, поскольку встраивание модификаторов в последние области должно быть затруднено ввиду более плотной упаковки липидов. Такой сценарий соответствует случаю, схематически изображенному на левой части рис. 2.

Как видно на нижней панели рис. 3А, в случае ДПОФХ-содержащих мембран не выявлено статистически значимых различий паттернов фазового разделения до и после введения тестируемых модификаторов. Учитывая, что преобладающее число везикул, включающих ДПОФХ, не характеризуется фазовой сегрегацией даже в отсутствие диполь-модифицирующих агентов вследствие наибольшей среди изучаемых липидных систем величины несоответствия толщины мембраны в упорядоченном и неупорядоченном состоянии, дальнейший рост Δd не приводит к значимым изменениям особенностей фазового разделения в бислоях.

В отличие от СМ, ТМКЛ имеет форму инвертированного конуса, что обуславливает отрицательную спонтанную кривизну образуемых им монослоев [32]. По всей вероятности, это облегчает встраивание модификаторов, молекулы которых имеют коническую форму, в упорядоченную фазу, обогащенную ТМКЛ. Одновременное «разжижение» как неупорядоченных l_d -областей, так и упорядоченных доменов не приведет к существенному изменению скачка толщины на границе раздела липидных фаз, а следовательно, изменения сценария фазовой сегрегации под действием модификаторов наблюдаться не будут. На рис. 4А можно видеть, что независимо от вида легкоплавкого фосфолипиды, входящего в состав модельных мембран, в присутствии дипольных модификаторов не происходит достоверного увеличения относительного числа ТМКЛ-содержащих липосом с l_o -доменами или появления везикул, не демонстрирующих видимого фазового разделения. Микрофотографии липидных везикул, включающих ДПОФХ, Хол и ТМКЛ и модифицированных флоретином или RH 421, представлены на рис. 4Б.

Таким образом, полученные нами результаты указывают на ключевую роль величины несоответствия толщины мембраны в упорядоченном и неупорядоченном состоянии в регуляции фазового разделения в трехкомпонентных модельных мембранах, а также открывают новые перспективы использования дипольных модификаторов для направленного видоизменения сценария латеральной гетерогенности липидных бислоев. ●

*Работа выполнена за счет гранта Российского
научного фонда (проект № 14-14-00565-П).*

*С.С. Ефимова удостоена стипендии Президента
РФ (СП-69.2015.4).*

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Cevc G. // Chem. Phys. Lipids. 1991. V. 57. P. 293–307.
2. Almeida P.F., Vaz W.L., Thompson T.E. // Biophys. J. 1993. V. 64. P. 399–412.
3. Aresta-Branco F., Cordeiro A.M., Marinho H.S., Cyrne L., Antunes F., de Almeida R.F. // J. Biol. Chem. 2011. V. 286. P. 5043–5054.
4. Brown D. // Int. J. Med. Microbiol. 2002. V. 291. P. 433–437.
5. Simons K., Ikonen E. // Nature. 1997. V. 387. P. 569–572.
6. Simons K., Toomre D. // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2000. V. 1. P. 31–39.
7. Tsui-Pierchala B.A., Encinas M., Milbrandt J., Johnson E.M. // Trends Neurosci. 2002. V. 25. P. 412–417.
8. Pierce S.K. // Nat. Rev. Immunol. 2002. V. 2. P. 96–105.
9. Van Laethem F., Leo O. // Curr. Mol. Med. 2002. V. 2. P. 557–570.
10. Morgan M.J., Kim Y.S., Liu Z. // Antioxid. Redox. Signal. 2007. V. 9. P. 1471–1483.
11. Jury E.C., Flores-Borja F., Kabouridis P.S. // Semin. Cell Dev. Biol. 2007. V. 18. P. 608–615.
12. Yoshizaki F., Nakayama H., Iwahara C., Takamori K., Ogawa H., Iwabuchi K. // Biochim. Biophys. Acta. 2008. V. 1780. P. 383–392.
13. Fulop T., Le Page A., Garneau H., Azimi N., Baehl S., Dupuis G., Pawelec G., Larbi A. // Longev. Healthspan. 2012. V. 1. P. 6.
14. Head B.P., Patel H.H., Insel P.A. // Biochim. Biophys. Acta. 2014. V. 1838. P. 532–545.
15. Ratajczak M.Z., Adamiak M. // Leukemia. 2015. V. 29. P. 1452–1457.
16. Farnoud A.M., Toledo A.M., Konopka J.B., Del Poeta M., London E. // Curr. Top. Membr. 2015. V. 75. P. 233–268.
17. Wesolowska O., Michalak K., Jadwiga Maniewska J., Hendrich A.B. // Acta Biochim. Pol. 2009. V. 56. P. 33–39.
18. Ostroumova O.S., Chulkov E.G., Stepanenko O.V., Schagina L.V. // Chem. Phys. Lipids. 2014. V. 178. P. 77–83.
19. Efimova S.S., Malev V.V., Ostroumova O.S. // J. Membr. Biol. 2016. V. 279. P. 97–106.
20. Juhasz J., Davis J.H., Sharom F.J. // Biochem. J. 2010. V. 430. P. 415–423.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

21. Muddana H.S., Chiang H.H., Butler P.J. // *Biophys. J.* 2012. V. 102. P. 489–497.
22. García-Sáez A.J., Chiantia S., Schwille P. // *J. Biol. Chem.* 2007. V. 282. P. 33537–33544.
23. Heberle F.A., Petruzielo R.S., Pan J., Drazba P., Kucerka N., Standaert R.F., Feigenson G.W., Katsaras J. // *J. Am. Chem. Soc.* 2013. V. 135. P. 6853–6859.
24. Cseh R., Hetzer M., Wolf K., Kraus J., Bringmann G., Benz R. // *Eur. Biophys. J.* 2000. V. 29. P. 172–183.
25. Tarahovsky Y.S., Muzafarov E.N., Kim Y.A. // *Mol. Cell Biochem.* 2008. V. 314. P. 65–71.
26. Ollila F., Halling K., Vuorela P., Vuorela H., Slotte J.P. // *Arch. Biochem. Biophys.* 2002. V. 399. P. 103–108.
27. Apetrei A., Mereuta L., Luchian T. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2009. V. 1790. P. 809–816.
28. Cseh R., Benz R. // *Biophys. J.* 1999. V. 77. P. 1477–1488.
29. Sakuma Y., Taniguchi T., Imai M. // *Biophys. J.* 2010. V. 99. P. 472–479.
30. Bezrukov S.M. // *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 2000. V. 5. P. 237–243.
31. Byström T., Lindblom G. // *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* 2003. V. 59. P. 2191–2195.
32. Powell G.L., Hui S.W. // *Biophys. J.* 1996. V. 70. P. 1402–1406.