

## СТРУКТУРООБРАЗОВАНИЕ В НИЗКОКОНЦЕНТРИРОВАННЫХ РАСТВОРАХ ХОЛЕСТЕРОЛА И ЭРГОСТЕРОЛА

© 2016 г. М.Г. Михалева, Д.В. Зленко\*, В.А. Твердислов\*\*, С.В. Стывбун

*Институт химической физики им. Н.Н. Семенова РАН, 119991, Москва, ул. Косыгина, 4;*

*\*Биологический факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Ленинские горы, 1/12;*

*\*\*Физический факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Ленинские горы, 1/2*

*E-mail: wawe@bk.ru*

Поступила в редакцию 17.12.15 г.

Методом молекулярной динамики исследовано конформационное поведение биологически важных хиральных молекул холестерина и эргостерола. Экспериментально обнаружено формирование струн в растворе холестерина в метаноле и их отсутствие в растворах эргостерола в метаноле. Показано, что внутримолекулярная динамика молекулы существенным образом сказывается на возможности структурообразования. Предложено альтернативное объяснение функциональной значимости холестерина, по-видимому, связанное с образованием коммутационных структур за пределами мембраны как биологической целесообразностью нахождения эргостерола в некоммутирующих клетках грибов и холестерина в коммутирующих клетках макроорганизмов.

*Ключевые слова: хиральность, холестерол, эргостерол, структурообразование, коммутация.*

Проблема межклеточной коммутации, возникновения нового контакта между ранее не связанными клетками одного организма или клетками различных организмов, на современном уровне развития биологии рассматривается, как правило, сквозь призму специфического взаимного узнавания на уровне молекул белков. В то же время в основе этого процесса на ранних этапах развития живой материи должны были лежать более общие физико-химические механизмы структурообразования, такие как диффузия и агрегация молекул в анизометрические структуры. При этом нами было показано, что рост анизометрических структур эффективнее диффузии при коммутации на больших расстояниях (порядка микрона и более) [1]. В частности, для первичного установления контакта, коммутации между клетками необходимо формирование между ними как минимум квазиодномерного мостика, наподобие, например, F-пилей современных бактерий [2]. Отметим, что в добелковую эру такие образования должны были формироваться без участия белковых молекул. Однако в современном, высокоорганизованном органическом мире наблюдать такую небелковую коммутацию достаточно сложно ввиду того, что белки в процессе эволюции

приняли на себя исполнение практически всех клеточных функций.

Поиск первичных механизмов межклеточной коммутации следовало бы начать со сравнения клеток, активно коммутирующих между собой, таких, как клетки животных с клетками, практически не нуждающимися в такой коммутации. В качестве примера последних хорошо подходят клетки грибов, практически не коммутирующие между собой в силу особой топологии их соматического тела (мицелия), представленного переплетением ветвящихся, но практически не сливающихся, апикально нарастающих клеточных нитей (гиф) [3]. Поскольку коммутация как таковая по определению начинается с контакта между поверхностями клетки, то и физические различия, определяющие способность или неспособность к коммутации должны в первую очередь затрагивать поверхность клеток. Последняя, в случае коммутирующих клеток, должна быть способна образовывать достаточно длинные и тонкие выросты (анизометрические структуры), подобные уже упомянутому бактериальным пиялам, но имеющие небелковую природу. Пример подобной коммутации описан в литературе. Так, клетки некоторых раковых линий млекопитающих используют для коммутации с соседями раз-

личные анизометрические структуры, в том числе мембранные нанотрубки [4]. Отметим, что в случае клеток гриба в качестве активной поверхности клетки следует рассматривать скорее клеточную мембрану, а не инертную и не способную к заметным структурным перестройкам клеточную стенку.

Известно, что многие химически различные хиральные соединения при низких концентрациях  $\sim 10^{-3}$ – $10^{-2}$  М в растворах формируют гели [5–7]. При этом, например, для хиральных трифторацетилованных аминок спиртов в их гелях и ксерогелях наблюдаются супрамолекулярные анизометрические структуры, струны. Струны обладают очень большим отношением длины к диаметру ( $10^2$ – $10^3$ ), при диаметре  $\sim 1$  мкм [8,9] и с физической точки зрения могут служить прообразом или моделью структур, которые могли бы обеспечивать первичную коммутацию клеток.

Известно, что плазматические мембраны животных и растительных клеток содержат в качестве значимого компонента холестерол, в то время как в клеточных мембранах грибов присутствует эргостерол. Стероиды обеспечивают необходимую текучесть плазматических мембран в широком диапазоне температур и играют роль модификатора (пластификатора) бислоя, придавая ему определенную жесткость за счет увеличения плотности упаковки молекул [10]. В то же самое время указанное различие в химическом строении плазматических мембран, вероятно, связано со способностью клеток к коммутации и принципиально различной пространственной организацией тела животных и грибов.

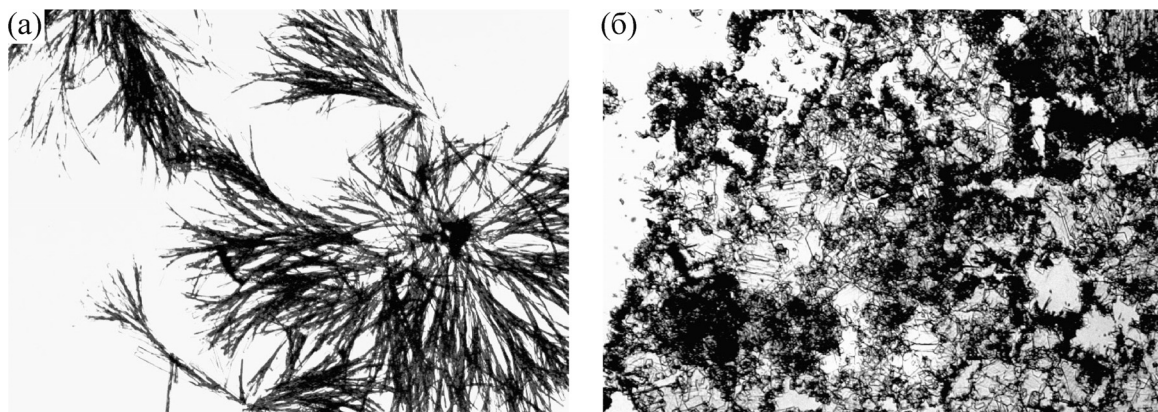
Полученные нами экспериментальные результаты указывают на существенные различия в свойствах холестерола и эргостерола. Мы обнаружили, что в высыхающих в растворах холестерола в метаноле формируются анизометрические структуры, в то время как в растворах эргостерола они отсутствуют. Это свидетельствует о том, что холестерол потенциально способен выступать в качестве основы для коммутационных межклеточных тяжей, в то время как эргостерол не подходит на эту роль. Таким образом, целью данной работы было экспериментальное обнаружение различий в способности к спонтанному образованию супрамолекулярных анизометрических структур в растворах холестерола и эргостерола, а также теоретическое описание возможных причин возникновения наблюдаемых различий с использованием методов молекулярного моделирования.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

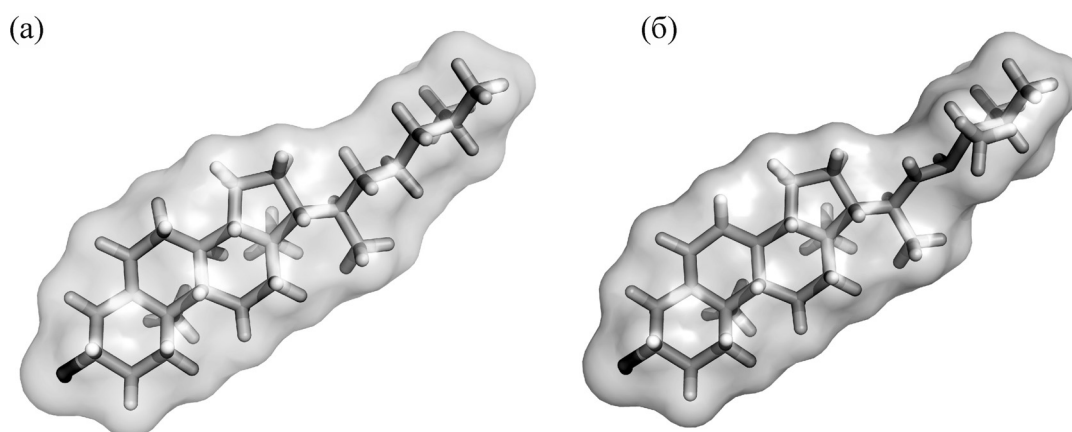
**Оптическая микроскопия.** Для получения изображений в проходящем свете ( $\times 40$  –  $\times 400$ ) был использован оптический микроскоп производства Carl Zeiss Jena (Германия). Были исследованы растворы холестерола и эргостерола с концентрациями 4 мг/мл. В качестве растворителя использовали метанол. Для получения ксерогеля каплю раствора наносили на гладкое предметное стекло и дожидались полного испарения растворителя. Сформировавшиеся после испарения растворителя ксерогели помещали для исследования на столик микроскопа. Исследования проводили при температуре 20–25°C.

**Методы расчета.** Расчеты методом молекулярной динамики были проведены при помощи пакета программ GROMACS 4.5.5 [11] в сочетании с силовым полем OPLS-AA [12]. В основе моделей молекул эргостерола и холестерола лежали стандартные для силового поля OPLSAA типы атомов. В качестве уравнений движения были использованы уравнения стохастической динамики. Шаг интегрирования во всех расчетах составлял 1 фс. Все расчеты проведены в вакууме, в периодических граничных условиях, при 300 К. Для каждой молекулы был проведен 1 мкс расчет молекулярной динамики.

**Анализ конформационной подвижности.** Рассматривали поведение только хиральной части молекул холестерола и эргостерола. Это связано с тем, что ахиральные низкомолекулярные соединения не способны в концентрациях ниже перколяционного порога к формированию супрамолекулярных гелей, содержащих анизометрические элементы, такие как, например, струны [13]. В работе исследовали внутреннюю динамику или конформационные переходы хирального домена, состоящего из трех шестичленных и одного пятичленного кольца, так как именно наличие колец может обеспечить формирование анизометрической супрамолекулярной стопки [14]. Конформационные переходы в данном случае представляют собой короткие прыжки из основного состояния и быстрое возвращение обратно. Конформация основного состояния шестичленного кольца – «кресло», пятичленного – «конверт» [15]. Для идентификации переходов из «кресла» мы рассматривали знаки последовательных торсионных углов между атомами углерода шестичленного кольца. В основном состоянии знаки этих углов чередуются, а, например, в конформации «ванна» эти двугранные углы имеют один и тот же знак. Конформация «конверт» для циклопентанового кольца характеризуется двумя



**Рис. 1.** Микрофотографии ксерогелей холестерина и эргостерола. Ксерогель холестерина (а) состоит из анизометрических структур, в то время как в ксерогеле эргостерола (б) такие структуры не наблюдаются.



**Рис. 2.** Пространственные структуры молекул холестерина (а) и эргостерола (б). Показаны ван-дер-ваальсовы поверхности. Хорошо видно, что пространственные структуры молекул очень похожи.

последовательными двугранными углами одного знака, которые маркируют выведенный из плоскости кольца атомом углерода. Соответственно смену атома, выведенного из плоскости, отождествляли с конформационным переходом.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При исследовании ксерогелей низкоконцентрированных ( $10^{-2}$  М и менее) растворов холестерина и эргостерола было установлено, что при комнатной температуре ( $23^{\circ}\text{C}$ ) наблюдается формирование супрамолекулярных анизометрических структур в ксерогелях холестерина в метаноле (рис. 1а), в то время как в ксерогелях эргостерола в метаноле такие структуры не наблюдаются (рис. 1б). Супрамолекулярная природа данных структур определяется тем, что при нагревании ксерогеля до  $50^{\circ}\text{C}$  происходит полное и обратимое плавление этих структур.

В данном случае метанол, по-видимому можно рассматривать как биомиметик, который играет роль модельной текучей гидрофобно-гидрофильной фазы, соответствующей межклеточной жидкости.

Как видно (рис. 1), несмотря на кажущиеся незначительные различия в молекулярной массе и структуре холестерина и эргостерола, существуют различия в способности образования ими анизометрических структур. Хорошо известно [13], что такие анизометрические структурные элементы образуются хиральными низкомолекулярными соединениями в процессах самосборки в различных органических и водных средах. Вполне вероятно, что данный механизм самосборки справедлив и в отношении холестерина.

Действительно, из представленных ван-дер-ваальсовых поверхностей молекул (рис. 2) видно, что структурные различия не являются визуально определяемым признаком. Во всяком

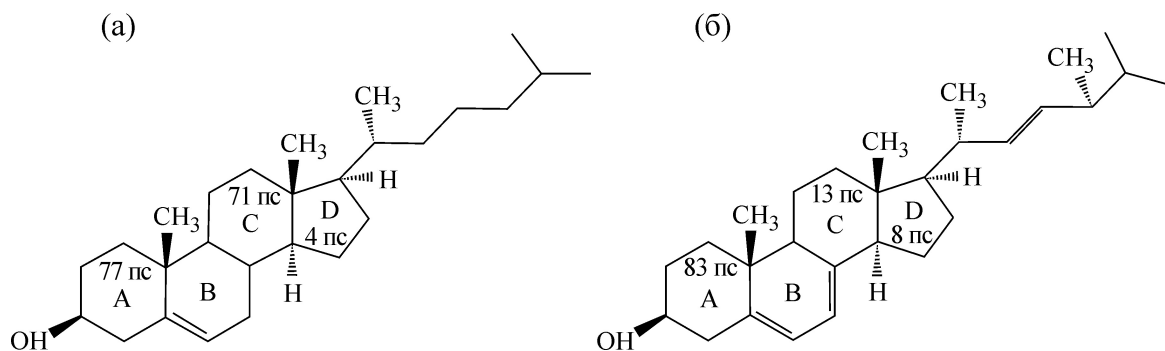


Рис. 3. Структурные формулы холестерина (а) и эргостерола (б). Числами обозначены времена жизни колец в основном состоянии, рассчитанные по данным молекулярной динамики.

случае такие физико-геометрические признаки молекул, как анизотропия и характерные размеры, практически совпадают (рис. 2).

Наблюдаемые особенности образования анизометрических структур в ксерогелях эргостерола (рис. 1б) и холестерина (рис. 1а) могут быть связаны с различиями в ориентирующем диполь-дипольном взаимодействии. Для оценки этого фактора методом молекулярной динамики [16] было смоделировано поведение этих соединений в вакууме на протяжении 1 мкс, и для всех конформаций каждой молекулы на протяжении этого времени были вычислены дипольные моменты. Дипольный момент эргостерола составил  $2,5 \pm 0,3$  Д, дипольный момент холестерина равен  $2,4 \pm 0,2$  Д. Рассчитанные величины дипольных моментов с учетом погрешности практически не отличаются друг от друга. Следовательно, дальнедействующее диполь-дипольное взаимодействие молекул вряд ли могло привести к существенным различиям в характере их агрегации и структурообразовании. В то же время ван-дер-ваальсовы силы, имеющие близкодествующий и поэтому поверхностный характер, очевидно, очень чувствительны к малым несоответствиям формы поверхностей контактирующих молекул.

С учетом вышесказанного, мы пришли к выводу о принципиальной роли внутримолекулярной подвижности, определяющей пространственное соответствие молекул, а значит, и различия в характере структурообразования. Для этого была рассмотрена конформационная динамика циклической части молекул (см. выше). Молекула эргостерола, по сравнению с молекулой холестерина, содержит две дополнительные двойные связи, одна из которых локализована в кольце В молекулы (рис. 3).

Двойная связь в кольце В холестерина существенным образом сказывается на многообразии доступных конформаций циклогексано-

вого кольца, которое в этом случае следует рассматривать как циклогексен. При этом  $sp^2$ -атомы образуют плоскость, в пределах которой располагаются четыре из шести атомов углерода кольца. Два оставшихся атома углерода оказываются выведенными за пределы плоскости, что соответствует конформации «полукресло» циклогексана. Соответственно, в такой системе возможен конформационный переход, в ходе которого вынесенные из плоскости кольца атомы углерода меняются относительно нее своими положениями.

Появление второй двойной связи (что соответствует 1,3-циклогексадиену) существенно не влияет на разнообразие конформаций, доступных для кольца В эргостерола. Так, несмотря на формальное расширение плоскости, задаваемой  $sp^2$ -атомами, два из шести атомов остаются тетраэдрическими и не могут располагаться в плоскости. Таким образом, состояние циклогексадиенового кольца В в молекуле эргостерола также описывается конформацией «полукресло», но напряженной стерически. В этой системе также можно ожидать обменные переходы  $sp^3$ -атомов относительно плоскости кольца. В этом смысле состояние кольца В для холестерина и эргостерола является конформационно близкими.

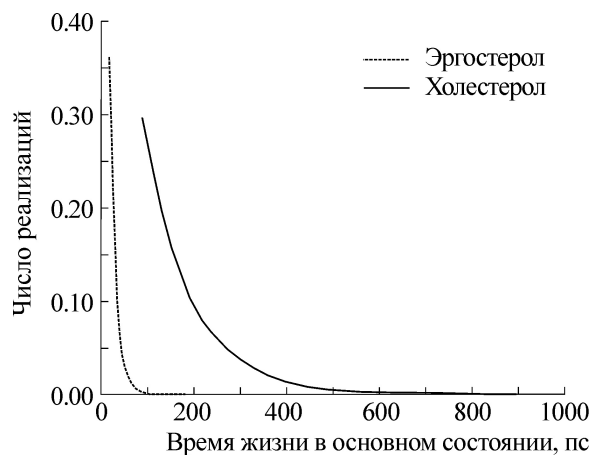
Кольца А и С как молекулы холестерина, так и эргостерола (рис. 3), в принципе могут принимать любую из четырех возможных конформаций, характерных для циклогексана [15]. При этом мы рассматривали только две из них, конформации типа «кресла» и «ванны», переходы между которыми и отслеживали. Четвертое пятичленное кольцо D обеих молекул может находиться в двух альтернативных конформациях – «конверт» и описанное выше «полукресло», переходы между которыми и рассматривались.

На рис. 4 приведены распределения по временам жизни кольца С в основном состоянии для молекул холестерина и эргостерола. Приведенная на рис. 4 зависимость отражает динамику распада основного состояния, как классической реакции первого порядка. Экспоненциальная аппроксимация этих кривых позволяет оценить время жизни молекул в основном состоянии. Время жизни кольца С молекул холестерина и эргостерола в основном состоянии составляет 71 и 13 пс соответственно. Оценим соответствие характеристических времен внутримолекулярной подвижности и времени вращательной корреляции молекул холестерина и эргостерола с помощью уравнения Стокса–Эйнштейна–Дебая:

$$t = \frac{V\eta}{k_B T} = 100 \text{ пс}, \quad (1)$$

где  $V$  – объем молекулы,  $\eta$  – вязкость среды,  $k_B$  – постоянная Больцмана,  $T$  – температура. С учетом близости размеров их ван-дер-ваальсовых моделей радиусы в выражении (1) имеют близкую величину, а сами значения  $t$  практически совпадают. Учитывая характерные времена жизни кольца С в основном состоянии, можно оценить долю молекул, в которых кольцо С просуществовало в основном состоянии порядка или более времени вращательной корреляции. Для холестерина этот показатель ( $\sim 0,24$ ) больше, чем для эргостерола ( $\sim 5 \cdot 10^{-4}$ ) в  $10^3$  раз, что фактически означает, что кольцо С эргостерола практически не удерживается в основном состоянии в течение периода времени, который требуется молекуле для разворота. В то же время доля таких молекул холестерина составляет почти 24%. Поведение колец А для холестерина и эргостерола практически не отличается, так как их времена жизни в основном состоянии (77 и 83 пс) близки к времени вращательно корреляции. Времена жизни в основном состоянии колец D (4 и 8 пс соответственно для холестерина и эргостерола) много меньше времени вращательной релаксации. Такое высокочастотное «дребезжание», скорее всего, должно сильно снижать величину дисперсионного взаимодействия в парах молекул как холестерина, так и эргостерола.

Таким образом, мы наблюдаем различие в конформационной динамике молекул холестерина и эргостерола в области характеристических времен, близких к времени вращательной корреляции, которое, очевидно, приводит к различному поатомному соответствию ван-дер-ваальсовых поверхностей молекул или, иными



**Рис. 4.** Время жизни кольца С (рис. 3) молекул холестерина и эргостерола в основном состоянии. Хорошо видно, что кольцо С холестерина существенно менее подвижно, чем кольцо С эргостерола. Времена жизни молекул в основном состоянии составили 71 и 13 пс для холестерина и эргостерола соответственно.

словами, различной степени комплементарности молекул в парах.

Образование анизометричных, устойчивых при комнатной температуре супрамолекулярных конструкций возможно только если молекулы образующего их вещества комплементарно связываются друг с другом. Вероятнее всего, подстройка пары молекул с образованием комплементарного соответствия между ними возможна тогда, когда время жизни в основном состоянии сравнимо или больше, чем время вращательной корреляции молекулы как целого. При этом за счет вращательной подвижности возникает комплементарное соответствие фиксированных внутримолекулярных конфигураций, которое обеспечивает максимальную величину дисперсионных и кулоновских межмолекулярных взаимодействий. Присоединение к паре каждой следующей молекулы, по-видимому, приводит к формированию супрамолекулярной анизометрической стопки, являющейся зародышем струны. В спектре длительности жизни основного состояния молекулы эргостерола присутствует составляющая, отвечающая срединному домену (рис. 3), у которого значимое число реализаций в течение 1 мкс существенно меньше времени вращательной релаксации и составляет 100 пс (рис. 4). Это, по всей видимости, делает маловероятным образование таких пар и соответственно стопок, а в дальнейшем анизометрических структур из молекул эргостерола. Действительно, высокая частота изменения его конформации с амплитудой не менее  $\sim 1\text{--}3 \text{ \AA}$  («дребезжание»), оче-

видно, затрудняет реализацию состояния соответствия короткодействующих дисперсионных сил, энергия которых убывает пропорционально шестой степени расстояния (как поле взаимно наведенных диполей). Это означает, что для нейтральных хиральных молекул с малым атомным парциальным зарядом вклад дисперсионных сил в межмолекулярное взаимодействие при образовании их пар и стопок оказывается решающим. Из этого следует, что в холестероле образуется хиральный домен (кольца А, В, С) с характеристическим временем внутримолекулярной динамики, соответствующим времени вращательной корреляции молекулы, что позволяет рассматривать его в качестве элемента комплементарной сборки при формировании анизотрического зародыша струны. Наличие такого домена, по-видимому, определяет характер структур в растворах холестерола и их отсутствие в растворах эргостерола, а также роль данных молекул в составе мембраны.

Таким образом, наблюдаемые различия во внутримолекулярной подвижности и особенно структуреобразования в ксерогелях могут указывать на различия в функциях, выполняемых эргостеролом и холестеролом в плазматических мембранах клеток животных и грибов. По всей видимости, мы наблюдаем две альтернативные эволюционные ветви, в одной из которых клетки изначально были способны к активной коммутации вследствие присутствия в их мембранах холестерола, а в другой клетки не имели такой возможности. Активная коммутация клеток животных позволяет им формировать макроскопические трехмерные каркасы таким образом, что в них каждая клетка связана с любой другой клеткой бесконечно большим количеством возможных путей при посредничестве других клеток. При этом гифы грибов формально можно описать как решетку Бете, в которой каждая клетка соединена или коммутирует только с конечным числом соседей [17]. Более того, число этих соседей редко превышает три, и, как правило, это клетки, образовавшиеся путем митотического деления из единой клетки-предшественницы. Отметим, что сделанные выводы позволяют объяснить отсутствие настоящих тканей у всех, даже самых высокоорганизованных представителей царства грибов, в то время как тела высокоорганизованных растений и животных имеют тканевое строение. В настоящих тканях животных и растений две клетки могут быть связаны бесконечным числом путей, что принципиально отличает топологию строения настоящих тканей от топологии мицелия.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Экспериментально показано, что ксерогели холестерола содержат анизотрические супрамолекулярные структуры, которых нет в ксерогелях эргостерола.

Методом молекулярной динамики определены дипольные моменты и спектры времен жизни основного состояния хиральных доменов молекул. Показано, что общая форма и дипольный момент молекул эргостерола и холестерола не различаются. В то же время время жизни ядра молекулы холестерола в основном состоянии существенно превышает аналогичный показатель в молекул эргостерола, а также превышает время вращательной корреляции молекулы как целого. Это дает общее объяснение наблюдаемым различиям, так как образование комплементарных пар возможно только в случае, если время жизни в основном состоянии сопоставимо или больше времени вращательной релаксации молекулы.

Обнаруженные различия в структуре холестерола и эргостерола позволяют постулировать функциональное различие между холестеролом и эргостеролом. Холестерол потенциально способен образовывать анизотрические структуры и обеспечивать коммутацию клеток животных и растений, в то время как клетки грибов были изначально лишены такой способности. Указанное различие объясняет отсутствие у представителей царства грибы настоящих тканей и уникальную топологию тела грибов, представленного мицелием. Последний можно рассматривать как решетку Бете, в отличие от компактных и намного более тесно связанных тел представителей других двух царств многоклеточных.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. S. V. Stovbun, A. I. Mikhailov, A. A. Skoblin, et al., *Rus. J. Phys. Chem.* В 6 (1), 60 (2012).
2. T. Proft and E. N. Baker, *Cell Mol. Life Sci.* 66 (4), 613 (2009).
3. Д. Саттон, М. Ринальди и А. Фотергилл, *Определитель патогенных и условно патогенных грибов* (Мир, М., 2001).
4. J. H. Zhang, et al., *China Life Sci.* 56 (11), 995 (2013).
5. P. Terech, V. Rodriguez, J. D. Barnes, and G. B. McKenna, *Langmuir* 10 (10), 3406 (1994).
6. O. Lebel, M.-E. Perron, Th. Maris, et al., *Chem. Mater.* 18, 3616 (2006).
7. A. R. Borges, M. Hyacinth, M. Lum, et al., *Langmuir* 24, 7421 (2008).
8. D. V. Zlenko and S. V. Stovbun, *Rus. J. Phys. Chem.* В 8 (5), 613 (2014).

9. S. V. Stovbun, A. A. Skoblin, and A. M. Zanin, *Rus. J. Phys. Chem. B* **8** (3), 302 (2014).
10. Р. Геннис, *Биомембраны: Молекулярная структура и функции* (Мир, М., 1997).
11. S. Pronk, S. Paul, R. Schutz, et al., *Bioinformatics* **29** (7), 845 (2013).
12. W.L. Jorgensen, D. S. Maxwell, and J. Tirado-Rives, *J. Amer. Chem. Soc.* **118** (45), 11225 (1996).
13. R. G. Weiss and P. Terech, *Molecular Gels. Materials with Self-Assembled Fibrillar Springer* (Dordrecht, The Netherlands, 2006).
14. М. Клеман и О. Д. Лаврентович, *Основы физики частично упорядоченных сред: жидкие кристаллы, коллоиды, фрактальные структуры, полимеры и биологические объекты* (ФизМатЛит, М., 2007).
15. E. V. Anslyn and D. A. Dougherty, *Modern Physical Organic Chemistry* (University Science Books, USA, 2006).
16. D. V. Zlenko and S. V. Stovbun, *Rus. J. Phys. Chem. B* **8** (4), 499 (2014).
17. H. A. Bethe, *Proc. Roy. Soc. Lond. Ser. A* **150**, 552 (1935).

## Gelation in Low Concentrated Solutions of Cholesterol and Ergosterol

M.G. Mihaleva\*, D.V. Zlenko\*\*, V.A. Tverdislov\*\*\*, and S.V. Stovbun\*

\**Semenov Institute of Chemical Physics, Russian Academy of Sciences, ul. Kosygina 4, Moscow, 119991 Russia*

\*\**Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Leninskie Gory 1/12, Moscow, 119991 Russia*

\*\*\**Faculty of Physics, Lomonosov Moscow State University, Leninskie Gory 1/2, Moscow, 119991 Russia*

The molecular dynamics method has been applied to investigate the conformational behavior of biologically important chiral molecules of cholesterol and ergosterol. The formation of strings in the solution of cholesterol in methanol and the lack of strings in solutions of ergosterol in methanol has been experimentally detected. It was shown that the intermolecular dynamics in the molecule has a significant impact on the potential of structure formation. We proposed alternative explanation of the functional significance of cholesterol, apparently associated with the formation of interconnect structures outside the membrane as the biological feasibility of finding ergosterol in non-switched cells of fungi and cholesterol in the switching cells of macro organisms.

*Key words: chirality, cholesterol, ergosterol, gelation, switching*