

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ИНСТИТУТ ФИЗИЧЕСКОЙ ХИМИИ И ЭЛЕКТРОХИМИИ ИМ.
А.Н.ФРУМКИНА РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

На правах рукописи

КОНДРАШОВ ОЛЕГ ВАСИЛЬЕВИЧ

ТЕОРЕТИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ БЕЛКОВ И
НАНОДОМЕНОВ КЛЕТОЧНЫХ МЕМБРАН, ОПОСРЕДОВАННОГО
ДЕФОРМАЦИЯМИ ЛИПИДНОГО БИСЛОЯ

01.04.02 — Теоретическая физика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата физико-математических наук

Научный руководитель:

Кандидат физико-математических наук

Акимов Сергей Александрович

Москва 2019

Работа прошла апробацию в Институте физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина Российской академии наук

Научный руководитель:

Акимов Сергей Александрович,
кандидат физико-математических наук,
старший научный сотрудник
лаборатории биоэлектрохимии ИФХЭ РАН

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук.

Защита состоится 25.12.2019 в 11:00 на заседании диссертационного совета ЛФИ.01.04.02.002 по адресу: 141701, Московская область, г. Долгопрудный, Институтский переулок д. 9.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Московского физико-технического института (национального исследовательского университета) <https://mipt.ru/education/post-graduate/soiskateli-fiziko-matematicheskie-nauki.php>

Работа представлена «04» октября 2019 г. в Аттестационную комиссию федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)» для рассмотрения советом по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, доктора наук в соответствии с п.3.1 ст. 4 Федерального закона «О науке и государственной научно-технической политике».

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Введение. Актуальность проблемы

Клеточные биологические мембраны задействованы в процессах жизнедеятельности клеток. Клетки являются открытыми неравновесными системами, для которых крайне важно создание и поддержание градиентов концентраций и электрохимических потенциалов. Эти градиенты поддерживаются во многом за счет чрезвычайно низкой проницаемости клеточных мембран для различных веществ. Таким образом, основная функция мембран в клетках — барьерная. Повреждение мембраны каким-либо способом приводит к невозможности выполнения мембраной своей барьерной функции, что, как правило, вызывает гибель клеток. Одним из самых распространенных типов повреждений липидной мембраны является образование мембранных пор — сквозных проводящих дефектов. Поры могут образовываться как при внешних воздействиях: механическом, электрическом, посредством лазерного излучения и т.д., так и индуцироваться различными белками и пептидами. Образование пор в липидном матриксе, с одной стороны, может вести к патологиям, а с другой стороны, порообразование можно использовать для создания антимикробных препаратов новых типов, способных контролируемо, селективно создавать поры в клетках патогенных бактерий. Создание антимикробных препаратов в настоящее время особенно актуально: проблема резистентности к антибиотикам, согласно данным Всемирной организации здравоохранения, является одной из наиболее серьезных угроз для здоровья и продовольственной безопасности человечества. Все больше опасных инфекционных заболеваний, таких как туберкулез и малярия, становится труднее лечить; растут смертность, сроки госпитализации и медицинские расходы. Возможным решением проблемы является создание и использование антибиотиков новых типов, в частности пептидных. Перспективными кандидатами на эту роль считаются амфипатические пептиды,

которые сочетают в составе одной молекулы гидрофобные и гидрофильные участки. Такие пептиды могут способствовать образованию пор в мембранах бактерий. Однако детали механизма образования пор в мембранах при участии амфипатических пептидов до сих пор остаются неизвестными. Также неизвестно каким именно образом амфипатические пептиды взаимодействуют друг с другом и другими мембранными включениями. Под включениями мы понимаем любые неоднородности в составе мембран: белки, пептиды, участки монослоя специфического липидного состава, поры и т.д. Понятно, что взаимодействия можно разделить на специфические, т.е. зависящие от наличия конкретных химических групп в составе включения, и неспецифические, обусловленные индуцированными деформациями окружающей липидной мембраны. В результате взаимодействия мембранные включения могут кластеризоваться, накапливаться в областях мембраны с определенными свойствами, в частности внутри или на границе доменов жидко-упорядоченной фазы, называемых «рафтами». Исследование деталей взаимодействия мембранных включений различной природы является необходимым шагом для понимания механизма пептид-стимулированного открытия мембранной поры и возможности управляемого воздействия на липидную мембрану на наноуровне.

Цель работы заключается в теоретическом исследовании взаимодействия мембранных включений различной природы, опосредованного деформациями липидного бислоя.

Для достижения цели работы были поставлены **задачи**:

1. Построить математическую модель, описывающую взаимодействие мембранных включений различной природы посредством возникающих в их окрестности деформаций липидной мембраны;

2. Рассчитать зависимость физических характеристик взаимодействия модельных пептидов и сравнить их с имеющимися экспериментальными данными;
3. Рассчитать энергию взаимодействия модельных пептидов в случае их нахождения в одном и разном монослоях как функцию расстояния между ними;
4. Рассчитать энергию взаимодействия коротких амфипатических пептидов в зависимости от их взаимного расположения и ориентации;
5. Рассчитать энергию взаимодействия различных типов мембранных включений с границей жидко-упорядоченного липидного домена;
6. Теоретически обосновать бислойность доменов жидко-упорядоченной фазы, наблюдаемую экспериментально, получить условия, необходимые для существования бислойного рафта.

Научная новизна

Впервые была теоретически получена энергия взаимодействия мембранных включений для случая их произвольного расположения на примере мономеров грамицидина, а также амфипатических пептидов.

На основе полученных профилей энергии впервые было обосновано одномерное приближение для расчета энергии взаимодействия включений.

В рамках одномерного приближения впервые были рассчитаны энергии взаимодействия мембранных включений и границы рафта и получены конфигурации, соответствующие минимуму энергии.

Впервые были определены условия бислойности доменов жидко-упорядоченной фазы в липидной мембране.

Теоретическая и практическая значимости.

Разработанная теория позволяет предсказывать поведение мембранных включений и может быть использована для создания пептидных антибиотиков, мембранных каналов или иных искусственных мембранных включений с заданными свойствами. Построенная теория также является основой для моделирования процесса возникновения мембранной поры в присутствии пептидных антибиотиков.

Личный вклад автора.

Основные результаты диссертации были получены лично автором. Основные положения диссертации были опубликованы в соавторстве с научным руководителем и коллективом лаборатории биоэлектрохимии ИФХЭ РАН, при этом вклад диссертанта был определяющим.

Положения, выносимые на защиту:

1. Разработана единая теория, предсказывающая характер взаимодействия мембранных включений, опосредованного деформациями мембраны;
2. В рамках разработанной теории вычислены физически наблюдаемые величины, определяющиеся характеристиками профиля энергии взаимодействия, для случая грамицидина. Полученные результаты согласуются с экспериментальными данными;
3. Вычислены энергии взаимодействия амфипатических пептидов в случае их произвольного относительного расположения;
4. Вычислены энергии взаимодействия мембранных включений с границей рафта. Найдены положения включений, соответствующие минимуму энергии;
5. Определены условия бислойности доменов жидко-упорядоченной фазы в липидной мембране.

Апробация результатов работы

Результаты работ, включенные в диссертацию, докладывались на следующих конференциях и семинарах: Annual Meeting of American Biophysical Society 2018, Biomembranes 2018, ФИЗИКОХИМИЯ 2018, ФИЗИКОХИМИЯ 2017, семинар лаборатории биоэлектрохимии.

Основное содержание работы изложено в 3 статьях в рецензируемых научных журналах и 4 тезисах докладов на конференциях.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении обоснована актуальность проводимых исследований, сформулированы цель, задачи и положения работы, выносимые на защиту.

В первой главе представлен обзор литературы по тематике диссертации. Первая часть первой главы посвящена обзору имеющихся экспериментальных фактов о липидных мембранах и возможных типах мембранных включений, таких как мембранные белки различной природы, поры и домены упорядоченной фазы («рафты»). Подробно описан каждый тип мембранного включения, приведены данные экспериментальных работ. Особо отмечена роль мембранных включений в осуществлении проницаемости мембраны, пассивной и активной. Пристальное внимание уделено описанию грамицидина — пептида, формирующего ионный канал при трансмембранной димеризации. Приведены имеющиеся экспериментальные данные касательно роли амфипатических пептидов в образовании мембранных пор.

Вторая часть первой главы посвящена обзору теоретических методов описания липидных мембран и деформаций, возникающих в них. Последовательно излагаются различные теоретические подходы: начало теории упругости жидких кристаллов, заложенное в работе Франка, обобщение его

методов применительно к липидным мембранам в работе Хельфриха, в которой мембрана рассматривается как бесконечно тонкая бесструктурная пленка, и теория липидных мембран, разработанная Хаммом и Козловым, учитывающим наличие у мембраны конечной толщины и внутренней структуры, что сводится к введению дополнительной деформации — наклона углеводородных цепей («хвостов») липидов относительно нормали к поверхности мембраны, и к учету локальной несжимаемости липидного монослоя.

Вторая глава посвящена построению модели деформаций липидной мембраны, возникающих вблизи мембранных включений. Сформулированы и обоснованы базовые предположения модели: представление липидной мембраны в качестве сплошной среды, локальная объемная несжимаемость элемента монослоя и соответствие плоской мембраны основному состоянию системы. В работе рассматриваются только малые деформации, а энергия вычисляется во втором порядке по ним.

В работе используется функционал свободной энергии Хамма-Козлова в приближении «локальной текучести», т.е. с учетом дополнительного вклада, пропорционального квадрату ротора вектора наклона:

$$\begin{aligned}
 W = & \int dS_u \left(\frac{B}{2} (\operatorname{div} \mathbf{n}_u + J_u)^2 - \frac{B}{2} J_u^2 + \frac{K_t}{2} (\mathbf{n}_u - \mathbf{grad} H_u)^2 + \frac{\sigma_u}{2} (\mathbf{grad} H_u)^2 + \right. \\
 & \left. + \frac{K_a}{2h^2} \left(h - \frac{h^2}{2} \operatorname{div} \mathbf{n}_u + M - H_u \right)^2 + K_G K_u + \frac{K_{\text{rot}}}{2} (\operatorname{rot} \mathbf{n}_u)^2 \right) + \\
 & + \int dS_d \left(\frac{B}{2} (\operatorname{div} \mathbf{n}_d + J_d)^2 - \frac{B}{2} J_d^2 + \frac{K_t}{2} (\mathbf{n}_d + \mathbf{grad} H_d)^2 + \frac{\sigma_d}{2} (\mathbf{grad} H_d)^2 + \right. \\
 & \left. + \frac{K_a}{2h^2} \left(h - \frac{h^2}{2} \operatorname{div} \mathbf{n}_d - M + H_d \right)^2 + K_G K_d + \frac{K_{\text{rot}}}{2} (\operatorname{rot} \mathbf{n}_d)^2 \right),
 \end{aligned} \tag{1}$$

где B — модуль поперечного изгиба, \mathbf{n} — директор, единичный вектор, характеризующий среднюю ориентацию хвостов липидных молекул, J —

спонтанная кривизна липида, K_t — модуль наклона, H — функция, характеризующая форму поверхности монослоя, σ — внешнее латеральное натяжение, K_a — модуль латерального растяжения/сжатия, h — равновесная толщина липидного монослоя в недеформированном состоянии, M — функция, характеризующая форму межмонослойной поверхности, K_G — модуль гауссовой кривизны, K — гауссова кривизна, K_{rot} — модуль роторного вклада. Все модули относятся к липидному монослою. Индексами « u » и « d » обозначены величины, относящиеся к верхнему и нижнему монослоям, соответственно. Интегрирование в первом и втором интегралах ведется по поверхности верхнего и нижнего монослоев, соответственно. Функционал (1) дополняется специфическими граничными условиями вблизи мембранного включения, а также общими условиями на бесконечности:

$$\mathbf{n}_{d,u}(\infty) = (0, 0, \pm 1), \quad M(\infty) = 0, \quad H_u(\infty) = h, \quad H_d(\infty) = -h. \quad (2)$$

Третья глава посвящена применению развитой во второй главе теории для описания взаимодействия мономеров грамицидина, обусловленного перекрыванием деформаций мембраны, возникающих вблизи каждого мономера. В первой части третьей главы рассматриваются конфигурации мономеров грамицидина, обладающие вращательной симметрией:

1. Уединенный мономер грамицидина в одном из монослоев мембраны
2. *Пара* мономеров — два мономера грамицидина в разных монослоях мембраны, расположенные коаксиально один над другим
3. Проводящий *димер* — два мономера, приведенные в контакт на межмонослойной поверхности за счет энергии образующихся водородных связей

Для мономеров грамицидина используются граничные условия в виде:

$$n_n(r=r_0) = (n_0)_n = -\frac{h-h_p}{\sqrt{(h-h_p)^2 + h_p^2}},$$

$$n_\tau(r=r_0) = (n_0)_\tau = 0,$$
(3)

где n_n и n_τ — нормальные и тангенциальные компоненты директора соответствующего монослоя на границе пептида, r_0 — радиус пептида, принятый равным 1 нм, h_p — длина гидрофобного участка пептида. Стоит отметить, что величина граничного директора определяется различными взаимодействиями пептида с липидным окружением, поэтому граничные условия (3) носят скорее качественный, оценочный характер. В случае димера ставились следующие граничные условия:

$$H_u(r=r_0) - M(r=r_0) = h_p,$$

$$M(r=r_0) - H_d(r=r_0) = h_p.$$
(4)

Наличие вращательной симметрии позволяет решить уравнения Эйлера-Лагранжа функционала (1) с граничными условиями (2-4) аналитически, однако получающиеся решения слишком громоздки и не приводятся.

Во второй части третьей главы приводятся результаты расчетов деформаций в случае симметричных конфигураций. Для получения количественных результатов использовались величины упругих модулей, характерные для диолеоилфосфатидилхолина, т.е. $B = 10 k_B T$ ($T = 300$ К), $K_t = 40$ мН/м, $K_a = 120$ мН/м, $h = 1,45$ нм, $a_0 = 0,65$ нм², $K_G = -3 k_B T$; $\sigma_0 = 0,1$ мН/м, $J_u = J_d = J_0 = 0$, если не указано иное.

На Рисунке 1 показана зависимость энергетического барьера формирования проводящего состояния $\Delta E_{form} = W_{pair} - 2W_{monomer}$ от приложенного внешнего латерального натяжения, рассчитанная в рамках разработанной модели (пунктирная кривая), и результаты аппроксимации экспериментальных данных работы [1].

В работе [2] время жизни проводящего состояния канала было измерено в зависимости от толщины липидного бислоя. Бислой был сформирован из достаточно «необычных» липидов (монопальмитолеин ($C_{16:1}$), моноолеин ($C_{18:1}$) и моноэйкозеноин ($C_{20:1}$)), для которых неизвестны упругие постоянные. Для сравнения с экспериментальными данными рассчитаны соответствующие энергии упругих деформаций для липидов $C_{16:1}$ ($h = 1,3$ нм), $C_{18:1}$ ($h = 1,45$ нм) и $C_{20:1}$ ($h = 1,6$ нм), в предположении, что упругие модули незначительно зависят от длины углеводородной цепи от 16 до 20 атомов углерода, а спонтанная кривизна линейно зависит от длины цепи. Используемые значения спонтанных кривизн равны $J_{C_{16:1}} = 0,08$ нм $^{-1}$, $J_{C_{18:1}} = 0,06$ нм $^{-1}$ и $J_{C_{20:1}} = 0,04$ нм $^{-1}$.

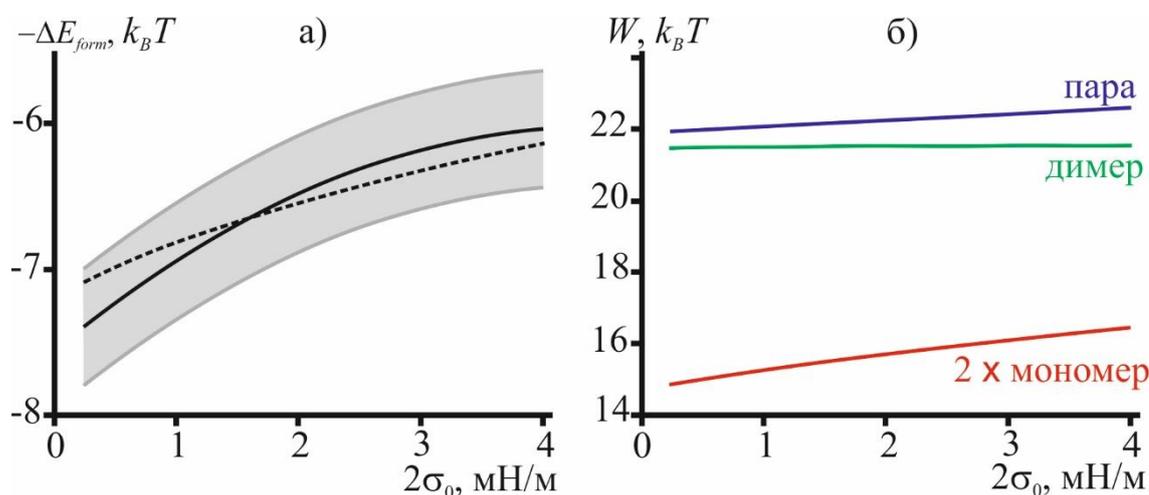


Рисунок 1. Зависимость энергетического барьера формирования проводящего состояния грамицидина (а) и энергии деформаций мембраны, состоящей из диолеилфосфатидилхолина (б) от внешнего латерального натяжения (пунктирная кривая — расчет, сплошная черная кривая и серая область — экспериментальные данные)

Поскольку димеризация грамицидина обеспечивается за счет шести водородных связей, образующихся между мономерами в противоположных монослоях, а энергия этих связей не зависит от упругих свойств липидного окружения, то она может рассматриваться как постоянная (отрицательная) добавка к полной энергии димера. Таким образом, энергетический барьер $\Delta E_{decay} = W_{pair} - W_{dimer}$ также может быть определен лишь с точностью до некоторой константы. На Рисунке 2 показана зависимость энергетического барьера процесса распада проводящего

состояния канала и энергии симметричных конфигураций как функции равновесной толщины мембраны.

Рассмотрена зависимость энергий симметричных конфигураций молекул грамицидина от спонтанной кривизны липидного монослоя. Показано, что вклад спонтанной кривизны в энергию деформаций для случая пары мономеров и двух бесконечно удаленных мономеров одинаков и равен $2W_S^{monomer} = -2\pi r_0 B J_0(n_d(r_0) + n_u(r_0)) = \text{const}$. Таким образом, предсказано, что энергетический барьер формирования проводящего состояния не зависит от спонтанной кривизны.

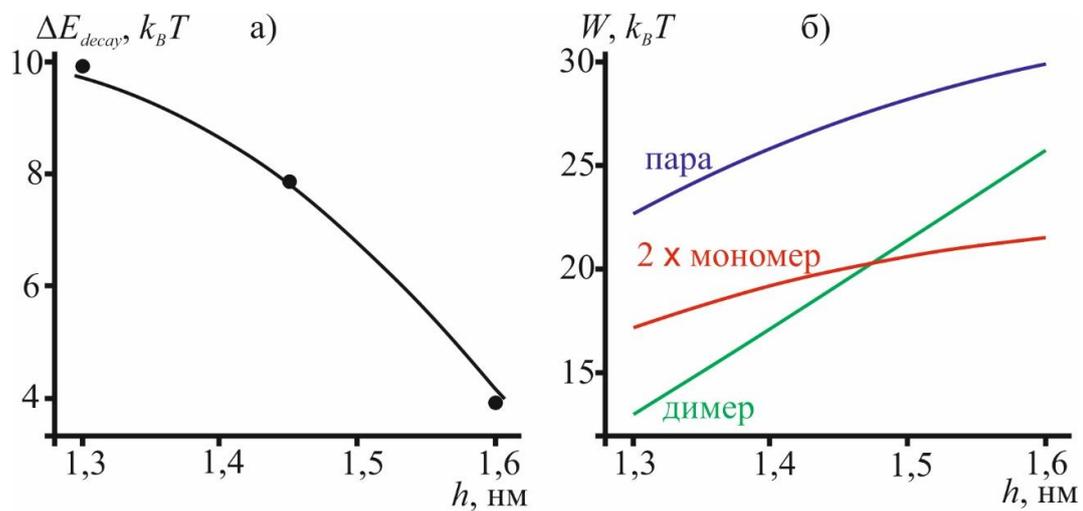


Рисунок 2. Зависимости энергетического барьера процесса распада проводящего состояния канала (а) и энергии симметричных конфигураций молекул грамицидина (б) от равновесной толщины липидного монослоя. Черные точки — экспериментальные данные [2], черная кривая — результаты расчетов

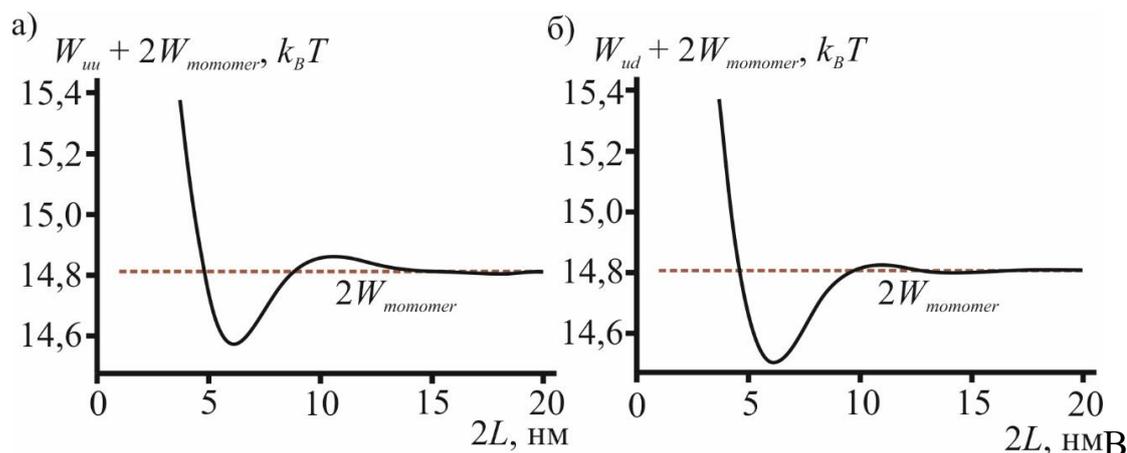


Рисунок 3. Зависимость энергии упругих деформаций мембраны от расстояния между мономерами грамицидина: а) мономеры расположены в одном монослое, б) мономеры расположены в разных монослоях

В третьей части второй главы рассмотрено взаимодействие двух мономеров грамицидина в конфигурациях, не обладающих вращательной симметрией. С использованием метода конечных элементов проведена численная минимизация функционала (1) с граничными условиями (2-3). Полученные энергии деформаций представлены на Рисунке 3.

В конце третьей главы приводится оценка критической концентрации $C_{crit} = 0,025 \text{ нм}^{-2}$, при достижении которой наличие взаимодействия может существенно повлиять (замедлить) на диффузию грамицидина, что является возможным объяснением того, что проводимость мембраны сохраняется в течение десятков минут в работе [3]; в отсутствие взаимодействия проводимость должна была бы исчезнуть в течение десятков секунд.

Четвертая глава диссертации посвящена рассмотрению взаимодействия амфипатических пептидов. Путем минимизации функционала (1) в одномерном приближении аналитически получено распределение деформаций мембраны и их энергия. С использованием численного метода минимизации, описанного в главе 2, решена задача о взаимодействии амфипатических пептидов конечного размера

в случае их произвольного положения друг относительно друга (используемые обозначения приведены на Рисунке 4).

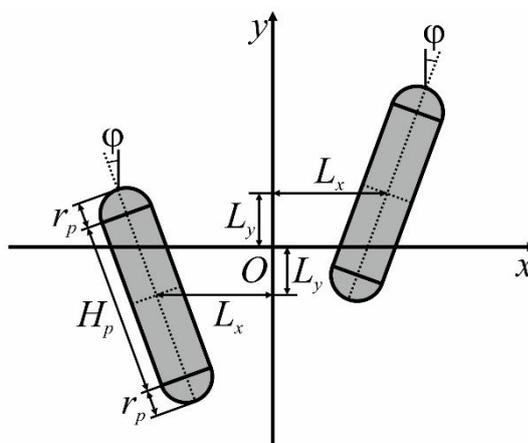


Рисунок 4. Форма границ амфипатических пептидов на поверхности липидного монослоя и используемые обозначения

Был выполнен расчет энергии механических деформаций бислоя, индуцированный двумя амфипатическими пептидами длиной $L_p = 5$ нм, находящимися в одном липидном монослое. Анализ был произведен на конфигурациях пептидов, определяемых величинами $\{L_x, L_y, \phi\}$ при следующих значениях: $L_x = \{1,5; 1,75; 2; 2,25; 2,5; 2,75; 3; 3,25; 3,5; 3,75; 4; 4,25; 4,5; 4,75; 5; 5,25; 5,5; 6; 6,5; 7; 8; 9; 10\}$ нм; $L_y = \{0; 1; 2; 3; 4; 5\}$ нм; $\phi = \{0; \pi/6; \pi/4; \pi/3; \pi/2\}$. Согласно полученным результатам, минимальной энергией обладает конфигурация $L_x = 3$ нм, $L_y = 0$, $\phi = 0$, т.е. конфигурация, соответствующая параллельным пептидам, расстояние между осями которых равно $2L_x = 6$ нм. Соответствующая энергия составила $6,28 k_B T$. При рассмотрении параллельных конфигураций пептидов ($\phi = 0$) было выяснено, что относительный сдвиг пептидов вдоль их осей, т.е. изменение L_y при фиксированном L_x , существенно изменяет энергию деформаций лишь при $|L_y| < 4$ нм. При $L_y \approx 4$ нм энергия деформаций близка к энергии бесконечно удаленных друг от друга пептидов $W_0 = 6,4 k_B T$ и мало изменяется при дальнейшем увеличении L_y (Рисунок 5).

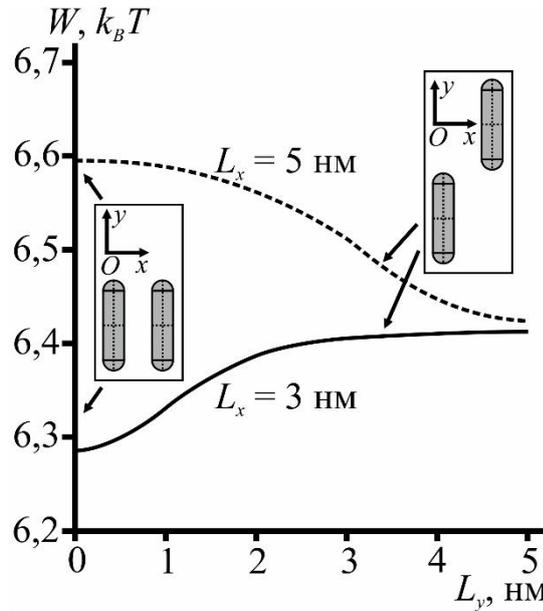


Рисунок 5. Зависимость энергии деформаций мембраны от половины относительного смещения параллельных пептидов вдоль их осей, L_y

Это позволило сформулировать гипотезу о применимости одномерного приближения для описания взаимодействия мембранных включений. Была рассмотрена аппроксимация полученных численно результатов аналитическими расчетами в рамках одномерного приближения, т.е. точная энергия взаимодействия $W(L_p, L_x)$ приближалась аппроксимирующей функцией $W_{app}(L_{eff}, L_x)$ вида:

$$W_{app}(L_{eff}, L_x) = L_{eff} W_{1D}(L_x) + \varepsilon_0, \quad (5)$$

где L_{eff} имеет смысл эффективной длины «одномерного» пептида, и, в общем случае, является некоторой функцией длины пептида L_p , а ε_0 — константа, предполагаемая одинаковой для всех значений L_p . Зависимость энергии деформаций мембраны $W(L_p, L_x)$ в случае параллельных пептидов ($L_y = 0, \varphi = 0$) в зависимости от расстояния L_x между ними и полной длины пептида L_p , а также результаты, полученные в рамках одномерного приближения, показаны на Рисунке 6. Аналогичным образом рассмотрены сдвинутые конфигурации

(Рисунок 7) и конфигурации пептидов, оси которых образуют угол $2\varphi \neq 0$ (Рисунок 8).

Приведенные численные результаты и их сравнение с аналитическими расчетами в одномерном приближении показывают, что взаимодействие между амфипатическими пептидами, находящимися в различных геометрических конфигурациях, может быть описано при помощи одномерного приближения при правильном выборе эффективной длины L_{eff} . Для трехмерных объектов похожее утверждение было получено Дерягиным для быстро (экспоненциально) спадающих потенциалов взаимодействия.

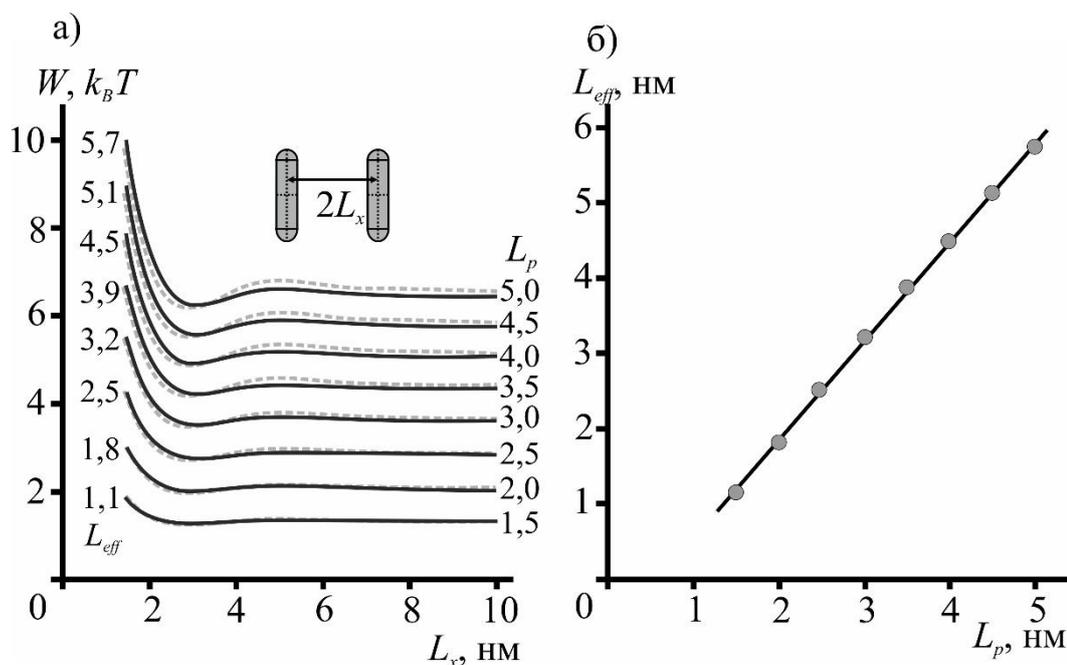


Рисунок 6. Энергия деформаций мембраны в случае параллельных пептидов различной длины: а) зависимость энергии деформаций мембраны от половины расстояния между пептидами L_x , справа отмечены соответствующие длины пептидов L_p , слева — рассчитанные в одномерном приближении длины L_{eff} , б) Зависимость рассчитанной эффективной длины L_{eff} от длины пептида L_p , точками обозначены рассчитанные значения, линией — линейная аппроксимация этих значений

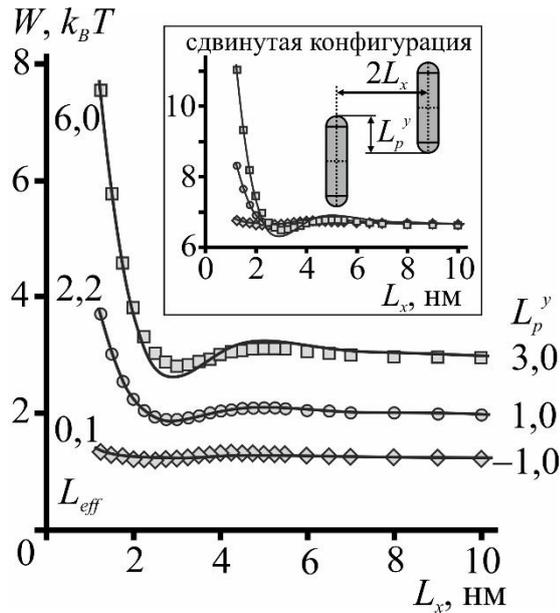


Рисунок 7. Зависимость энергии деформаций мембраны от половины расстояния между осями параллельных пептидов L_x , для случая разных сдвигов вдоль их осей. Справа отмечено соответствующее перекрытие проекций, L_p^y , а слева — рассчитанная в рамках одномерного приближения эффективная длина. Расчетные значения обозначены точками, линии графиков соответствуют одномерному приближению

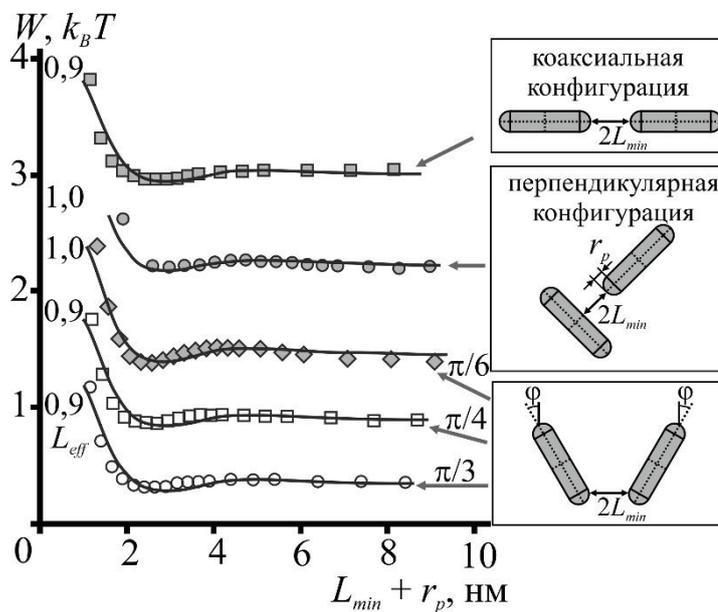


Рисунок 8. Зависимость энергии деформаций мембраны от половины расстояния между пептидами для различных конфигураций. Расчетные значения обозначены точками, графики соответствуют одномерному приближению

Пятая глава посвящена рассмотрению взаимодействия мембранных включений различной природы с границей макроскопического рафта. Известно, что рафт можно описывать посредством функционала (1), используя другие упругие постоянные и учитывая непрерывность директора и нейтральных поверхностей на границе рафта с окружающей мембраной. Даже в отсутствие мембранного включения граница рафта не является симметричной: считая, что $B_r = 20 k_B T$, $B_s = 10 k_B T$, $h_r = 1,8$ нм, $h_s = 1,3$ нм, $\sigma = 0,025 k_B T/\text{нм}^2$, $K_{tr} = K_{ts} = K_t = 40$ мН/м, $K_{ar} = K_{as} = K_a = 120$ мН/м, где индексом «r» и «s» обозначены параметры, соответствующие рафтовой и нерафтовой области, соответственно, показано, что относительный сдвиг границы рафта в монослоях составляет $L_0 = \pm 3$ нм.

Рассмотрены различные типы мембранных включений: липидное включение, представляющее собой участок монослоя с параметрами, отличными от параметров рафтовой и нерафтовой фаз, амфипатический пептид и трансмембранное включение. Вычисления проводились в обоснованном ранее одномерном приближении; считалось, что все мембранные включения имеют ширину $\Delta L = 1,3$ нм, что примерно соответствует диаметру альфа-спирали. На Рисунке 9 показана зависимость упругой энергии мембраны с липидным включением с упругими характеристиками $B_0 = B_s$, $J_0 = 0$ и различных значениях равновесной толщины включения $h_0 = 1,3; 1,55; 1,8$ нм в зависимости от положения центра включения X_0 относительно границы рафта в нижнем монослое. Показано, что независимо от знака $L = \pm 3$ нм, тонкие ($h_0 = h_s$) и толстые ($h_0 = h_r$) липидные включения преимущественно распределяются в фазу с соответствующей толщиной. В случае включения промежуточной толщины имеется два минимума упругой энергии примерно одинаковой глубины $0,17 k_B T/\text{нм}$. Аналогичный расчет выполнен также для случая ненулевой спонтанной кривизны включения.

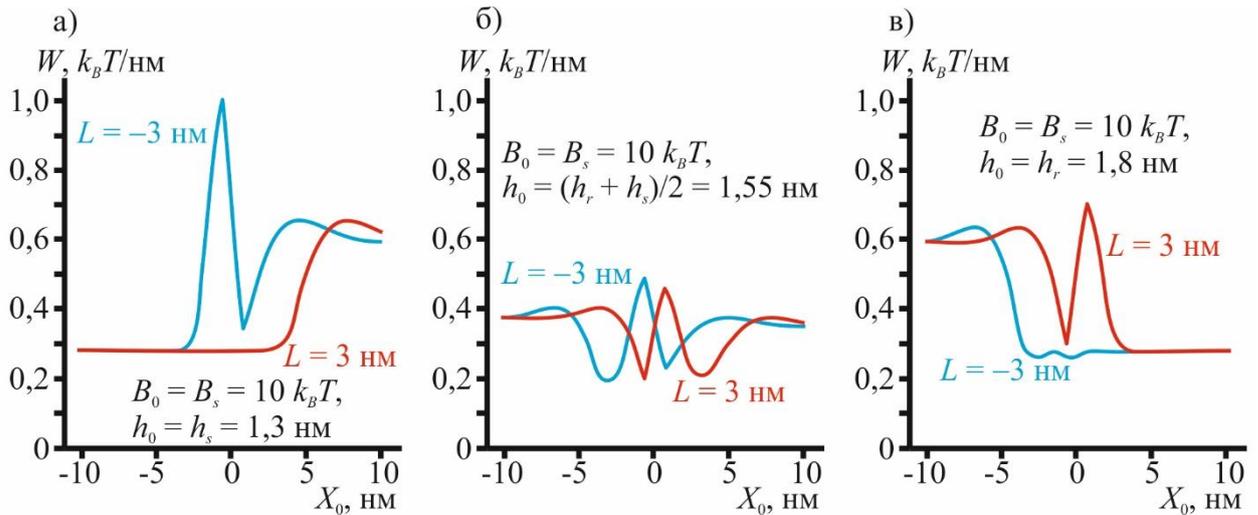


Рисунок 9. Зависимость энергии деформаций мембраны от координаты X_0 липидного включения с $J_0 = 0$ относительно границы рафта: а) «тонкое» включение $h_0 = 1,3$ нм, б) «промежуточное» включение $h_0 = 1,55$ нм, в) «толстое» включение $h_0 = 1,8$ нм.

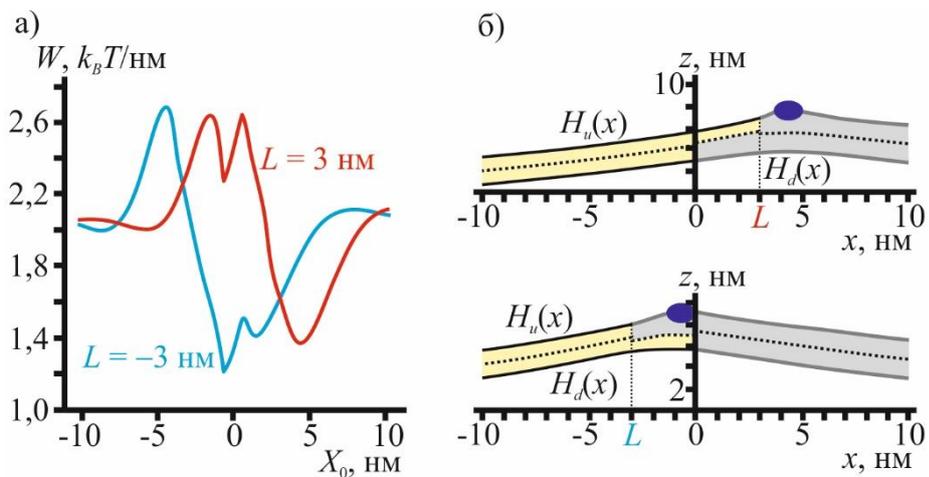


Рисунок 10. Взаимодействие амфипатического пептида с границей рафта: а) энергия деформаций мембраны в зависимости от координаты пептида X_0 , б) формы мембраны, соответствующие оптимальному расположению пептида

На Рисунке 10 показана зависимость энергии деформаций мембраны от положения амфипатического пептида относительно границы рафта, а также формы мембраны в оптимальных конфигурациях, соответствующих минимальной энергии деформаций. В этих конфигурациях пептид располагается в рафтовой

бислошной области вблизи границы рафта в случае $L_0 = +3$ нм и в промежуточной области в случае $L_0 = -3$ нм. Выигрыш энергии при переходе пептида из объемной фазы в оптимальное положение составляет $0,6-0,7 k_B T/\text{нм}$.

Рассмотрены три типа трансмембранных включений: цилиндрическое трансмембранное включение $\Delta \mathbf{n}_x = (\mathbf{n}_2 - \mathbf{n}_1)_x = 0$, включение типа «песочные часы» $\Delta \mathbf{n}_x = (\mathbf{n}_2 - \mathbf{n}_1)_x = -0,4$ и бочковидное включение $\Delta \mathbf{n}_x = (\mathbf{n}_2 - \mathbf{n}_1)_x = +0,4$ при разных длинах гидрофобной части $h_0 = 2h_s$, $h_0 = h_s + h_r$ и $h_0 = 2h_r$ (Рисунок 11).

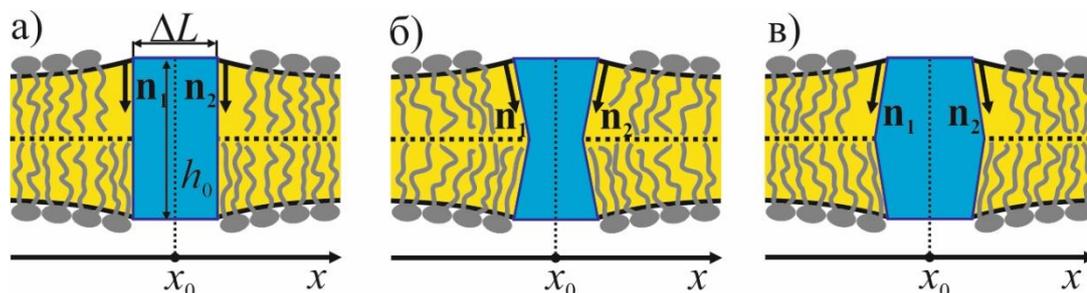


Рисунок 11. Схематичное изображение различных типов трансмембранных включений: а) цилиндрическое, б) «песочные часы», в) бочковидное

На Рисунке 12 представлена зависимость энергии деформаций мембраны от положения трансмембранного включения для различных типов включений. В случае, когда толщина включения совпадает с толщиной бислоя промежуточной области, $h_0 = h_s + h_r$, минимуму энергии соответствует положение в промежуточной зоне.

В целом, латеральное распределение всех типов симметричных трансмембранных включений определяется соотношением их толщин с локальной толщиной мембраны, в то время как наличие минимума в окрестности границы рафта определяется конкретным типом граничных условий.

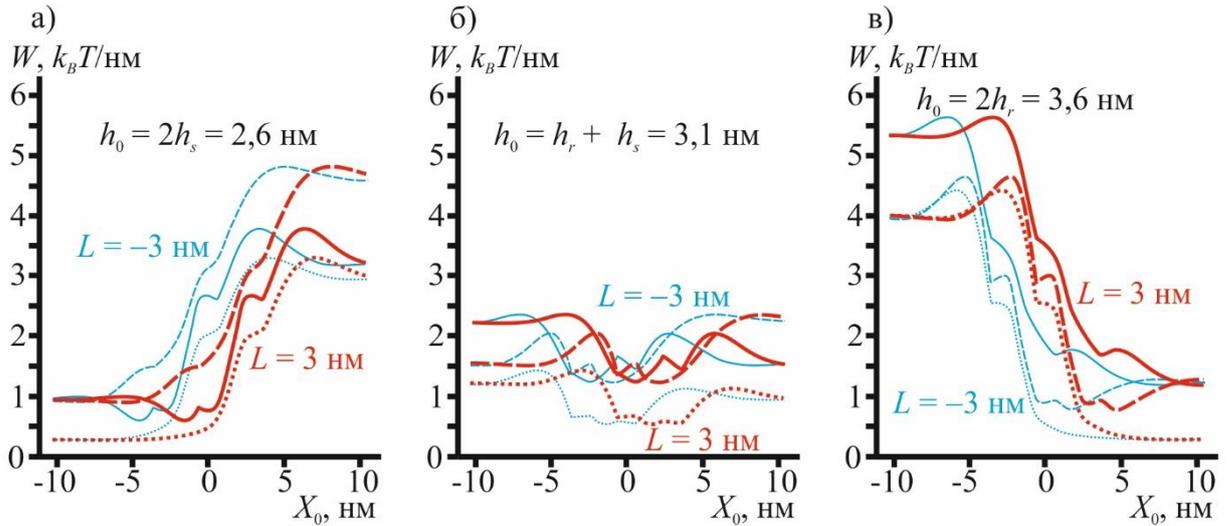


Рисунок 12. Энергия деформаций мембраны в зависимости от координаты центра трансмембранного включения X_0 : а) тонкое включение $h_0 = 2,6$ нм, б) включение промежуточной толщины $h_0 = 3,1$ нм, в) толстое включение $h_0 = 3,6$ нм. Пунктирные линии соответствуют цилиндрическому включению $\Delta n_x = 0$, штриховые линии — включению типа «песочные часы» $\Delta n_x = -0,4$, сплошные линии — бочковидному включению $\Delta n_x = +0,4$

Шестая глава посвящена исследованию физических механизмов, ответственных за наблюдаемую экспериментально бислойность рафтов. В приближении Хельфриха, при условии макроскопичности доменов, в мембране были выделены четыре участка:

1. Области бислойных доменов рафтовой фазы площадью $S_R = S_{0R} - S_{int}/2$ с модулем изгиба равным $2B_R = B_{1R} + B_{2R}$,
2. Области бислойных доменов жидко-неупорядоченной фазы площадью $S_S = S_0 - S_{0R} - S_{int}/2$ с модулем изгиба $2B_S = B_{1S} + B_{2S}$,
3. Области, в которых верхний монослой — рафт, а нижний — жидко-неупорядоченный, площадью $S_{int}/2$ с модулем изгиба $2B_{1int} = B_{1R} + B_{2S}$,
4. Области, в которых нижний монослой — рафт, а верхний — жидко-неупорядоченный, площадью $S_{int}/2$ с модулем изгиба $2B_{2int} = B_{2R} + B_{1S}$.

Энергия упругих деформаций была записана в виде:

$$W_{total} = \int_{S_R} \frac{2B_R}{2} (\Delta u)^2 dS + \int_{S_S} \frac{2B_S}{2} (\Delta u)^2 dS + \int_{S_{int}/2} \frac{2B_{1int}}{2} (\Delta u)^2 dS + \int_{S_{int}/2} \frac{2B_{2int}}{2} (\Delta u)^2 dS. \quad (6)$$

Для расчета средней площади перекрытия фаз была вычислена следующая величина:

$$\langle S_{int} \rangle = \frac{\int_0^{\min\{2S_{0R}, 2S_{0S}\}} e^{-W_{total}/k_B T} s_{int} Du(\mathbf{r}) ds_{int}}{\int_0^{\min\{2S_{0R}, 2S_{0S}\}} e^{-W_{total}/k_B T} Du(\mathbf{r}) ds_{int}}, \quad (7)$$

где посредством $Du(\mathbf{r})$ обозначено функциональное интегрирование. Вводя

обозначение $\hat{B} = k_B T \left(\frac{2\pi^3 h^4 B}{e^2 a^4 k_B T} \right)^{\frac{\pi a_0^2}{8a^2}}$, где a_0 — некоторый характерный размер

молекулы липида, а h — параметр длины (не войдут в наблюдаемые величины), показано, что

$$\langle S_{int} \rangle = \begin{cases} \min\{2S_{0R}, 2S_{0S}\}, & \beta > 0, \\ -\frac{2a_0^2}{\beta}, & \beta < 0, \end{cases} \quad (8)$$

где величина β определяется как

$$\beta = \ln \left(\frac{\hat{B}_r \hat{B}_s}{\hat{B}_{1int} \hat{B}_{2int}} \right). \quad (9)$$

Таким образом, при $\beta < 0$ перекрытие жидко-упорядоченной и жидко-неупорядоченной фаз много меньше площади доменов, а в случае $\beta > 0$ две фазы перекрываются полностью.

В дальнейшем анализе считалось, что $B_{1int} = B_{2int} = (B_r + B_s)/2$. Из формулы (9) следует, что если размеры молекул в разных фазах совпадают, т.е. $a_r = a_s$, то $\beta < 0$ для любых значений модулей изгиба. Была найдена критическая разница $a_r - a_s$

$= \Delta a$, при которой домены перестают быть бислойными. При значениях B_r/B_s близких к единице, можно вычислить следующую асимптотику:

$$\left(\frac{\Delta a}{a}\right)_{\text{крит}} = \frac{\sqrt{3}-1}{4} \left(\frac{B_r}{B_s} - 1\right). \quad (10)$$

Для произвольных значений B_r/B_s зависимость $(\Delta a/a)_{\text{крит}}$ показана на Рисунке 13. Стоит отметить, что в экспериментах по фазовому разделению, как правило, модули изгиба жидко-упорядоченной и жидко-неупорядоченной фаз отличаются в несколько раз, в то время как средние площади, приходящиеся на одну липидную молекулу, отличаются незначительно (несколько процентов), что соответствует области параметров, соответствующей бислойному состоянию рафта.

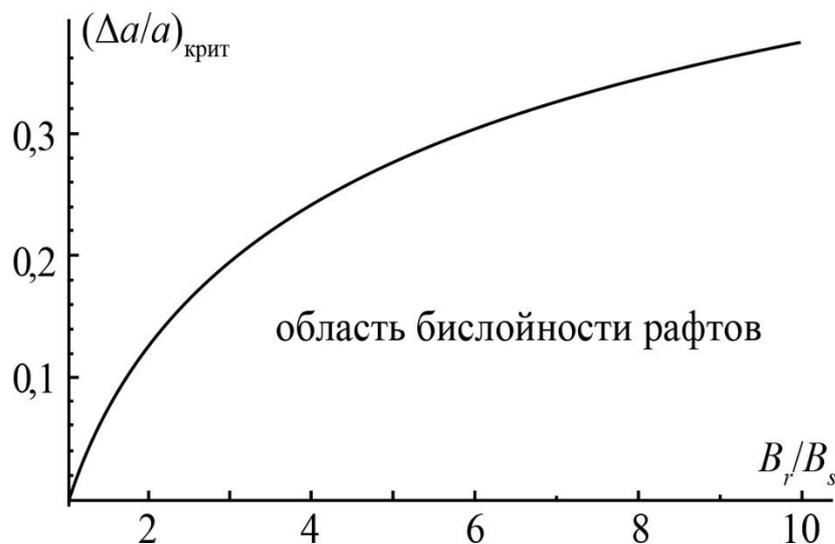


Рисунок 13. Зависимость критической относительной разности размера молекул в разных фазах от отношения модулей изгиба в этих фазах

В заключении сформулированы основные результаты и выводы.

РЕЗУЛЬТАТЫ РАБОТЫ И ВЫВОДЫ

1. Разработана и апробирована на экспериментальных данных модель взаимодействия мембранных включений, опосредованного деформациями липидного бислоя.
2. Рассчитаны зависимости времени жизни и вероятности образования проводящего состояния для мономеров грамицидина.
3. Рассчитаны энергии взаимодействия мономеров грамицидина в зависимости от их положения друг относительно друга. Дана оценка критической концентрации, при которой взаимодействие мономер-мономер существенно влияет на диффузию грамицидина.
4. Рассчитаны энергии взаимодействия амфипатических пептидов в случае их произвольного положения и ориентации друг относительно друга.
5. Обосновано использование одномерного приближения для описания взаимодействия мембранных включений.
6. Вычислены энергии взаимодействия различных типов мембранных включений и границы рафта, найдены расположения включений относительно границы рафта, соответствующие основному состоянию системы.
7. Обоснованы механизмы сопряжения монослойных упорядоченных доменов в бислойные рафты, наблюдаемые экспериментально. Получены условия для существования монослойного рафта.

Список публикаций

1. Kondrashov, O. V., Galimzyanov, T. R., Pavlov, K. V., Kotova, E. A., Antonenko, Y. N., Akimov, S. A., Membrane elastic deformations modulate gramicidin A transbilayer dimerization and lateral clustering //Biophysical journal. – 2018. – Т. 115. – №. 3. – С. 478-493.

2. Kondrashov, O. V., Galimzyanov, T. R., Jiménez-Munguía, I., Batishchev, O. V., Akimov, S. A., Membrane-mediated interaction of amphipathic peptides can be described by a one-dimensional approach //Physical Review E. – 2019. – Т. 99. – №. 2. – С. 022401.
3. Галимзянов, Т.Р., Калуцкий, М.А., Кондрашов, О.В., Пинигин, К.В., Молотковский, Р.Ю., Кузьмин, П.И., Батищев, О.В., Акимов, С.А., Нормальные флуктуации формы биологических мембран как фактор сопряжения упорядоченных монослойных доменов // Биологические мембраны: Журнал мембранной и клеточной биологии. – 2019. – Т. 36. – № 3. – С. 184-191.

Цитируемая литература

1. Goulian M. et al. Gramicidin channel kinetics under tension //Biophysical Journal. – 1998. – Т. 74. – №. 1. – С. 328-337.
2. Lundbæk J. A., Andersen O. S. Spring constants for channel-induced lipid bilayer deformations estimates using gramicidin channels //Biophysical journal. – 1999. – Т. 76. – №. 2. – С. 889-895.
3. Jones T. L. et al. Gramicidin channels are internally gated //Biophysical journal. – 2010. – Т. 98. – №. 8. – С. 1486-1493.