

СОДЕРЖАНИЕ

Том 39, номер 5, 2022

**Тематический выпуск, посвященный памяти Юрия Александровича Чизмаджева
(редактор-составитель С. А. Акимов)**

ОБЗОРЫ

- Физико-химические механизмы функционирования мембраноактивных белков оболочечных вирусов
О. В. Батищев 321
- Первые шаги в регистрации и интерпретации граничного потенциала липидных мембран
Ю. А. Ермаков 337
- Исследования электрогенного ионного транспорта в Na^+, K^+ -АТФ-азе на бислойных липидных мембранах импедансным методом
В. С. Соколов 345
-

- Механизмы ингибирования слияния липидных везикул экстрактами чаги и листьев облепихи
С. С. Ефимова, П. Д. Злодеева, Е. В. Шекунов, О. С. Остроумова 355
- Шум в ультракоротких эластичных мембранных нанотрубках
К. А. Иванова, П. В. Башкиров 364
- Формирование пор амфипатическими пептидами в замкнутых мембранах
О. В. Кондрашов, П. И. Кузьмин, С. А. Акимов 373
- Возможность формирования пор в липидных мембранах несколькими молекулами амфипатических пептидов
О. В. Кондрашов, С. А. Акимов 384
- Мониторинг агонист-индуцированной активности Р13-киназы в клетках НЕК-293 с использованием генетически кодируемого сенсора
П. Д. Котова, О. А. Рогачевская, Н. В. Кабанова, С. С. Колесников 398
- Слияние мембран пероксисомы и липидной капли: расширение π -образной структуры
Р. Ю. Молотковский, П. И. Кузьмин 404
-
-

Contents

Vol. 39, No. 5, 2022

Thematic Issue Dedicated to the Memory of Yury Alexandrovich Chizmadzhev

Publication editor, S. A. Akimov

REVIEWS

Physico-Chemical Mechanisms of the Functioning of Membrane-Active Proteins of Enveloped Viruses <i>O. V. Batishchev</i>	321
First Steps in Detection and Interpretation of the Lipid Membrane Boundary Potential <i>Yu. A. Ermakov</i>	337
Investigations of Electrogenic Ion Transport by Na,K-ATPase in Bilayer Lipid Membranes by Impedance Method <i>V. S. Sokolov</i>	345

Mechanisms of Inhibition of Lipid Vesicles Fusion by Extracts of Chaga and Buckthorn Leaves <i>S. S. Efimova, P. D. Zlodeeva, E. V. Shekunov, O. S. Ostroumova</i>	355
Noise in Ultrashort Elastic Membrane Nanotube <i>K. A. Ivanova, P. V. Bashkirov</i>	364
Pore Formation by Amphipathic Peptides in Closed Membranes <i>O. V. Kondrashov, P. I. Kuzmin, S. A. Akimov</i>	373
The Possibility of Pore Formation in Lipid Membranes by Several Molecules of Amphipathic Peptides <i>O. V. Kondrashov, S. A. Akimov</i>	384
Monitoring Agonist-Induced Activity of PI3-Kinase in HEK-293 with a Genetically Encoded Sensor <i>P. D. Kotova, O. A. Rogachevskaja, N. V. Kabanova, S. S. Kolesnikov</i>	398
Fusion of Peroxisome and Lipid Droplet Membranes: Expansion of a π -Shaped Structure <i>R. J. Molotkovsky, P. I. Kuzmin</i>	404

УДК 577.352.26

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ МЕМБРАНОАКТИВНЫХ БЕЛКОВ ОБОЛОЧЕЧНЫХ ВИРУСОВ

© 2022 г. О. В. Батищев*

*Институт физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина РАН, Москва, 119071 Россия***e-mail: olegbati@gmail.com*

Поступила в редакцию 04.05.2022 г.

После доработки 01.06.2022 г.

Принята к публикации 02.06.2022 г.

Последние несколько лет внимание всего мира приковано к появлению новых опасных штаммов вирусов, среди которых особое место занимают коронавирусы, преодолевшие межвидовой барьер в последние 20 лет: вирусы атипичной пневмонии (SARS), ближневосточного респираторного синдрома (MERS), а также новой коронавирусной инфекции (SARS-CoV-2), вызвавшей крупнейшую пандемию со времен пандемии гриппа “испанки” в 1918 году. Коронавирусы являются представителями класса оболочечных вирусов, имеющих липопротеиновую оболочку. К подобному классу относятся также такие серьезные патогены, как вирус иммунодефицита человека (ВИЧ), гепатит, вирус Эбола, грипп и т. п. Несмотря на существенные различия в клинической картине протекания заболеваний, вызываемых оболочечными вирусами, сами они имеют ряд характерных особенностей, определяющих их общность. Независимо от способа проникновения в клетку – путем эндоцитоза или непосредственного слияния с клеточной мембраной – для оболочечных вирусов характерны следующие стадии взаимодействия с клеткой-мишенью: связывание с рецепторами на клеточной поверхности, взаимодействие поверхностных гликопротеинов вируса с мембранными структурами инфицируемой клетки, слияние липидной оболочки вириона с плазматической или эндосомальной мембраной, разрушение белкового капсида и его диссоциация от вирусного нуклеопротеина. Впоследствии внутри инфицированной клетки вновь синтезированные вирусные белки должны самоорганизоваться на ее различных мембранных структурах для формирования дочернего вириона. Таким образом, как начальные стадии вирусного инфицирования, так и сборка и выход новых вирусных частиц сопряжены с активностью белков вируса по отношению к мембране клетки и ее органелл. Данный обзор посвящен анализу физико-химических механизмов функционирования основных структурных белков ряда оболочечных вирусов с целью выявления возможных стратегий мембранной активности таких белков на различных стадиях вирусного инфицирования клетки.

Ключевые слова: оболочечные вирусы, белок-липидные взаимодействия, слияние мембран, коронавирус SARS-CoV-2, вирус иммунодефицита человека (ВИЧ), вирус гриппа А, неструктурные белки коронавирусов, матриксные белки, капсидные белки

DOI: 10.31857/S0233475522050036

ВВЕДЕНИЕ

Большинство процессов в клеточных мембранах опосредовано специальными белками. Белок-липидные взаимодействия в клетке, регулирующие топологические перестройки мембран, такие как слияние и деление клеток и их органелл, процессы эндо- и экзоцитоза, сопровождающиеся формированием мембранных везикул, их отпочковыванием и транспортом, требуют слаженной работы большого комплекса белков, что определяет сложность их изучения и экспериментального моделирования [1–4]. При этом, хотя слияние мембран в биологических системах определяется кооперативными белок-липидными взаимодействиями, механические свойства липидного матрикса, окружаю-

щего мембранные белки, определяют энергетику образования промежуточных структур, через которые реализуется слияние мембран [5]. Эксперименты, проведенные Л.В. Черномордиком и Г.Б. Меликяном на плоских липидных бислоях в лаборатории биоэлектрохимии Института электрохимии АН СССР, возглавляемой Ю.А. Чизмаджевым, показали, что процесс слияния состоит из следующих последовательных стадий: 1) установление плотного контакта мембран, 2) возникновение так называемого stalka (или перемычки) между близлежащими монослоями, 3) расширение stalka, приводящее к образованию триламнарной структуры (или диафрагмы полуслияния) и, наконец, 4) ее разрыв, знаменующий завершение слияния [6]. Было показано, что скорости упомянутых ста-

дий существенным образом зависят от спонтанной кривизны липидных монослоев. Так, отрицательная спонтанная кривизна контактирующих монослоев (типичный пример — диолеилфосфатидилэтаноламин) способствует образованию stalka, а разрыв диафрагмы полуслияния ускоряется при наличии положительной спонтанной кривизны (т.е. лизолипидов) в дистальных монослоях. Доказательство справедливости этой схемы слияния было получено другими сотрудниками лаборатории биоэлектрохимии В.С. Маркиным и М.М. Козловым [7]. Построенная ими теория количественно описала всю совокупность имевшихся на тот момент экспериментов. Подробное изложение вопроса и соответствующую литературу можно найти в обзоре [8].

Дальнейшее развитие работ по изучению слияния мембран закономерно требовало включение в рассмотрение белковой компоненты мембран. Первые работы в этом направлении были проведены и нацелены на исследование синаптического слияния и действия белков комплекса SNARE [9, 10]. Однако большое число белков, входящих в данный комплекс, делало затруднительным выяснение физико-химических механизмов их функционирования и построение физических моделей процессов для установления энергетики промежуточных стадий. По этой причине на первый план вышло изучение вирус-индуцированного слияния, которое в ряде систем опосредовано одним белком известной структуры, например, гемагглютинином (НА), как в случае вируса гриппа [11]. Считается, что несколько молекул НА формируют так называемую розетку слияния, а затем липидные впучивания (димплы), на верхушках которых после их сближения образуются монослойные перемычки (stalkи), приводящие к монослойному, а впоследствии к полному слиянию.

В различных модельных системах, базирующихся на использовании экспрессирующих гемагглютинин клеток [12], было показано, что влияние липидного состава мембраны-мишени на слияние хорошо описывается в рамках теории stalka. В этих же работах было показано, что роль НА сводится к образованию комплекса — “розетки” белков слияния, внутри которой происходит локальное сближение клеточных мембран на расстояние, достаточное для последующего спонтанного слияния мембран. Таким образом, была предложена гипотетическая картина слияния, в рамках которой работа молекул гемагглютинина необходима для локального сближения липидных бислоев клеточных мембран, которые далее сливаются спонтанно аналогично двум плоским бислоям липидным мембранам (БЛМ). Однако ряд экспериментальных наблюдений, полученных в клеточных системах, таких, например, как отсутствие липидного обмена через малые поры слияния, плохо описываются в рамках предложенной модели. Кроме того,

последние данные по электронной томографии слияния вируса гриппа с липидными везикулами показывают формирование структур, когда изгибается только мембрана-мишень, в то время как вирусная мембрана остается практически недеформированной [13]. Анализ этих фактов приводит к выводу о том, что классическая теория stalka, хорошо описывающая слияние в случае симметричных по составу и чисто липидных мембран, может быть неприменима для белок-опосредованного слияния.

Под внешней липидной мембраной оболочечных вирусов располагается каркас из капсидных или матриксных белков. Эти белки составляют основную по количеству копий массу вирусных белков. Взаимодействуя с вирусным геномом и поверхностными гликопротеинами, они играют важную роль в сборке вирусных частиц и производстве дочерних вирионов в инфицированной клетке [14–16]. Присущая матриксным белкам многофункциональность заключена в их двойной роли: с одной стороны, поддержание целостности вируса, с другой — контролируемый распад образуемой данными белками оболочки для выхода генетического материала вируса в цитоплазму при попадании вируса внутрь клетки, с третьей — организация сборки вновь производимых вирионов для мультипликации инфекции. Во всех этих процессах матриксные белки взаимодействуют с липидными мембранами, будь то внешняя оболочка вируса или плазматическая мембрана клетки. Именно это взаимодействие является определяющим в жизнедеятельности вируса, хотя молекулярные механизмы таких взаимодействий по-прежнему остаются открытым вопросом. В частности, для вируса гриппа А известно, что он проникает в клетку путем эндоцитоза, попадая в результате в клеточную эндосому. Основным триггером слияния вирусной частицы и эндосомальной мембраны является изменение рН среды до 4–5, приводящее не только к конформационным переходам в белке слияния НА, но и к разрушению внутреннего белкового каркаса вириона, сформированного матриксным белком М1. При этом понижение рН внутри вирусной частицы происходит за счет работы протонных каналов М2, расположенных в оболочке вириона. В экспериментах, проводимых под руководством Ю.А. Чизмаджева было показано, что блокирование каналов М2 с помощью амантадина приводит к “замораживанию” процесса вирусного слияния на стадии малой поры слияния диаметром около 1 нм, в результате чего не происходит выход генетического материала вируса в цитоплазму клетки [17]. Таким образом, разрушение оболочки из матриксных белков является критически важным этапом вирусного инфицирования. С другой стороны, в инфицированной клетке матриксные белки должны собраться на ее плазматической

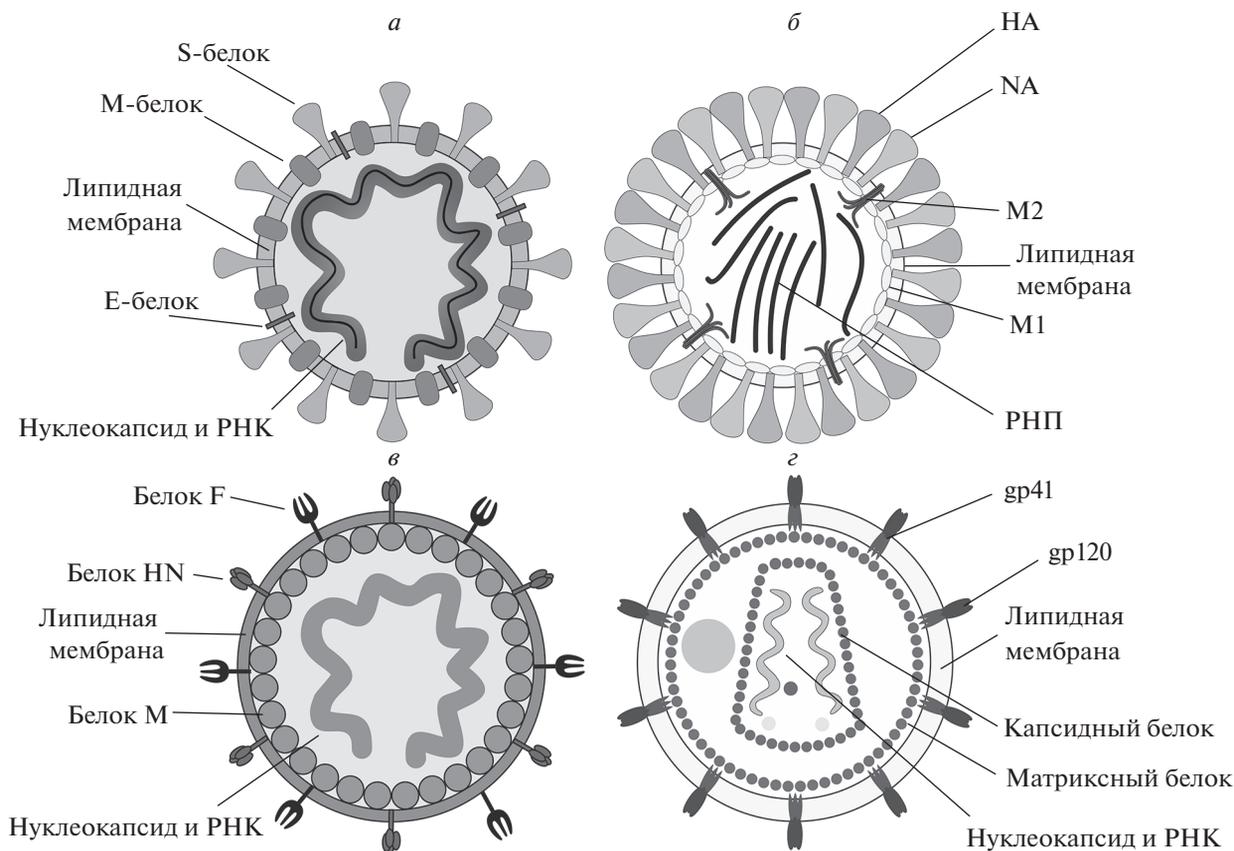


Рис. 1. Структура оболочечных вирусов. *a* – Коронавирус SARS-CoV-2; *б* – вирус гриппа А; *в* – вирус болезни Нью-касла; *г* – вирус иммунодефицита человека. НА – гемагглютинин, NA – нейраминидаза, РНП – рибонуклеопротеин, M1 – белок M1, M2 – протонный канал M2.

мембране и самоорганизоваться в структуру нового вириона с его последующим отделением от клеточной мембраны. Процесс сборки и отпочковывания дочерней вирусной частицы подразумевает локальную деформацию клеточных мембран, важную роль в которой также должны играть матриксные или капсидные белки. Тем не менее конкретные физико-химические механизмы, определяющие протекание самосборки белкового каркаса вирусов и изменение топологии мембранных структур клетки, зачастую остаются невыясненными.

ВИРУС-ИНДУЦИРОВАННОЕ СЛИЯНИЕ МЕМБРАН

Геном оболочечных вирусов, равно как их капсидные (нуклеокапсидные) белки окружены дополнительной оболочкой – бислойной липидной мембраной, которую они приобретают от клетки-хозяина во время выхода вновь сформированного вириона из инфицированной клетки [18] (рис. 1). Оболочечные вирусы используют слияние мембран для проникновения в клетку [19]. Для осуществления данного процесса вирусы используют работу белков, называемых белками слияния. За

счет конформационных перестроек данных белков, инициируемых определенным триггером, будь то связывание с рецептором на поверхности клетки или изменение рН внутри клеточной эндосомы, инициируется процесс слияния липидной оболочки вируса и мембран клетки [20]. При этом работа данных белков не требует каких-либо энергетических молекул [21].

Проникновение любого вируса внутрь клетки начинается с его связывания с определенными рецепторными молекулами на поверхности клетки [22] (рис. 2). Слияние мембран является важнейшей стадией жизненного цикла оболочечных вирусов. Исходно генетический материал вируса отделен от цитоплазмы клетки двумя мембранами: вирусной и клеточной. В результате слияния этих мембран объединяются заключенные в них водные объемы, т.е. непрерывно соединяются цитоплазма клетки и внутреннее пространство вириона, содержащее вирусный генетический материал, что приводит к инфицированию клетки. Некоторые оболочечные вирусы сливаются напрямую с плазматической мембраной инфицируемой клетки, другие попадают внутрь клетки в процессе эндоцитоза.

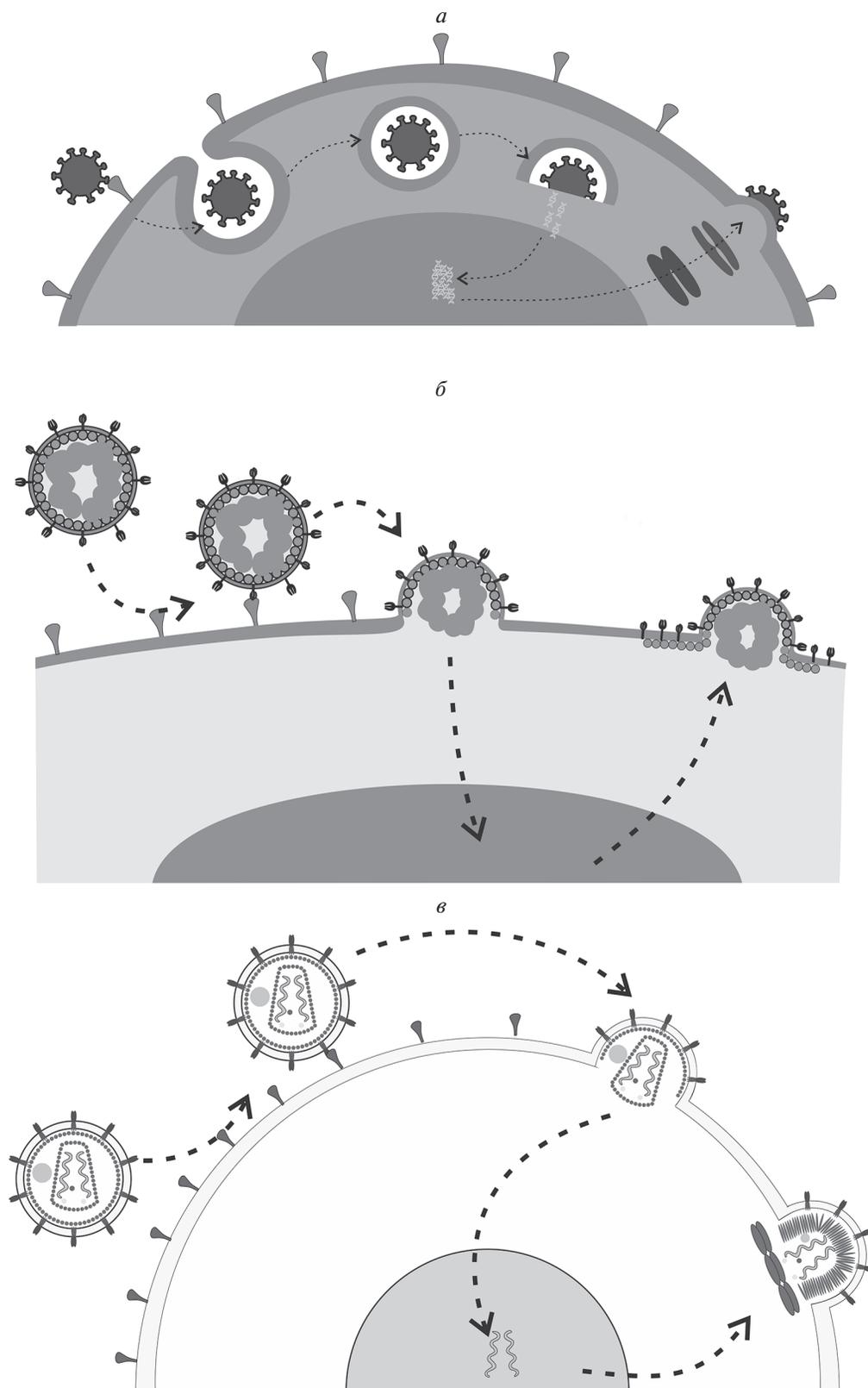


Рис. 2. Примеры жизненных циклов оболочечных вирусов. *a* – Вирус гриппа А; *б* – вирус болезни Ньюкасла; *в* – вирус иммунодефицита человека.

Слияние мембран — это один из важных элементов жизнедеятельности клеток, опосредующий многие жизненно важные процессы. Наиболее характерный пример такого процесса — это синаптическая передача, ключевым актом которой является слияние синаптических везикул, содержащих нейротрансммиттеры, с пресинаптической плазматической мембраной [23]. Кроме того, в клетке постоянно реализуется слияние органелл, которое происходит во время слияния между самими клетками, например, в процессах оплодотворения, канцерогенеза и т.п. [24–27]. Определенные белки, называемые белками слияния, осуществляют необходимую работу для реализации данных процессов [28, 29]. Например, при секреции гормонов и нейротрансммиттеров комплекс белков SNARE катализирует слияние мембран [9, 10]. Межклеточное слияние также обеспечивается специфическими белками, которые, однако, выявляются только в редких случаях и остаются неизвестными для большинства случаев [30]. Белки слияния предназначены для деформации взаимодействующих мембран с последующим их слиянием и перемешиванием изначально разделенных объемов воды. Работа, которую эти белки должны выполнять для завершения процесса слияния, в каждом случае определяет их структуру, количество, наличие вспомогательных белков и т.д.

Как правило, в вирусах слияние мембран осуществляют один или два белка; в частности, вирус гриппа А имеет только один белок слияния — гемагглютинин [31]. Слияние мембран, как и любая другая их топологическая перестройка, требует затрат энергии на работу по механической деформации липидного матрикса. Таким образом, белок-липидные взаимодействия будут определять энергетику протекания процесса вирус-индуцированного слияния мембран, а значит, регулировать данную стадию процесса инфицирования. Теоретические оценки показывают, что характерная высота энергетических барьеров слияния составляет от нескольких десятков до сотен $k_B T$, и такие барьеры не могут быть преодолены исключительно за счет тепловых флуктуаций [32]. Механическая энергия, запасенная в белках слияния, позволяет покрывать энергетические затраты процесса.

Многочисленные экспериментальные данные показывают, что слияние мембран может происходить спонтанно, если между сливающимися мембранами добавить вещества, соединяющие две взаимодействующие мембраны (например, Ca^{2+}) или дегидрирующие их контакт (например, полиэтиленгликоль) [33, 34]. Эти данные позволяют сделать вывод, что приведение двух мембран в тесный контакт и преодоление гидратного отталкивания являются наиболее энергоемкими фазами процесса слияния, которые не могут про-

исходить самопроизвольно за счет энергии тепловых флуктуаций липидов. Поскольку дальнейшее слияние в таких модельных системах происходит без участия каких-либо белков, можно сделать вывод, что энергетические барьеры на остальной части траектории слияния не должны заметно влиять. Таким образом, функция белков слияния в значительной степени аналогична роли ферментов: они могут снижать основной энергетический барьер активации для слияния и, возможно, ускорять константу прямой скорости процесса.

Вирусные белки слияния I типа (например, НА вируса гриппа А и белок E_{nv} gp120/gp41 ВИЧ) являются наиболее изученными [21]. В начале цикла инфекции вирусные белки слияния связывают специфические рецепторные молекулы на поверхности клетки и сразу после этого либо при изменении pH внутри эндосомы белок слияния атакует клеточную мембрану с помощью пептида слияния, который является специфическим N-концом, состоящий примерно из 20 аминокислот [35]. Пептид слияния выходит из гидрофобного кармана эктодомена белка слияния и встраивается в липидный бислой мембраны-мишени в качестве эффективного якоря. В последующем в ходе продолжающихся конформационных перестроек белок слияния повторно складывается, притягивая клеточную мембрану-мишень со встроенным пептидом слияния к вирусной мембране [36]. Вступая в тесный контакт, эти мембраны сливаются, что приводит к образованию поры слияния, через которую вирусный геном может высвободиться в цитоплазму. На этой стадии белок слияния сворачивается в “пост-слиятельную” конформацию, когда его трансмембранная часть контактирует с пептидом слияния [31]. Если пептид слияния не достигает мембраны-мишени, он может встраиваться в вирусную мембрану рядом с трансмембранным доменом белка слияния, также приводя его в пост-слиятельную конформацию. Высота белка слияния в таком состоянии составляет около 10 нм [37].

Пептиды слияния вирусных белков в основном амфипатические [38, 39]. Они могут частично встраиваться в клеточную мембрану, одновременно обеспечивая и якорь, и рычаг для приложения сил и моментов, а также локально деформировать мембрану-мишень. Глубина внедрения пептида слияния регулирует его слиятельную активность [39]. Однако замена трансмембранной части белка слияния на липидный якорь препятствует расширению поры слияния [40, 41]. Следовательно, как пептид слияния, так и трансмембранный домен соответствующего белка, необходимы для эффективного слияния. Фактически, действие белков слияния приводит к образованию выпуклостей на двух контактирующих мембранах: вирусной и клеточной. Сильное гидратное отталкивание, действующее на вершины этих выпуклостей, приводит к

латеральному смещению полярных липидных головок из области плотного контакта [42–44]. С некоторой вероятностью эти локальные выпуклости противоположных мембран могут проконтактировать с образованием сталка [44].

В ряде теоретических моделей было показано, что основной энергетический барьер для взаимодействия индуцированных белками слияния оболочечных вирусов выпуклостей мембран сильно зависит от расстояния между этими мембранами [32, 45]. Это расстояние определяется толщиной слоя белков слияния в пост-слиятельной конформации, пептиды слияния которых не достигли клеточной мембраны-мишени. Для гемагглютинаина эта толщина составляет около 10 нм, как показывает электронная микроскопия [37]. Таким образом, белки слияния должны локально преодолевать это расстояние, чтобы сблизить сливающиеся мембраны на небольшой площади контакта, обеспечивая относительно низкую высоту энергетического барьера для полуслияния. По разным оценкам, энергия, необходимая для такой перестройки мембран, составляет порядка нескольких десятков $k_B T$ [32, 45, 46]. Для сравнения: энергия, запасенная в одном тримере гемагглютинаина, составляет около $60 k_B T$, т.е. $20 k_B T$ на мономер гемагглютинаина [47]. Приблизительно такая же оценка энергии верна и для тримера gp41 ВИЧ [48]. Это означает, что эффективное слияние мембран требует кооперативного действия нескольких белков слияния, формирующих так называемую розетку слияния. В случае вируса гриппа А необходимое количество тримеров HA в розетке слияния, по разным оценкам, составляет от 3 до 9 [49, 50]. Однако в случае ВИЧ известно, что одного тримера белка gp41 может быть достаточно для реализации процесса слияния [50].

Специфической функциональной особенностью белков слияния I типа является сильная деформация мембраны-мишени. Вирусная мембрана деформируется в меньшей степени из-за наличия контактирующей с липидной мембраной вируса оболочки из капсидных белков [37]. Деформация мембраны-мишени обеспечивается встраиванием в нее пептидов слияния. Подобные деформационные взаимодействия рассматривались в многочисленных теоретических работах [51–53]. В частности было показано, что при исследовании образования кооперативной розетки слияния следует учитывать зависимость упругой энергии от взаимной ориентации пептидов слияния, а не от расстояния между ними, так как положения вирусных белков слияния достаточно строго фиксированы из-за наличия в них трансмембранных доменов, взаимодействующих с вирусным капсидом. Высвобождаемые белками слияния вируса пептиды слияния, помимо локальной деформации мембраны-мишени, являются якорями, через ко-

торые белки слияния могут прилагать механические усилия – силы и моменты – к мембране-мишени [11, 54]. Таким образом, необходимые для слияния мембран выпуклости липидного матрикса могут формироваться как за счет упругих деформаций, вызванных встроенными пептидами слияния, так и за счет прямого приложения сил белками слияния, стягивающими две сливающиеся мембраны [55, 56].

Неглубокое внедрение амфипатических пептидов слияния в мембрану-мишень аналогично созданию положительной спонтанной кривизны, которая, индуцируемая, например, лизолипидами, приводит к образованию пор [57], но никак не к формированию сталка. Таким образом, физико-химический механизм функционирования белков слияния с амфипатическими пептидами слияния не может базироваться лишь на модификации контактного монослоя мембраны-мишени, и, по-видимому, неизбежно требует приложения к двум мембранам стягивающих сил. Для уменьшения высоты энергетического барьера образования сталка пептиды слияния должны эффективно индуцировать отрицательную спонтанную кривизну [57], для чего глубина их внедрения в контактный монослой мембраны-мишени должна быть увеличена. Расчеты с явным учетом глубины внедрения пептидов слияния, проведенные в работах [58, 59], полностью подтверждают этот вывод. Более того, существуют экспериментальные данные для пептида слияния белка слияния ВИЧ, согласно которым, чем глубже эти пептиды внедрены в контактный монослой мембраны-мишени, тем более вероятно слияние [39].

В случае ВИЧ слияние может катализироваться несколькими белками Env вплоть до одного тримера белка [50]. Ключевое отличие здесь заключается в том факте, что наряду со слиянием белки Env ответственны и за рецепцию вируса, то есть его связывание с клеточной плазматической мембраной [60]. Белок gp120 распознает рецептор CD4 и корецептор CXCR4 или CCR5, которые представляют собой крупные трансмембранные белки. Связывание с рецептором запускает конформационную перестройку гликопротеина Env. Такой тип триггера вирусного слияния дополнительно ограничивает количество одновременно активированных тримеров gp120/gp41 из-за относительно низкой поверхностной плотности молекул CD4 в плазматической мембране Т-лимфоцитов. Это отличается от случая вируса гриппа А, активация гемагглютинаина которого вызвана понижением величины pH в поздней эндосоме, т.е. все тримеры гемагглютинаина вириона активируются почти одновременно.

Традиционно предлагаются два возможных механизма действия белков слияния. Один из них основан на предположении, что встроенные пепти-

ды слияния модифицируют упругие свойства мембраны-мишени, прежде всего, ее спонтанную кривизну [61]. Считается, что измененная спонтанная кривизна в кольцеобразной зоне розетки слияния может быть причиной образования выпуклости в мембране-мишени; сливающиеся мембраны вступают в тесный контакт в верхней части выпуклости, что существенно облегчает слияние мембран. Согласно второму механизму, вместо модификации мембраны-мишени белки слияния индуцируют изгибающие моменты, приводящие к образованию выпуклостей, и генерируют силу, непосредственно и механически приводя две плотно прилегающие мембраны к тесному контакту [31]. Анализ, проведенный в работе [62], показал, что именно этот второй механизм обеспечивает образование высокосимметричной розетки слияния, организуя кооперативность механических усилий нескольких белков слияния. Напротив, первый механизм использует симметрию розетки для объяснения образования выпуклостей на сливающихся мембранах, но не может объяснить сам факт формирования такой симметрии. Таким образом, прямая механическая активность белков слияния управляет всем процессом слияния. Эта активность может быть результатом согласованного действия различных субъединиц белка слияния, в том числе и тех участков, которые ответственны за взаимодействие с рецептором. Последнее предположение может быть ответом на вопрос о наблюдаемом различии в кооперативности действия белков слияния вируса гриппа А и ВИЧ. Таким образом, развитие упругих моделей процесса слияния мембран, позволило ответить на многие вопросы о механизмах реализации вирус-индуцированного слияния мембран, в частности, о возможных причинах кооперативного действия вирусных белков слияния.

КАПСИДНЫЕ БЕЛКИ ОБОЛОЧЕЧНЫХ ВИРУСОВ И ФОРМИРОВАНИЕ ДОЧЕРНИХ ВИРИОНОВ

Под внешней липидной мембраной оболочечных вирусов располагается каркас из капсидных или матриксных белков. Взаимодействуя с вирусным геномом и поверхностными гликопротеинами, они играют важную роль в сборке вирусных частиц и производстве дочерних вирионов в инфицированной клетке [14–16]. Матриксные белки характеризуются многофункциональностью на различных стадиях жизненного цикла вируса: с одной стороны, они должны поддерживать целостность и общую архитектуру вириона, с другой — осуществлять контролируемый распад оболочки вируса для выхода его генетического материала в цитоплазму инфицированной клетки, с третьей — организовывать сборку дочерних вирио-

нов для мультипликации инфекции. Во всех этих процессах матриксные белки взаимодействуют с липидными мембранами, будь то внешняя оболочка вируса или плазматическая мембрана клетки. Именно это взаимодействие является определяющим в жизнедеятельности вируса, хотя молекулярные механизмы таких взаимодействий по-прежнему остаются открытым вопросом. Основная дискуссия идет о характере таких белок-липидных взаимодействий, а также их взаимосвязи с самосборкой вирусной оболочки [63–67].

Несмотря на многообразие форм оболочечных вирусов, матриксные белки в них организованы схожим способом: это либо спиральные структуры, как в случае вируса гриппа А [14, 68, 69], вируса везикулярного стоматита [15] и вируса кори [16], либо двумерные решетки, формирующие частицы околосферической формы, как в случае вируса болезни Ньюкасла [70] или ВИЧ [71]. Эволюционная и структурная близость отмечается для матриксных белков разных семейств вирусов, как например, для полипротеина Gag вируса иммунодефицита человека и белка М1 вируса гриппа А [72]. Такая близость должна свидетельствовать и об общих механизмах участия матриксных белков в формировании вирусной оболочки и отпочковывании вновь синтезированных вирионов с поверхности инфицированной клетки.

Вообще говоря, взаимосвязь между трехмерной структурой и функциональными свойствами белка является одним из важнейших базовых понятий в биохимии. Это означает, что для выполнения определенной функции белок должен иметь определенную аминокислотную последовательность, и возможно, даже более важно, что он должен быть свернут определенным образом [15]. Эта идея, однако, была пересмотрена около двух десятилетий назад, когда было найдено множество белков с частично или полностью неупорядоченной структурой. Эти белки, называемые внутренне разупорядоченными белками, существуют как динамические ансамбли конформаций, которые не имеют стабильной складчатой структуры, но тем не менее они выполняют свои (часто очень изменчивые) биологические функции [73]. Разупорядоченные участки белков могут способствовать быстрой реакции вирусов на изменяющиеся условия окружающей среды и, следовательно, их выживанию и развитию, внедряя механизмы адаптации и защиты [74]. Разупорядочение в сворачивании белка препятствует связыванию антител, что снижает иммунный ответ. Известно, что этот факт является ключом к чрезвычайной способности ВИЧ уклоняться от иммунного ответа, причем основной вклад вносят структурные особенности его матрикса [74].

Процесс вирусного отпочковывания в целом схож с клеточным экзоцитозом в том смысле, что подразумевает формирование искривлен-

ной структуры из клеточной мембраны для образования вириона. Минимальный набор белков в вирусной оболочке ограничивает вирус в выборе возможных путей воздействия на мембрану с целью ее топологической перестройки. Можно выделить следующие три возможных пути такого воздействия, реализуемые независимо друг от друга или в комбинации в различных вирусах. Первый механизм заключается в наличии определенной молекулярной геометрии у матриксных белков, позволяющей им при связывании с липидным бислоем и формировании двумерной решетки на его поверхности навязывать ему определенную кривизну, инициируя таким образом процесс формирования дочернего вириона. Рентгеноструктурный анализ показал наличие такого механизма у вируса болезни Ньюкасла [70] и вируса инфекционной анемии лососевых [75]. В обоих случаях мономеры белка в структуре каркаса объединяются под некоторым углом друг к другу, что соответствует формированию околосферических вирусных частиц. Зарождение таких частиц происходит путем формирования круглых белок-липидных доменов [76] с последующим искривлением липидной мембраны. При этом жидкое состояние липидного бислоя подразумевает, что для передачи своей кривизны липидной мембране слой матриксных белков должен быть связан с ней так, чтобы минимизировать перераспределение липидов на участках контакта мембраны с белковой оболочкой вируса. Достигается это, по всей видимости, должно за счет гидрофобных взаимодействий, что и было показано в случае вируса болезни Ньюкасла [77]. Подобный механизм взаимодействия предполагался и в ранних работах, посвященных исследованию взаимодействия матриксного белка М1 вируса гриппа с липидным бислоем [78–81], однако не нашел подтверждения в более поздних структурных исследованиях [63], не показавших ни частичного встраивания белка М1 в липидный бислой, ни его способности навязывать мембране определенную кривизну. Эти исследования говорят, скорее, в пользу электростатической природы взаимодействия матриксного белка М1 с мембраной.

Вторым возможным механизмом является конденсация липидов под слоем белка за счет электростатических взаимодействий. Такая конденсация на внутреннем монослое плазматической мембраны клетки создает локальный дисбаланс площади мембранных монослоев, приводящий к изгибу мембраны и формированию различных выростов, призванных сбросить избыточную площадь [82]. В частности, формирование филаментозных структур, близких по диаметру к вирусным частицам, при адсорбции матриксного белка вируса гриппа С было показано в экспериментах на отрицательно заряженных гигантских однослойных везикулах [83]. Электростатическое взаимодей-

ствие с анионными липидами присуще матриксным белкам таких вирусов, как вирус гриппа [63, 84], вирус Эболы [85, 86], вирус везикулярного стоматита [87]. Для всех этих вирусов было показано, что их матриксные белки способны к формированию вирусоподобных частиц [87–90]. При этом дополнительные факторы, способствующие изменению кривизны мембраны, способствуют данному механизму вирусного отпочковывания. Так, было показано, что пальмитирование гемагглютинина вируса гриппа А, способствующее формированию правильной кривизны вирусной частицы, усиливает адсорбцию белка М1 на липидной мембране и облегчает процесс формирования вирусоподобных частиц [91].

Для ряда оболочечных вирусов было показано, что их мембрана является более устойчивой к детергентам, чем плазматическая мембрана клетки [92–96], т.е. имеет так называемую рафтовую структуру [97]. Наличие в вирусной мембране липидных рафтов дает возможность реализовать еще один механизм формирования и отпочковывания везикул: путем повышения линейного натяжения границы рафтов с их последующим выходом из плоскости мембраны [98]. И хотя механизм такого процесса пока еще не был продемонстрирован для какого-либо оболочечного вируса, его предпосылки заключаются в возможности формирования липидных доменов за счет конденсации отрицательно заряженных липидов с полностью насыщенными углеводородными цепями на внутреннем монослое плазматической мембраны клетки с последующей инициацией образования липидного домена, обогащенного сфингомиелином, на внешней части мембраны [99].

Таким образом, оболочечные вирусы из различных семейств, использующие разные пути для проникновения в клетку и отличающиеся по первичной последовательности своих структурных белков, тем не менее используют ряд общих физико-химических механизмов на различных этапах инфицирования клетки. Отмеченная выше эволюционная близость матриксных и капсидных белков различных оболочечных вирусов, а также общие элементы в их третичной структуре, также указывают на принципиальную возможность общих механизмов самосборки и дезинтеграции вирусных оболочек из данных белков. Белки слияния вирусов способны создать малую пору слияния, но, как было показано в ряде работ [13, 41], блокирование разрушения белковой оболочки вируса препятствует выходу вирусного генома в цитоплазму клетки. Вопрос о том, являются ли матриксные и капсидные белки вирусов активными участниками процесса расширения поры слияния, или они должны лишь диссоциировать от липидной оболочки вириона, по-прежнему остается открытым. Вообще говоря, многофункциональность вирусных белков говорит о том, что его матрикс-

ные белки также могут выполнять несколько ролей. Если влияние данных белков на процесс ядерного транспорта генетического материала вируса уже установлено [100–102], то их влияние на выход вирусного генома явно не было продемонстрировано. С другой стороны, эти же белки должны самоорганизоваться для формирования дочерней вирусной частицы и ее выхода из инфицированной клетки. В общем, формирование и отпочковывание вирусной частицы требует значительных топологических перестроек клеточных мембран. А значит, возникает вопрос о том, как и какие вирусные белки способны выполнять эту работу. Основной фокус здесь приходится именно на матриксные белки, так как количество их копий максимально среди белков любого оболочечного вируса, и именно они призваны создавать и поддерживать архитектуру всей вирусной частицы. Таким образом, в процессе своей самоорганизации матриксные/капсидные белки должны создавать условия для деформаций клеточных мембран и обеспечения условий для отпочковывания или выхода вирионов. Рассмотренная выше ограниченность стратегий таких модификаций структуры мембраны вирусными белками подразумевает общие функциональные механизмы, которые могут быть описаны в рамках физико-химических моделей данных процессов, однако эта область в настоящее время проработана намного слабее, чем вопросы вирус-индуцированного слияния мембран.

КОРОНАВИРУСЫ: НОВЫЙ ВЫЗОВ ДЛЯ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ МОДЕЛЕЙ

Коронавирусы привлекли большое внимание как возбудители вспышек респираторных синдромов человека, таких как тяжелый острый респираторный синдром (SARS), ближневосточный респираторный синдром (MERS) и новая коронавирусная инфекция (COVID-19). Эти респираторные заболевания возникли в результате зоонозной передачи от животных людям, приведшей к появлению штаммов вируса, которые ранее не циркулировали в популяции людей. Среди них коронавирус SARS-CoV-2, возбудитель COVID-19, продемонстрировал быстрое глобальное распространение и привел к возникновению пандемии.

Коронавирусы, как и рассмотренные выше вирусы, относятся к классу оболочечных вирусов. Геном коронавируса содержит четыре основных структурных белка: шип (S), мембранный белок (M), оболочечный белок (E) и нуклеокапсидный белок (N), которые кодируются в 3'-конце генома [103]. Белок S опосредует прикрепление вируса к поверхностным рецепторам клетки-хозяина, что приводит к слиянию и последующему проникновению вируса. Белок M является наиболее представленным белком и определяет форму вирусной

оболочки. Белок E является наименьшим по количеству из основных структурных белков и участвует в сборке и почковании вируса. Белок N является единственным белком, который связывается с РНК-геномом, а также участвует в сборке и почковании вируса. При этом необходимо отметить, что в отличие от большинства других оболочечных вирусов, практически все структурные белки коронавируса имеют трансмембранные фрагменты.

Несмотря на их сложность и диапазон функций [104, 105], структурные белки коронавируса занимают только около трети кодирующей части генома. Гораздо больший участок генома, около двух третей, расположенный на 5'-конце, кодирует две длинные открытые рамки считывания 1a и 1b, которые вместе кодируют неструктурные белки вируса. Каждая последовательность сначала транслируется как предшественник полипротеина, pp1a и pp1ab. Полипротеины включают несколько вирусных протеаз, которые превращают pp1a и pp1ab в 16 неструктурных белков (nsr 1–16), необходимые на различных этапах цикла репликации вируса. Эти белки являются одними из самых консервативных белков коронавируса [103]. Многие неструктурные белки взаимодействуют с мембранами, потому что репликация коронавируса происходит в специализированных клеточных компартментах, создаваемых вирусными белками, которые модифицируют мембраны клетки для создания областей репликации вируса, которые скрыты от клеточных факторов врожденного иммунитета [106]. Комбинация множества мембранно-взаимодействующих факторов делает коронавирусы одной из наиболее сложных моделей взаимодействия вирус-мембрана.

Репликация РНК-вирусов с положительной цепью РНК, а также ДНК-вирусов в клетках растений и животных вызывает образование субклеточной микросреды, называемой сетью репликации, вирусными фабриками или вироплазмой [107]. Хотя цель таких мембранных образований в жизненном цикле вируса до конца неизвестна, предполагается, что это облегчает, по крайней мере, стадию синтеза вирусной РНК [108, 109]. Создание таких “мини-органелл” требует деформации мембран клетки-хозяина и цитоскелета, вызывая цитопатический эффект, который использовался в качестве маркера вирусной инфекции для проверки потенциальной эффективности лекарственного средства [110]. Считается, что все положительно-цепочечные РНК-вирусы (+РНК-вирусы), которые инфицируют эукариотические клетки, образуют мембрано-связанные органеллы [111]. Одна из наиболее распространенных модификаций мембран, вызванных +РНК-вирусами, — это образование парных мембран, то есть двух близко расположенных липидных бислоев, дающих основу так называемым двухмембранным везикулам [108]. Широкое распростране-

ние таких структур при репликации +РНК-вирусов говорит о том, что это эффективная стратегия для успешного производства новых вирионов и что мембранное спаривание может каким-то образом повысить конкурентоспособность этих вирусов.

Семейство коронавирусов обладает особенно сложной репликационной мембранной сетью, происходящей из эндоплазматического ретикулума [106], аналогично вирусу Денге [112] и реовирусу [113]. Ее структура включает множество изогнутых мембран и двухмембранных везикул. Все они взаимосвязаны в непрерывную сеть друг с другом и с эндоплазматическим ретикуломом липидными нанотрубками [114]. Такая перестройка мембран клетки-хозяина рассматривается как вирусная стратегия для создания основы для репликации вируса путем локализации и концентрации необходимых факторов и обеспечения защиты от иммунного ответа [115]. Подтверждением этой гипотезы является факт того, что общий уровень вирусной РНК коррелирует с количеством двухмембранных везикул в клетке [106, 116, 117]. Однако существуют данные, которые не подтверждают взаимосвязь двухмембранных везикул в эндоплазматическом ретикулеуме и синтеза вирусной РНК в инфицированной клетке [118]. Как было показано, мутации неструктурных белков вируса, препятствующие формированию ими двухмембранных везикул, не приводят к полной остановке синтеза вирусной РНК, но при этом скорость репликации вируса значительно падает.

Двухмембранные везикулы являются загадочными структурами, механизм формирования которых до сих пор неясен. Анализ физико-химических механизмов процесса образования двухмембранной везикулы из двухмембранного диска был проведен в статье [119]. В данной работе в рамках простейшей теории упругости Хельфриха [120] вычислялись и сравнивались энергии изгиба мембран двухмембранной везикулы и двухмембранного диска. Энергия изгиба сферической двухмембранной везикулы не зависит от ее радиуса, в то время как энергия изгиба двухмембранного диска линейно возрастает при росте радиуса диска. При некотором радиусе диска эти две энергии сравниваются, и двухмембранный диск может перейти в двухмембранную везикулу. В этой статье не рассматривались процессы формирования двухмембранного диска из плоской мембраны и образования двухмембранной везикулы из двухмембранного сферического сегмента; форма мембран постулировалась, а не находилась путем оптимизации упругой энергии; никак не описывались участвующие в процессе белки.

Таким образом, остается открытым вопрос о том, имеют ли вирусные репликазы еще одну критическую функцию — способны ли они вызвать искривление мембраны на необходимой органелле?

Это подразумевает, что данные белки должны быть способны образовывать каркасоподобные структуры, и они должны обладать липидной специфичностью, так как отсутствует какая-либо информация о других типах специфического нацеливания этих репликаз в эндоплазматическом ретикулеуме. Так, при гепатите С, который, как было показано, также образует мембранные репликационные компартменты от эндоплазматического ретикулума, белок NS5A стимулирует активность фосфатидилинозитол-4-киназы-III, следовательно, облегчает выработку фосфатидилинозитол-4-фосфата на цитоплазматической стороне эндоплазматического ретикулума и, таким образом, предположительно облегчает аккумуляцию РНК-полимеразы [121]. Было показано, что обогащение фосфатидилинозитол-4-фосфатом имеет важное значение для репликации энтеровирусной и флавивирусной РНК.

Тот факт, что неструктурные белки коронавирусов могут формировать каркасы, способствующие деформациям клеточных мембран, роднит их с матриксными белками других оболочечных вирусов и позволяет предположить наличие общих механизмов белок-липидного и белок-белкового взаимодействия. Тем более потому, что такие двухмембранные структуры не встречаются в неинфицированных клетках (за исключением аутофагосом), что свидетельствует о том, что спонтанное “сморщивание” эндоплазматического ретикулума не может быть движущей силой появления двойных мембранных структур. Понимание механизма формирования двухмембранных везикул имеет решающее значение для выяснения принципов организации компартментов вирусной репликации.

Другой предложенный механизм формирования двухмембранных везикул включает клеточную аутофагию [122, 123]. Предполагается, что белок DFPC1 (двойной белок 1, содержащий FYVE-домен) связывает фосфатидилинозитол фосфат, образуя таким образом изогнутые области эндоплазматического ретикулума, называемые омегасомами [124]. На основании данных, полученных для ряда коронавирусов, было высказано предположение, что их белки nsр 6 генерируют аутофагосомы [125].

Оболочечные белки E коронавируса играют несколько ролей во время инфекции, включая морфогенез вируса. Они представляют собой небольшие (74–109 аминокислот) гидрофобные виропорины [126]. Белки E состоят из двух отдельных структурных доменов: более длинного, чем толщина липидного бислоя, гидрофобного домена, и заряженного цитоплазматического хвоста. Роль белков E в сборке и выходе не до конца понятна. Потребность в них во время морфогенеза вируса варьируется в зависимости от рода вируса. Удаление белков E из трансмиссивного вируса гастро-

энтерита (TGEV) приводит к репликации компетентных, но дефектных по распространению вирусов [127], как и в случае с вирусом MERS [128]. SARS-CoV продемонстрировал 200-кратное снижение выхода вируса в отсутствие белка E, которое зависело от типа клеток, используемого для инфекции [129]. Таким образом, хотя мембраноактивные белки коронавируса, такие как nsr 3, 4, 6, а также белок E, являются высококонсервативными и критически важными для репликации вируса, механизмы их функционирования и взаимодействия с клеточными мембранами и друг с другом до сих пор остаются невыясненными.

Белок S представляет собой гликозилированный мембранный белок слияния типа I, который состоит из двух субъединиц, S1 и S2. N-концевая субъединица S1 содержит рецептор-связывающий домен (RBD), который опосредует связывание с рецептором клетки-хозяина, а именно с ангиотензин превращающим ферментом 2 (ACE2), как для SARS-CoV, так и для SARS-CoV-2 [130, 131]. Биофизические и структурные/функциональные исследования пептида слияния белка S вирусов SARS-CoV-2 [132], SARS [133] и MERS [134] дали важные сведения о функциональном значении конкретных областей пептида слияния, таких как большое количество консервативных аминокислотных остатков в двух последовательных фрагментах пептида слияния, названных FP1 и FP2 (остатки 816–835 и 835–854 соответственно в SARS-CoV-2). Эти исследования показали, что вместе фрагменты F1 и F2 образуют платформу двустороннего взаимодействия между мембранами и что аминокислотные остатки как в FP1, так и в FP2 способствуют связыванию с мембраной посредством своего взаимодействия с ионами Ca^{2+} . Эти данные о функциональной роли Ca^{2+} подтверждаются результатами, полученными для пептидов слияния от других родственных вирусов, таких как MERS [134] и вирус Эбола [135]. Действительно, в пептиде слияния вируса MERS один из этих аминокислотных остатков, E891 в N-концевой (FP1) части (соответствует E819 в нумерации пептида слияния SARS-CoV-2), оказался решающим для взаимодействий с Ca^{2+} и обеспечения деформаций клеточной мембраны, связанных со слиянием [136]. Кроме того, было показано, что нарушение липидного бислоя за счет Ca^{2+} -зависимых взаимодействий пептида слияния с мембраной влияет на организацию полярных групп липидов в месте взаимодействия, но не на центральную гидрофобную область мембраны [136]. Тем не менее участки связывания Ca^{2+} с пептидом слияния и их роль в каких-либо специфических (но неизвестных) способах взаимодействия пептида слияния с мембраной остаются неопределенными. Это затрудняет интерпретацию любых измеримых эффектов вирусных взаимодействий с мембраной и, сле-

довательно, любых подходов к снижению инфекционности путем воздействия на эту важную область белка S.

Как было сказано выше, различие в механизме активации белков слияния и глубина встраивания пептида слияния в липидный матрикс клеточных мембран регулирует кооперативность действия белков слияния за счет деформаций липидного бислоя клетки-мишени, а не за счет прямых белок-белковых взаимодействий [62]. Построенная молекулярная модель действия пептидов слияния вируса гриппа А и вируса иммунодефицита человека позволила выяснить роль структуры рецепторов в кооперативности работы белков слияния вируса. Тот факт, что начальные стадии проникновения коронавируса SARS-CoV-2 близки к таковым у вируса иммунодефицита человека (связывание с рецептором на поверхности клетки с последующим слиянием с плазматической мембраной), а белок S SARS-CoV-2, как и белок gp41/gp120 вируса иммунодефицита человека относится к белкам слияния I типа, позволяет считать, что предпосылки этой модели верны и для описания работы пептида слияния и белка S коронавируса.

ВЫВОДЫ

Жизненный цикл всех оболочечных вирусов представляет собой сложный многостадийный процесс, начинающийся с проникновения вируса в клетку и заканчивающийся отделением вновь сформированных вирионов с ее мембраны. Он включает точно установленное взаимодействие компонентов вируса и клетки. Нарушение любого этапа жизненного цикла вириона препятствует формированию полноценных вирионов и ограничивает распространение инфекции. Ключевой особенностью всех оболочечных вирусов является наличие не только белковой оболочки, защищающей вирусный геном, но и взаимодействующей с ней липидной мембраны, в которую встроены основные структурные белки вириона. Поэтому белок-липидные взаимодействия играют одну из определяющих ролей в процессах вирусного инфицирования, репликации и выхода новых вирусных частиц. Такие взаимодействия в большинстве случаев не подразумевают формирование ковалентной химической связи, а основаны на электростатических, гидрофобных и Ван-дер-Ваальсовых взаимодействиях. Поэтому в процессах инфицирования клетки оболочечными вирусами важную роль играют различные физико-химические механизмы. Несмотря на общность описанных процессов для большинства оболочечных вирусов, по-прежнему остается много открытых вопросов о молекулярных механизмах протекания отдельных стадий, о силах, определяющих функционирование и взаимодействие различных компонентов вирусов и инфицируемой

клетки. При этом очевидно, что поиск новых эффективных противовирусных препаратов должен базироваться на знании фундаментальных механизмов, регулирующих работы вирусных белков и определяющих протекание различных стадий вирусного инфицирования клетки. Модели физико-химических механизмов процессов вирусного слияния, формирования дочерних вирионов, а также новые вызовы, связанные с особенностями репликации коронавируса, могут стать основой такого поиска. Работы по созданию подобных моделей, начатые Ю.А. Чизмаджевым и его коллегами в 1980-х годах, успешно развиваются по сей день благодаря созданной им уникальной научной школе.

Благодарности. Автор выражает благодарность М.М. Поповой за техническую помощь.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Источники финансирования. Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 22-13-00435).

Соответствие принципам этики. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- McMahon H.T., Gallop J.L. 2005. Membrane curvature and mechanisms of dynamic cell membrane remodeling. *Nature*. **438**, 590–596.
- Zimmerberg J., Kozlov M.M. 2006. How proteins produce cellular membrane curvature. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **7**, 9–19.
- Schekman R., Orci L. 1996. Coat proteins and vesicle budding. *Science*. **271**, 1526–1533.
- Bremser M., Nickel W., Schweikert M., Ravazzola M., Amherdt M., Hughes C.A., Söllner T.H., Rothman J.E., Wieland F.T. 1999. Coupling of coat assembly and vesicle budding to packaging of putative cargo receptors. *Cell*. **96**, 495–506.
- Chernomordik L., Kozlov M.M., Zimmerberg J. 1995. Lipids in biological membrane fusion. *J. Membr. Biol.* **146**, 1–14.
- Меликян Г.Б., Абидор И.Г., Черномордик Л.В., Чайлахян Л.М. 1982. Электростимулированное слияние и деление бислойных липидных мембран. *Докл. АН СССР*. **263**, 1009–1012.
- Козлов М.М., Маркин В.С. 1983. Возможный механизм слияния мембран. *Биофизика*. **28**, 242–247.
- Chernomordik L.V., Kozlov M.M., Melikyan G.B., Abidor I.G., Markin V.S., Chizmadzhev Yu.A. 1985. The shape of lipid molecules and monolayer membrane fusion. *Biochim. Biophys. Acta BBA – Biomembr.* **812**, 643–655.
- Wang T., Li L., Hong W. 2017. SNARE proteins in membrane trafficking. *Traffic*. **18**, 767–775.
- Jahn R., Scheller R.H. 2006. SNAREs – engines for membrane fusion. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **7**, 631–643.
- Skehel J.J., Wiley D.C. 2000. Receptor binding and membrane fusion in virus entry: The influenza hemagglutinin. *Annu. Rev. Biochem.* **69**, 531–569.
- Chernomordik L.V., Frolov V.A., Leikina E., Bronk P., Zimmerberg J. 1998. The pathway of membrane fusion catalyzed by influenza hemagglutinin: Restriction of lipids, hemifusion, and lipidic fusion pore formation. *J. Cell Biol.* **140**, 1369–1382.
- Lee K.K. 2010. Architecture of a nascent viral fusion pore. *EMBO J.* **29**, 1299–1311.
- Calder L.J., Wasilewski S., Berriman J.A., Rosenthal P.B. 2010. Structural organization of a filamentous influenza A virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **107**, 10685–10690.
- Ge P., Tsao J., Schein S., Green T.J., Luo M., Zhou Z.H. 2010. Cryo-EM model of the bullet-shaped vesicular stomatitis virus. *Science*. **327**, 689–693.
- Liljeroos L., Huisken J.T., Ora A., Susi P., Butcher S.J. 2011. Electron cryotomography of measles virus reveals how matrix protein coats the ribonucleocapsid within intact virions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **108**, 18085–18090.
- Chizmadzhev Y.A. 2004. The mechanisms of lipid-protein rearrangements during viral infection. *Bioelectrochemistry*. **63**, 129–136.
- Petterson R.F. 1991. Protein localization and virus assembly at intracellular membranes. In: *Protein traffic in eukaryotic cells*. Vol. 170. Current Topics in Microbiology and Immunology. Ed. Compans R.W. Berlin, Heidelberg: Springer, p. 67–106.
- White J., Kielian M., Helenius A. 1983. Membrane fusion proteins of enveloped animal viruses. *Q. Rev. Biophys.* **16**, 151–195.
- Kielian M., Rey F.A. 2006. Virus membrane-fusion proteins: more than one way to make a hairpin. *Nat. Rev. Microbiol.* **4**, 67–76.
- Colman P.M., Lawrence M.C. 2003. The structural biology of type I viral membrane fusion. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **4**, 309–319.
- Poehlmann S., Simmons G. 2013. *Viral entry into host cells*. New York: Springer Science.
- Südhof T.C. 2013. Neurotransmitter release: The last millisecond in the life of a synaptic vesicle. *Neuron*. **80**, 675–690.
- Hernandez L.D., Hoffman L.R., Wolfsberg T.G., White J.M. 1996. Virus-cell and cell-cell fusion. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **12**, 627–661.
- Duelli D., Lazebnik Y. 2003. Cell fusion: A hidden enemy? *Cancer Cell*. **3**, 445–448.
- Chen E.H. 2005. Unveiling the mechanisms of cell-cell fusion. *Science*. **308**, 369–373.
- Chen E.H., Grote E., Mohler W., Vignery A. 2007. Cell-cell fusion. *FEBS Lett.* **581**, 2181–2193.
- White J. 1992. Membrane fusion. *Science*. **258**, 917–924.
- Wickner W., Schekman R. 2008. Membrane fusion. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **15**, 658–664.
- Bruckman N.G., Uygun B., Podbilewicz B., Chernomordik L.V. 2019. How cells fuse. *J. Cell Biol.* **218**, 1436–1451.

31. Harrison S.C. 2015. Viral membrane fusion. *Virology*. **479–480**, 498–507.
32. Kuzmin P.I., Zimmerberg J., Chizmadzhev Y.A., Cohen F.S. 2001. A quantitative model for membrane fusion based on low-energy intermediates. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **98**, 7235–7240.
33. Lentz B.R. 2007. PEG as a tool to gain insight into membrane fusion. *Eur. Biophys. J.* **36**, 315–326.
34. Hong J., Yang H., Pang D., Wei L., Deng C. 2018. Effects of mono- and di-valent metal cations on the morphology of lipid vesicles. *Chem. Phys. Lipids*. **217**, 19–28.
35. White J.M., Delos S.E., Brecher M., Schornberg K. 2008. Structures and mechanisms of viral membrane fusion proteins: Multiple variations on a common theme. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **43**, 189–219.
36. Benhaim M.A., Lee K.K. 2020. New biophysical approaches reveal the dynamics and mechanics of type I viral fusion machinery and their interplay with membranes. *Viruses*. **12**, 413.
37. Chlanda P., Mekhedov E., Waters H., Schwartz C.L., Fischer E.R., Ryham R.J., Cohen F.S., Blank P.S., Zimmerberg J. 2016. The hemifusion structure induced by influenza virus haemagglutinin is determined by physical properties of the target membranes. *Nat. Microbiol.* **1**, 16050.
38. Sammalkorpi M., Lazaridis T. 2007. Configuration of influenza hemagglutinin fusion peptide monomers and oligomers in membranes. *Biochim. Biophys. Acta BBA – Biomembr.* **1768**, 30–38.
39. Qiang W., Sun Y., Weliky D.P. 2009. A strong correlation between fusogenicity and membrane insertion depth of the HIV fusion peptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **106**, 15314–15319.
40. Frolov V.A., Cho M.-S., Bronk P., Reese T.S., Zimmerberg J. 2000. Multiple local contact sites are induced by GPI-linked influenza hemagglutinin during hemifusion and flickering pore formation. *Traffic*. **1**, 622–630.
41. Markosyan R.M., Cohen F.S., Melikyan G.B. 2000. The lipid-anchored ectodomain of influenza virus hemagglutinin (GPI-HA) is capable of inducing non-enlarging fusion pores. *Mol. Biol. Cell*. **11**, 1143–1152.
42. Leikin S.L., Kozlov M.M., Chernomordik L.V., Markin V.S., Chizmadzhev Y.A. 1987. Membrane fusion: Overcoming of the hydration barrier and local restructuring. *J. Theor. Biol.* **129**, 411–425.
43. Helm C., Israelachvili J., McGuiggan P. 1989. Molecular mechanisms and forces involved in the adhesion and fusion of amphiphilic bilayers. *Science*. **246**, 919–922.
44. Kozlovsky Y., Efrat A., Siegel D.A., Kozlov M.M. 2004. Stalk phase formation: effects of dehydration and saddle splay modulus. *Biophys. J.* **87**, 2508–2521.
45. Kozlovsky Y., Chernomordik L.V., Kozlov M.M. 2002. Lipid intermediates in membrane fusion: Formation, structure, and decay of hemifusion diaphragm. *Biophys. J.* **83**, 2634–2651.
46. Akimov S., Polynkin M.A., Jiménez-Munguía I., Pavlov K.V., Batishchev O.V. 2018. Phosphatidylcholine membrane fusion is pH-dependent. *Int. J. Mol. Sci.* **19**, 1358.
47. Kozlov M.M., Chernomordik L.V. 1998. A mechanism of protein-mediated fusion: coupling between refolding of the influenza hemagglutinin and lipid rearrangements. *Biophys. J.* **75**, 1384–1396.
48. Melikyan G.B., Markosyan R.M., Hemmati H., Delmedico M.K., Lambert D.M., Cohen F.S. 2000. Evidence that the transition of HIV-1 Gp41 into a six-helix bundle, not the bundle configuration, induces membrane fusion. *J. Cell Biol.* **151**, 413–424.
49. Danieli T., Pelletier S.L., Henis Y.I., White J.M. 1996. Membrane fusion mediated by the influenza virus hemagglutinin requires the concerted action of at least three hemagglutinin trimers. *J. Cell Biol.* **133**, 559–569.
50. Yang X., Kurteva S., Ren X., Lee S., Sodroski J. 2005. Stoichiometry of envelope glycoprotein trimers in the entry of human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* **79**, 12132–12147.
51. Kozlovsky Y., Zimmerberg J., Kozlov M.M. 2004. Orientation and interaction of oblique cylindrical inclusions embedded in a lipid monolayer: A theoretical model for viral fusion peptides. *Biophys. J.* **87**, 999–1012.
52. Pinigin K.V., Kondrashov O.V., Jiménez-Munguía I., Alexandrova V.V., Batishchev O.V., Galimzyanov T.R., Akimov S.A. 2020. Elastic deformations mediate interaction of the raft boundary with membrane inclusions leading to their effective lateral sorting. *Sci. Rep.* **10**, 4087.
53. Kondrashov O.V., Galimzyanov T.R., Jiménez-Munguía I., Batishchev O.V., Akimov S.A. 2019. Membrane-mediated interaction of amphipathic peptides can be described by a one-dimensional approach. *Phys. Rev. E*. **99**, 022401.
54. Harrison J.S., Higgins C.D., O’Meara M.J., Koellhoffer J.F., Kuhlman B.A., Lai J.R. 2013. Role of electrostatic repulsion in controlling pH-dependent conformational changes of viral fusion proteins. *Structure*. **21**, 1085–1096.
55. McMahon H.T., Kozlov M.M., Martens S. 2010. Membrane curvature in synaptic vesicle fusion and beyond. *Cell*. **140**, 601–605.
56. Kozlov M.M., McMahon H.T., Chernomordik L.V. 2010. Protein-driven membrane stresses in fusion and fission. *Trends Biochem. Sci.* **35**, 699–706.
57. Chernomordik L. 1996. Non-bilayer lipids and biological fusion intermediates. *Chem. Phys. Lipids*. **81**, 203–213.
58. Molotkovsky R., Galimzyanov T., Jiménez-Munguía I., Pavlov K., Batishchev O., Akimov S. 2017. Switching between successful and dead-end intermediates in membrane fusion. *Int. J. Mol. Sci.* **18**, 2598.
59. АКИМОВ С.А., МОЛОТКОВСКИЙ Р.Ю., ГАЛИМЗЯНОВ Т.Р., РАДАЕВ А.В., ШИЛОВА Л.А., КУЗЬМИН П.И., БАТИШЧЕВ О.В., ВОРОНИНА Г.Ф., ЧИЗМАДЖЕВ Ю.А. 2014. Модель слияния мембран: непрерывный переход в пору слияния с учетом гидрофобных и гидратационных взаимодействий. *Биол. мембраны*. **31**, 14–24.
60. Merk A., Subramaniam S. 2013. HIV-1 envelope glycoprotein structure. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **23**, 268–276.
61. Martens S., Kozlov M.M., McMahon H.T. 2007. How synaptotagmin promotes membrane fusion. *Science*. **316**, 1205–1208.
62. Akimov S.A., Kondrashov O.V., Zimmerberg J., Batishchev O.V. 2020. Ectodomain pulling combines with fusion peptide inserting to provide cooperative fusion for influenza virus and HIV. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 5411.

63. Baudin F., Petit I., Weissenhorn W., Ruigrok R.W.H. 2001. In vitro dissection of the membrane and RNP binding activities of influenza virus M1 protein. *Virology*. **281**, 102–108.
64. Leser G.P., Lamb R.A. 2017. Lateral organization of influenza virus proteins in the budzone region of the plasma membrane. *J. Virol.* **91**, e02104-16.
65. Ruigrok R.W.H., Barge A., Durrer P., Brunner J., Ma K., Whittaker G.R. 2000. Membrane interaction of influenza virus M1 protein. *Virology*. **267**, 289–298.
66. Ruigrok R.W.H., Schoehn G., Dessen A., Forest E., Volchkov V., Dolnik O., Klenk H.-D., Weissenhorn W. 2000. Structural characterization and membrane binding properties of the matrix protein VP40 of Ebola virus. *J. Mol. Biol.* **300**, 103–112.
67. Wijesinghe K.J., Urata S., Bhattarai N., Kooijman E.E., Gerstman B.S., Chapagain P.P., Li S., Stahelin R.V. 2017. Detection of lipid-induced structural changes of the Marburg virus matrix protein VP40 using hydrogen/deuterium exchange-mass spectrometry. *J. Biol. Chem.* **292**, 6108–6122.
68. Shtykova E.V., Dadinova L.A., Fedorova N.V., Golanikov A.E., Bogacheva E.N., Ksenofontov A.L., Baratova L.A., Shilova L.A., Tashkin V.Yu., Galimzyanov T.R., Jeffries C.M., Svergun D.I., Batishchev O.V. 2017. Influenza virus matrix protein M1 preserves its conformation with pH, changing multimerization state at the priming stage due to electrostatics. *Sci. Rep.* **8**, e82431.
69. Peukes J., Xiong X., Erlendsson S., Qu K., Wan W., Calder L.J., Schraidt O., Kummer S., Freund S.M.V., Kräusslich H.G., Briggs J.A.G. 2020. The native structure of the assembled matrix protein 1 of influenza A virus. *Nature*. **587**, 495–498.
70. Battisti A.J., Meng G., Winkler D.C., McGinnes L.W., Plevka P., Steven A.C., Morrison T.G., Rossmann M.G. 2012. Structure and assembly of a paramyxovirus matrix protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **109**, 13996–4000.
71. Briggs J.A.G., Wilk, T., Welker, R., Krausslich, H-G., Fuller S.D. 2003. Structural organization of authentic, mature HIV-1 virions and cores. *EMBO J.* **22**, 1707–1715.
72. Harris A., Sha B., Luo M. 1999. Structural similarities between influenza virus matrix protein M1 and human immunodeficiency virus matrix and capsid proteins: an evolutionary link between negative-stranded RNA viruses and retroviruses. *J. Gen. Virol.* **80**, 863–869.
73. Dunker A.K., Babu M.M., Barbar E., Blackledge M., Bondos S.E., Dosztányi Z., Dyson H.J., Forman-Kay J., Fuxreiter M., Gsponer J., Han K.H., Jones D.T., Longhi S., Metallo S.J., Nishikawa K., Nussinov R., Obradovic Z., Pappu R.V., Rost B., Selenko P., Subramaniam V., Sussman J.L., Tompa P., Uversky V.N. 2013. What's in a name? Why these proteins are intrinsically disordered: Why these proteins are intrinsically disordered. *Intrinsically Disord. Proteins*. **1**, e24157.
74. Goh G., Dunker A.K., Uversky V.N. 2008. A comparative analysis of viral matrix proteins using disorder predictors. *Virol. J.* **5**, 126.
75. Zhang W., Zheng W., Toh Y., Betancourt-Solis M.A., Tu J., Fan Y., Vakharia V.N., Liu J., McNew J.A., Jin M., Tao Y.J. 2017. Crystal structure of an orthomyxovirus matrix protein reveals mechanisms for self-polymerization and membrane association. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **114**, 8550–8555.
76. Shnyrova A.V., Ayllon J., Mikhalyov I.I., Villar E., Zimmerberg J., Frolov V.A. 2007. Vesicle formation by self-assembly of membrane-bound matrix proteins into a fluidlike budding domain. *J. Cell Biol.* **179**, 627–633.
77. Faaberg K.S., Peeples M.E. 1988. Association of soluble matrix protein of newcastle disease virus with liposomes is independent of ionic conditions. *Virology*. **166**, 123–132.
78. Sha B., Luo M. 1997. Structure of a bifunctional membrane-RNA binding protein, influenza virus matrix protein M1. *Nat. Struct. Biol.* **4**, 239–244.
79. Gregoriades A. 1980. Interaction of influenza M protein with viral lipid and phosphatidylcholine vesicles. *J. Virol.* **36**, 470–479.
80. Gregoriades A., Frangione B. 1981. Insertion of influenza M protein into the viral lipid bilayer and localization of site of insertion. *J. Virol.* **40**, 323–328.
81. Ye Z.P., Pal R., Fox J.W., Wagner R.R. 1987. Functional and antigenic domains of the matrix (M1) protein of influenza A virus. *J. Virol.* **61**, 239–246.
82. Shi Z., Baumgart T. 2015. Membrane tension and peripheral protein density mediate membrane shape transitions. *Nat. Commun.* **6**, 5974.
83. Saletti D., Radzimanowski J., Effantin G., Midtvedt D., Mangenot S., Weissenhorn W., Bassereau P., Bally M. 2017. The Matrix protein M1 from influenza C virus induces tubular membrane invaginations in an in vitro cell membrane model. *Sci. Rep.* **7**, 40801.
84. Hilsch M., Goldenbogen B., Sieben C., Höfer C.T., Rabe J.P., Klipp E., Herrmann A., Chiantia S. 2014. Influenza A matrix protein M1 multimerizes upon binding to lipid membranes. *Biophys. J.* **107**, 912–923.
85. Adu-Gyamfi E., Johnson K.A., Fraser M.E., Scott J.L., Soni S.P., Jones K.R., Stahelin R.V. 2015. Host cell plasma membrane phosphatidylserine regulates the assembly and budding of Ebola virus. *J. Virol.* **89**, 9440–9453.
86. Gc J.B., Gerstman B.S., Stahelin R.V., Chapagain P.P. 2016. The Ebola virus protein VP40 hexamer enhances the clustering of PI(4,5)P2 lipids in the plasma membrane. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **18**, 28409–28417.
87. Justice P.A., Sun W., Li Y., Ye Z., Grigera P.R., Wagner R.R. 1995. Membrane vesiculation function and exocytosis of wild-type and mutant matrix proteins of vesicular stomatitis virus. *J. Virol.* **69**, 3156–3160.
88. Gómez-Puertas P., Albo C., Pérez-Pastrana E., Vivo A., Portela A. 2000. Influenza virus matrix protein is the major driving force in virus budding. *J. Virol.* **74**, 11538–11547.
89. Latham T., Galarza J.M. 2001. Formation of wild-type and chimeric influenza virus-like particles following simultaneous expression of only four structural proteins. *J. Virol.* **75**, 6154–6165.
90. Jasenosky L.D., Neumann G., Lukashevich I., Kawakawa Y. 2001. Ebola virus VP40-induced particle formation and association with the lipid bilayer. *J. Virol.* **75**, 5205–5214.
91. Chlanda P., Mekhedov E., Waters H., Sodt A., Schwartz C., Nair V., Blank P.S., Zimmerberg J. 2017. Palmitoylation contributes to membrane curvature in influenza A virus assembly and hemagglutinin-mediated membrane fusion. *J. Virol.* **91**, e00947-17.
92. Scheiffele P., Rietveld A., Wilk T., Simons K. 1999. Influenza Viruses select ordered lipid domains during

- budding from the plasma membrane. *J. Biol. Chem.* **274**, 2038–2044.
93. Veit M., Thaa B. 2011. Association of influenza virus proteins with membrane rafts. *Adv. Virol.* **2011**, 370606.
 94. Gerl M.J., Sampaio J.L., Urban S., Kalvodova L., Verbavatz J.M., Binnington B., Simons K. 2012. Quantitative analysis of the lipidomes of the influenza virus envelope and MDCK cell apical membrane. *J. Cell Biol.* **196**, 213–221.
 95. Nayak D.P., Balogun R.A., Yamada H., Zhou Z.H., Barman S. 2009. Influenza virus morphogenesis and budding. *Virus Res.* **143**, 147–161.
 96. Pohl C., Duprex W.P., Krohne G., Rima B.K., Schneider-Schaulies S. 2007. Measles virus M and F proteins associate with detergent-resistant membrane fractions and promote formation of virus-like particles. *J. Gen. Virol.* **88**, 1243–1250.
 97. Simons K., Ikonen E. 1997. Functional rafts in cell membranes. *Nature.* **387**, 569–572.
 98. Baumgart T., Hess S.T., Webb W.W. 2003. Imaging coexisting fluid domains in biomembrane models coupling curvature and line tension. *Nature.* **425**, 821–824.
 99. Bobone S., Hilsch M., Storm J., Dunsing V., Herrmann A., Chiantia S. 2017. Phosphatidylserine lateral organization influences the interaction of influenza virus matrix protein 1 with lipid membranes. *J. Virol.* **91**, e00267-17.
 100. Peeples M.E., Wang C., Gupta K.C., Coleman N. 1992. Nuclear entry and nucleolar localization of the Newcastle disease virus (NDV) matrix protein occur early in infection and do not require other NDV proteins. *J. Virol.* **66**, 3263–3269.
 101. Wang Y.E., Pernet O., Lee B. 2012. Regulation of the nucleocytoplasmic trafficking of viral and cellular proteins by ubiquitin and small ubiquitin-related modifiers. *Biol. Cell* **104**, 121–138.
 102. Bui M., Wills E.G., Helenius A., Whittaker G.R. 2000. Role of the influenza virus M1 protein in nuclear export of viral ribonucleoproteins. *J. Virol.* **74**, 1781–1786.
 103. Masters P.S. 2006. The molecular biology of coronaviruses. *Adv. Virus Res.* **66**, 193–292.
 104. Perlman S., Netland J. 2009. Coronaviruses post-SARS: Update on replication and pathogenesis. *Nat. Rev. Microbiol.* **7**, 439–450.
 105. Reguera J., Mudgal G., Santiago C., Casasnovas J.M. 2014. A structural view of coronavirus-receptor interactions. *Virus Res.* **194**, 3–15.
 106. Ulasli M., Verheije M.H., de Haan C.A.M., Reggiori F. 2010. Qualitative and quantitative ultrastructural analysis of the membrane rearrangements induced by coronavirus. *Cell. Microbiol.* **12**, 844–861.
 107. Miller S., Krijnse-Locker J. 2008. Modification of intracellular membrane structures for virus replication. *Nat. Rev. Microbiol.* **6**, 363–374.
 108. Netherton C.L., Wileman T. 2011. Virus factories, double membrane vesicles and viroplasm generated in animal cells. *Curr. Opin. Virol.* **1**, 381–387.
 109. Hsu N.Y., Ilynyska O., Belov G., Santiana M., Chen Y.H., Takvorian P.M., Altan-Bonnet N. 2010. Viral reorganization of the secretory pathway generates distinct organelles for RNA replication. *Cell.* **141**, 799–811.
 110. de Wilde A.H., Raj V.S., Oudshoorn D., Bestebroer T.M., van Nieuwkoop S., Limpens R.W., van den Hoogen B.G. 2013. MERS-coronavirus replication induces severe in vitro cytopathology and is strongly inhibited by cyclosporin A or interferon- α treatment. *J. Gen. Virol.* **94**, 1749–1760.
 111. Neuman B.W., Angelini M.M., Buchmeier M.J. 2014. Does form meet function in the coronavirus replicative organelle? *Trends Microbiol.* **22**, 642–647.
 112. Welsch S., Miller S., Romero-Brey I., Merz A., Bleck C.K., Walther P., Bartenschlager R. 2009. Composition and three-dimensional architecture of the dengue virus replication and assembly sites. *Cell Host Microbe.* **5**, 365–375.
 113. Tenorio R., Fernández de Castro I., Knowlton J.J., Zamora P.F., Lee C.H., Mainou B.A., Dermody T.S., Risco C. 2018. Reovirus σ NS and μ NS proteins remodel the endoplasmic reticulum to build replication neo-organelles. *mBio.* **9**, e01253-18.
 114. Knoops K., Kikkert M., Worm S.H.E. van den, Zevenhoven-Dobbe J.C., van der Meer Y., Koster A.J., Mommaas A.M., Snijder E.J. 2008. SARS-coronavirus replication is supported by a reticulovesicular network of modified endoplasmic reticulum. *PLoS Biol.* **6**, e226.
 115. Gosert R., Kanjanahaluethai A., Egger D., Bienz K., Baker S.C. 2002. RNA replication of mouse hepatitis virus takes place at double-membrane vesicles. *J. Virol.* **76**, 3697–3708.
 116. Verheije M.H., Raaben M., Mari M., Te Lintelo E.G., Reggiori F., van Kuppeveld F.J.M., Rottier P.J.M., de Haan C.A.M. 2008. Mouse hepatitis coronavirus RNA replication depends on GBF1-mediated ARF1 activation. *PLoS Pathog.* **4**, e1000088.
 117. Stokes H.L., Baliji S., Hui C.G., Sawicki S.G., Baker S.C., Siddell S.G. 2010. A new cistron in the murine hepatitis virus replicase gene. *J. Virol.* **84**, 10148–10158.
 118. Sola I., Almazán F., Zúñiga S., Enjuanes L. 2015. Continuous and discontinuous RNA synthesis in coronaviruses. *Annu. Rev. Virol.* **2**, 265–288.
 119. Knorr R.L., Dimova R., Lipowsky R. 2012. Curvature of double-membrane organelles generated by changes in membrane size and composition. *PLoS One.* **7**, e32753.
 120. Helfrich W. 1973. Elastic properties of lipid bilayers: Theory and possible experiments. *Z. Für Naturforschung C.* **28**, 693–703.
 121. Reiss S., Rebhan I., Backes P., Romero-Brey I., Erfle H., Matula P., Bartenschlager R. 2011. Recruitment and activation of a lipid kinase by hepatitis C virus NS5A is essential for integrity of the membranous replication compartment. *Cell Host Microbe.* **9**, 32–45.
 122. Reggiori F., Monastyrska I., Verheije M.H., Cali T., Ulasli M., Bianchi S., Bernasconi R., de Haan C.A.M., Molinari M. 2010. Coronaviruses Hijack the LC3-1-positive EDEMosomes, ER-derived vesicles exporting short-lived ERAD regulators, for replication. *Cell Host Microbe.* **7**, 500–508.
 123. Cottam E.M., Maier H.J., Manifava M., Vaux L.C., Chandra-Schoenfelder P., Gerner W., Britton P., Ktistakis N.T., Wileman T. 2011. Coronavirus nsp6 proteins generate autophagosomes from the endoplasmic reticulum via an omegasome intermediate. *Autophagy.* **7**, 1335–1347.
 124. Axe E.L., Walker S.A., Manifava M., Chandra P., Roderick H.L., Habermann A., Griffiths G., Ktistakis N.T. 2008. Autophagosome formation from membrane compartments enriched in phosphatidylinositol 3-phosphate

- and dynamically connected to the endoplasmic reticulum. *J. Cell Biol.* **182**, 685–701.
125. Prentice E., Jerome W.G., Yoshimori T., Mizushima N., Denison M.R. 2004. Coronavirus replication complex formation utilizes components of cellular autophagy. *J. Biol. Chem.* **279**, 10136–10141.
 126. Ruch T.R., Machamer C.E. 2012. The coronavirus E protein: Assembly and beyond. *Viruses*. **4**, 363–382.
 127. Curtis K.M., Yount B., Baric R.S. 2002. Heterologous gene expression from transmissible gastroenteritis virus replicon particles. *J. Virol.* **76**, 1422–1434.
 128. Almazán F., DeDiego M.L., Sola I., Zuñiga S., Nieto-Torres J.L., Marquez-Jurado S., Andrés G., Enjuanes L. 2013. Engineering a replication-competent, propagation-defective Middle East respiratory syndrome coronavirus as a vaccine candidate. *mBio*. **4**, e00650-00613.
 129. DeDiego M.L., Alvarez E., Almazán F., Rejas M.T., Lamirande E., Roberts A., Enjuanes L. 2007. A severe acute respiratory syndrome coronavirus that lacks the E gene is attenuated in vitro and in vivo. *J. Virol.* **81**, 1701–1713.
 130. Bosch B.J., van der Zee R., de Haan C.A.M., Rotter P.J.M. 2003. The coronavirus spike protein is a class I virus fusion protein: structural and functional characterization of the fusion core complex. *J. Virol.* **77**, 8801–8811.
 131. Hoffmann M., Kleine-Weber H., Schroeder S., Krüger N., Herrler T., Erichsen S., Pöhlmann S. 2020. SARS-CoV-2 cell entry depends on ACE2 and TMPRSS2 and is blocked by a clinically proven protease inhibitor. *Cell*. **181**, 271–280.
 132. Lai A.L., Freed J.H. 2021. SARS-CoV-2 Fusion peptide has a greater membrane perturbing effect than SARS-CoV with highly specific dependence on Ca²⁺. *J. Mol. Biol.* **433**, 166946.
 133. Lai A.L., Millet J.K., Daniel S., Freed J.H., Whittaker G.R. 2017. The SARS-CoV fusion peptide forms an extended bipartite fusion platform that perturbs membrane order in a calcium-dependent manner. *J. Mol. Biol.* **429**, 3875–3892.
 134. Straus M.R., Tang T., Lai A.L., Flegel A., Bidon M., Freed J.H., Daniel S., Whittaker G.R. 2020. Ca²⁺ ions promote fusion of middle east respiratory syndrome coronavirus with host cells and increase infectivity. *J. Virol.* **94**, e00426-20.
 135. Nathan L., Lai A.L., Millet J.K., Straus M.R., Freed J.H., Whittaker G.R., Daniel S. 2020. Calcium ions directly interact with the Ebola virus fusion peptide to promote structure-function changes that enhance infection. *ACS Infect. Dis.* **6**, 250–260.
 136. Madu I.G., Belouzard S., Whittaker G.R. 2009. SARS-coronavirus spike S2 domain flanked by cysteine residues C822 and C833 is important for activation of membrane fusion. *Virology*. **393**, 265–271.

Physico-Chemical Mechanisms of the Functioning of Membrane-Active Proteins of Enveloped Viruses

O. V. Batishchev*

*Frumkin Institute of Physical Chemistry and Electrochemistry,
Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia*

*e-mail: olegbati@gmail.com

Over the past few years, the attention of the whole world has been riveted to the emergence of new dangerous strains of viruses, among which a special place is occupied by coronaviruses that have overcome the interspecies barrier in the past 20 years: SARS viruses (SARS), Middle East respiratory syndrome (MERS), as well as a new coronavirus infection (SARS-CoV-2), which caused the largest pandemic since the Spanish flu in 1918. Coronaviruses are members of a class of enveloped viruses that have a lipoprotein envelope. This class also includes such serious pathogens as human immunodeficiency virus (HIV), hepatitis, Ebola virus, influenza, etc. Despite significant differences in the clinical picture of the course of diseases caused by enveloped viruses, they themselves have a number of characteristic features that determine their commonality. Regardless of the method of penetration into the cell – by endocytosis or direct fusion with the cell membrane – enveloped viruses are characterized by the following stages of interaction with the target cell: binding to receptors on the cell surface, interaction of the surface glycoproteins of the virus with the membrane structures of the infected cell, fusion of the lipid envelope of the virion with plasma or endosomal membrane, destruction of the protein capsid and its dissociation from the viral nucleoprotein. Subsequently, within the infected cell, the newly synthesized viral proteins must self-assemble on its various membrane structures to form a progeny virion. Thus, both the initial stages of viral infection and the assembly and release of new viral particles are associated with the activity of viral proteins in relation to the cell membrane and its organelles. This review is devoted to the analysis of the physicochemical mechanisms of functioning of the main structural proteins of a number of enveloped viruses in order to identify possible strategies for the membrane activity of such proteins at various stages of viral infection of the cell.

Keywords: enveloped viruses, protein–lipid interactions, membrane fusion, SARS-CoV-2 coronavirus, human immunodeficiency virus (HIV), influenza A virus, non-structural proteins of coronaviruses, matrix proteins, capsid proteins

УДК 577.352

ПЕРВЫЕ ШАГИ В РЕГИСТРАЦИИ И ИНТЕРПРЕТАЦИИ ГРАНИЧНОГО ПОТЕНЦИАЛА ЛИПИДНЫХ МЕМБРАН

© 2022 г. Ю. А. Ермаков*

*Институт физической химии и электрохимии
им. А.Н. Фрумкина РАН, Москва, 119071 Россия***e-mail: yury.a.ermakov@gmail.com*

Поступила в редакцию 04.04.2022 г.

После доработки 14.05.2022 г.

Принята к публикации 17.05.2022 г.

Приведены основные этапы развития электрокинетических исследований в лаборатории биоэлектрохимии ИФХЭ РАН, руководимой чл.-корр. РАН Ю.А. Чизмаджевым. Дано краткое описание методики регистрации и анализа результатов измерения электрофоретической подвижности липосом с применением техники динамического светорассеяния. Показано преимущество использования электрокинетических данных в сочетании с измерением граничных потенциалов плоских бислойных липидных мембран с помощью метода компенсации внутримембранного поля. Описаны сведения, полученные в рамках такого подхода при изучении влияния некоторых мембраноактивных ионов и соединений на поверхностную и дипольную компоненты электрического поля на границах липидных мембран с водным окружением.

Ключевые слова: липидные мембраны, липосомы, плоские бислойные липидные мембраны (БЛМ), электрическое поле на границах мембран, граничный потенциал, поверхностная и дипольная компоненты, электрокинетические измерения, компенсация внутримембранного поля (метод КВП)

DOI: 10.31857/S023347552205005X

Биологическая тематика в институте электрохимии АН СССР появилась в 80-е годы прошлого века не случайно. Директор института академик АН СССР А.Н. Фрумкин уже в своих ранних работах проявлял интерес к распределению электрического поля на межфазных границах монослоев жирных кислот с водным раствором и к электрохимическим характеристикам более сложных биологических объектов [1, 2]. В последующие годы фосфолипидные монослойные и бислойные структуры оказались в центре внимания физической химии и активно использовались многими исследователями для построения и изучения липидных моделей клеточных мембран. Стала весьма актуальной разработка новых методов регистрации и количественной оценки их электрических характеристик. Поэтому инициатива группы теоретиков института образовать новую лабораторию под руководством Ю.А. Чизмаджева оказалась очень своевременной, а развитие ее экспериментальной базы было признано наиболее важной задачей. Активное участие Ю.А. Чизмаджева в формировании основных направлений исследований новой лаборатории привело к развитию своевременных представлений о характере и молекулярных механизмах образования электрического поля на межфазных границах липидных мембран.

Одна из очевидных задач биоэлектрохимии – оценить распределение заряда и потенциала на границах мембран. Эта задача предполагает наличие скачка потенциала (потенциал Гальвани) между точками, расположенными в двух фазах: внутри гидрофобной области мембраны и на удалении от ее поверхности в водном растворе электролита, где потенциал принимается обычно равным нулю (рис. 1). Очевидно, что непосредственное измерение абсолютной величины межфазного скачка потенциала принципиально невозможно, и внешними приборами можно зарегистрировать только его изменение в зависимости от условий опыта. В частности, при нанесении липидных монослоев на поверхность водного раствора регистрируется скачок потенциала (Вольта-потенциал), который составляет несколько сотен милливольт. Это электрическое поле существует и на каждой поверхности липидного бислоя в контакте с водным окружением. Наибольший интерес, с точки зрения физической химии и электрохимии, представляет выделение тех компонент этого поля, которые обусловлены особенностями молекулярной структуры межфазной границы, включая гидратацию полярных групп фосфолипидов и адсорбцию неорганических ионов.

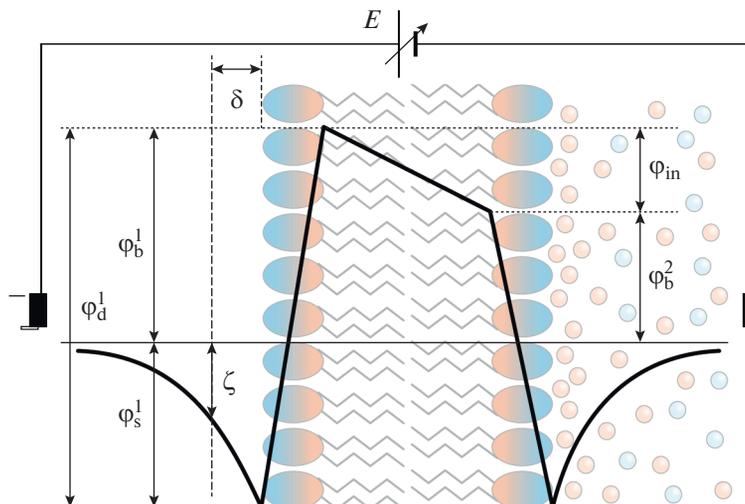


Рис. 1. Распределение электрического поля в липидном бислое, в котором присутствуют отрицательно заряженные анионные фосфолипиды. На каждой границе БЛМ граничный потенциал ϕ_b , содержит поверхностную, ϕ_s , и дипольную, ϕ_d , компоненты. В короткозамкнутой цепи различие граничных потенциалов ϕ_b создает внутримембранное поле ϕ_{in} , которое может быть скомпенсировано внешним источником E . Величина ζ -потенциала меньше поверхностного ϕ_s из-за удаления плоскости скольжения от поверхности на расстояние δ .

На развитие экспериментальной техники, предназначенной для регистрации электростатических свойств липидных мембран, наибольшее влияние оказало наблюдение за изменением электрической емкости плоских бислоидных мембран (БЛМ) при наложении внешнего электрического поля. Заметим, что первое сообщение об этом эффекте принадлежит российским ученым [3], которые привели результаты измерения емкости БЛМ и показали, что она принимает минимальное значение при отсутствии внешнего поля, и возрастает пропорционально квадрату его амплитуды. В дальнейшем были предложены несколько физических моделей, описывающих это явление, которое в конечном итоге было связано с электрострикцией липидного бислоя [4–7]. Теоретическая группа лаборатории биоэлектрохимии приняла самое активное участие в дискуссиях по поводу его физической природы и правомерности различных способов количественного описания. Эта дискуссия была особенно важной, поскольку на основе этого явления в лаборатории были предложены принципиально разные экспериментальные методики, позволяющие регистрировать изменение электрических характеристик БЛМ, вызванных проникновением ионов электролита в полярную область мембран и их влиянием на распределение электрического поля. В одном случае предлагалось накладывать на БЛМ линейно растущее электрическое напряжение и визуально контролировать положение минимума емкости мембраны [8], в другом варианте экспериментальной установки появление минимума фиксировалось по нулевой амплитуде второй гармоники емкостного тока [9]. Последний вариант оказался более

удобным для объективного контроля разности граничных потенциалов плоских БЛМ в котором используется принцип компенсации внутримембранного поля (КВП) внешним источником напряжения. В частности, этот способ позволил непрерывно регистрировать кинетику изменений граничного потенциала с одной стороны мембраны при повышении концентрации мембраноактивных соединений. Эта возможность становится принципиально важной для оценки обратимости их адсорбции с помощью непрерывной перфузии ячейки [10], например при изучении адсорбции заряженных макромолекул [11] (рис. 2). Важно отметить, что оба метода позволяли оценить изменение разности граничных потенциалов на БЛМ в асимметричных условиях, когда на одной стороне мембраны варьировалась концентрация биологически значимых многовалентных ионов. Тем не менее оставался открытым вопрос, как сопоставить эти изменения с существующими представлениями о влиянии состава электролита на заряджение межфазной поверхности мембран и ожидаемыми эффектами, связанными с гидратацией липида и ориентацией дипольных моментов в полярной области. Для этого важно выделить их влияние на разные по физической природе составляющие граничного потенциала, ϕ_b , которые условно можно отнести к поверхностной, ϕ_s , и дипольной, ϕ_d , компонентам (рис. 1). Этот вопрос, безусловно, интересовал Ю.А. Чизмаджева и возглавляемую им группу теоретиков, хотя стало достаточно очевидным, что решение этой проблемы в значительной степени остается за экспериментом.

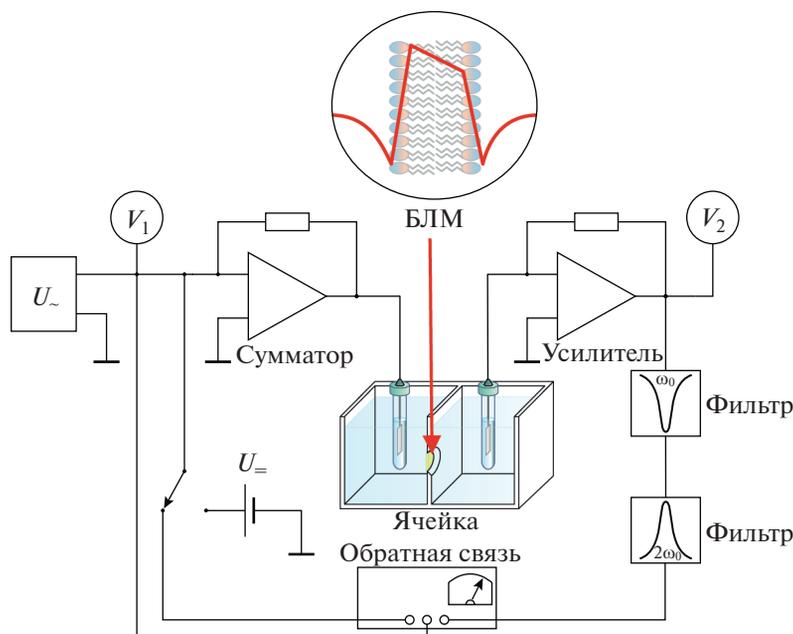


Рис. 2. Примерная схема регистрации разности граничных потенциалов БЛМ методом компенсации внутримембранного поля от внешнего источника с применением отрицательной обратной связи для минимизации амплитуды второй гармоники переменного тока.

Одним из наиболее эффективных методов регистрации адсорбции ионов на заряженных поверхностях являются электрокинетические измерения в коллоидных суспензиях, в частности, липосом фосфолипидов. К моменту образования лаборатории основные экспериментальные данные об электрокинетической подвижности липосом в растворах разных электролитов и методика их анализа были уже опубликованы в серии работ С. Маклафлина (S. McLaughlin) [12–14]. Предстояло их осмыслить и сопоставить с результатами применения новых методов, разработанных сотрудниками лаборатории. И, конечно, было особенно важно самостоятельно формулировать условия измерений и получения результатов электрокинетическими методами. Эта задача казалась вполне реальной и даже очень перспективной, поскольку на одной из ежегодных научных выставок появилась первая информация о новом оборудовании английской компании Malvern Ins., основанном на новом принципе регистрации электрофоретической подвижности заряженных частиц в коллоидных суспензиях с использованием регистрации динамических характеристик светорассеяния. Ю.А. Чизмаджев приложил незаурядные усилия, чтобы убедить Президиум АН СССР выделить значительные средства для вновь образованной лаборатории биоэлектрохимии для приобретения самой первой версии нового оборудования этой компании. Прибор (Zetasizer-2) был закуплен и до настоящего времени активно используется для решения многих экспериментальных задач. Как стало извест-

но из личного контакта с инженерами этой компании, эта закупка оказала влияние и на ее дальнейшее развитие. К настоящему времени она стала одним из крупнейших производителей научного оборудования.

Физический принцип электрокинетических измерений достаточно прост и основан на регистрации автокорреляционных характеристик рассеяния света в коллоидной суспензии (рис. 3). Для этого используется коррелятор, который характеризует динамическую характеристику излучения в виде автокорреляционной функции, форма которой близка к экспоненциальной, когда единственной причиной флуктуаций интенсивности рассеянного света является случайное (броуновское) движение коллоидных частиц. Для регистрации направленного движения частиц в электрическом поле используется регистрация света, рассеянного в той точке в глубине ячейки, где пересекаются два лазерных пучка и образуется система интерференционных полос. Когда заряженные частицы перемещаются внешним полем поперек этих полос, появляются периодические флуктуации амплитуды рассеянного ими излучения с частотой, которая прямо связана со скоростью направленного перемещения частиц. Эти флуктуации меняют форму автокорреляционной функции, при численной обработке которой осуществляется Фурье-преобразование и определяется спектр подвижности коллоидных частиц в шкале частот, пропорциональной величине электрического ζ -потенциала частиц. Важно отметить,

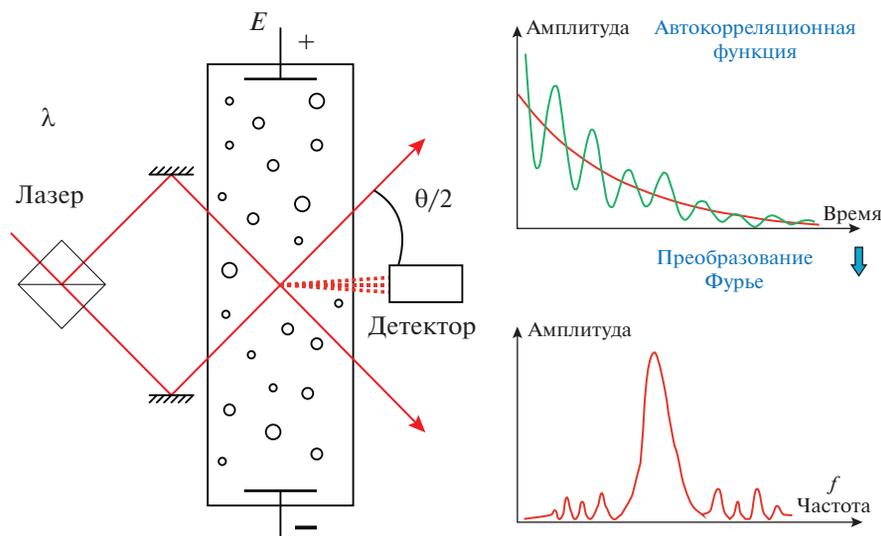


Рис. 3. Условная схема регистрации электрокинетической подвижности коллоидных частиц (липосом) с применением техники анализа динамических характеристик рассеяния света. Слева – оптическая схема, справа – примерный вид автокорреляционной функции и результата ее Фурье-преобразования.

что в оптической схеме первоначальной версии прибора, созданного компанией Malvern, предусмотрено перемещение точки пересечения лучей лазера на некоторое расстояние от стенки ячейки в стационарную плоскость, где, согласно гидродинамическим условиям, жидкость остается неподвижной и, тем самым, устраняется эффект электродиффузии. К сожалению, в приборах нового поколения размеры ячейки не позволяют фиксировать это положение, что, в частности, затрудняет определение точки нулевого заряда частиц. В некоторых публикациях этот фактор не учитывался и потому приводил к выводам, противоречащим классическим представлениям о влиянии ионного состава среды на распределение электрического поля вблизи заряженной поверхности [15].

Описанный выше принцип в очень кратком виде был представлен в инструкции к прибору, где предлагался способ настройки и контроля оптической схемы измерения. Однако краткость изложения материала предполагала достаточно высокую квалификацию пользователя, и простого перевода инструкции, использованного группой И.Г. Абидора для первоначальной настройки прибора, было явно недостаточно. Более того, в некоторых случаях пояснения в инструкции оказались напрямую связанными с местными условиями в небольшом английском поселке Malvern. Например, предлагалось для настройки использовать некую пленку, доступную, как потом оказалось, его жителям. Неудивительно поэтому, что при настройке прибора возникли неожиданные трудности, а соответствующую пленку не удалось обнаружить даже в итоге специально организованной командировки Ю.А. Чизмаджера в Англию. Все

эти трудности удалось преодолеть, когда для настройки прибора были использованы стандартные приемы юстировки оптического оборудования, и были выставлены все ключевые характеристики оптической схемы согласно физически ясным критериям, которые, конечно, не противоречили и первоначальной инструкции. Правильность юстировки подтвердил затем инженер компании Malvern, приглашенный в лабораторию из очередной международной выставки научного оборудования, который оставил также важные комментарии к использованному в нем программному обеспечению.

Следующая задача при освоении оборудования состояла в проверке результатов измерений и их сопоставлении с литературными данными. Наилучшим способом оказалось прямое воспроизведение условий измерений, подробно описанных в одной из фундаментальных публикаций с участием С. Маклафлина [13]. Эти измерения, проведенные на новом оборудовании, привели к результатам, весьма близким к литературным, хотя в их обработке был предложен несколько иной подход [16, 17]. При посещении лаборатории в 1989 году С. Маклафлин внимательно ознакомился с прибором и принципом измерений, который в значительной степени отличался от использованного им прямого микроскопического наблюдения липосом и регистрации их скорости в ручном режиме. Тот факт, что полученные на новом оборудовании экспериментальные данные с хорошей точностью совпали с его собственными, убедили и его, и нас в правомерности применения новых принципов измерений и способов их представле-

ния в виде оценки динамических характеристик упругого светорассеяния.

Важным шагом в развитии наших представлений о межфазной границе липидных мембран стал анализ экспериментальных фактов, свидетельствующих о влиянии неорганических катионов на электрическую структуру этой границы. Это стало возможным при совместном использовании электрокинетических измерений и регистрации разности граничных потенциалов с обеих сторон плоских БЛМ (рис. 4). Разработанный в лаборатории метод КВП и методика анализа результатов с учетом электрокинетических измерений достаточно подробно описаны в обзоре [18]. Один из первых результатов с применением такого подхода был получен при измерении адсорбции популярного в то время потенциал чувствительного флуоресцентного зонда 1-анилин-8-нафталенсульфоната (АНС) как на плоских БЛМ методом КВП, так и липосомах, электрокинетическая подвижность которых была измерена классическим микроскопическим методом на оборудовании Parmoquant-2 (Carl Zeiss, Jena) [19]. Полученные данные в явном виде обнаружили заметное различие между влиянием ионной силы раствора на граничный потенциал БЛМ и ζ -потенциал липосом в присутствии АНС, оценка которого проводилась в рамках модели Гуи—Чепмена. Для описания указанного различия была предложена простая модель, учитывающая небольшое погружение зонда в полярную область мембраны. Теоретически эта модель представлялась достаточно спорной, поскольку в ней никак не учитывались казавшиеся очевидными особенности строения межфазной границы, например, изменение диэлектрической проницаемости в ее окрестности и дискретное распределение заряда вдоль поверхности. Ю.А. Чизмаджев предложил теоретикам лаборатории доработать модель, включая условие дискретного распределения молекул АНС на поверхности. Стало очевидным, что это условие вносит дополнительные параметры в модель, которые лишь немного улучшают описание экспериментальных данных [20]. Однако наибольшие возражения у теоретиков вызывал тот параметр модели Гуи—Чепмена, который характеризует гидродинамическое условие подвижности заряженных частиц. Согласно многим экспериментальным данным, в рамках этой модели удаление плоскости скольжения от поверхности оказывается практически одинаковым при адсорбции на поверхности мембран самых различных ионов и молекул и описывается параметром δ , величина которого (0.2 нм) близка к размерам молекул воды. В частности, нами были проведены измерения граничного потенциала БЛМ и электрофоретической подвижности липосом из фосфатидилхолина в присутствии бериллия, наименьшего из двухвалентных катионов, а также некоторых биологически значимых двухва-

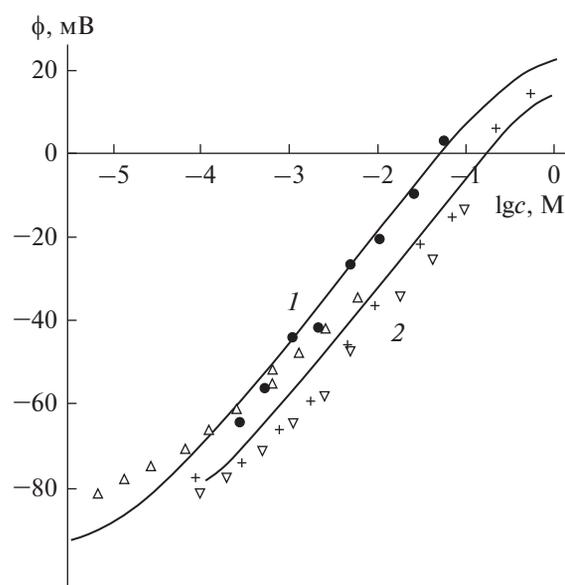


Рис. 4. Значения поверхностного потенциала, рассчитанные по результатам измерений ζ -потенциала с учетом положения плоскости скольжения на расстоянии 0.2 нм от поверхности для липосом из PS в растворах NiSO_4 (темные точки) и MgCl_2 (крестики). Изменение граничного потенциала, измеренное на плоских БЛМ в тех же растворах, представлено светлыми точками, смещенными на величину поверхностного потенциала (-85 мВ), найденного по измерению ζ -потенциала липосом в фоновом электролите (0.1 М KCl, 20 мМ имидазол, pH 6.4). Теоретические кривые построены с константами связывания, равными 10 и 5 M^{-1} для ионов никеля и магния соответственно, с учетом конкурентной адсорбции ионов кальция с константой 0.2 M^{-1} [21]

лентных катионов [21] (рис. 4, 5). Как оказалось, изменение граничного потенциала в этих случаях происходит только благодаря изменению поверхностной плотности заряда и потенциала ϕ_s , которое отражается непосредственно на электрокинетических измерениях. При этом мы получили прекрасное совпадение данных двух методов именно при том значении $\delta = 0.2$ нм, которое ранее было использовано в классических работах С. Маклафлина. Им же была проведена оценка нескольких факторов, которые могли бы повлиять на оценку поверхностного потенциала в рамках нескольких альтернативных физических моделей [22–24]. Конечно, любая модификация модели Гуи—Чепмена приводит к увеличению количества параметров системы и при этом лишь незначительно улучшает описание электрокинетических данных. Поскольку их точность всегда ограничена, для количественного анализа данных вполне достаточно эмпирических параметров, используемых в классической модели Гуи—Чепмена. Область применимости этой модели для анализа адсорбции на мембранах разных биологически зна-

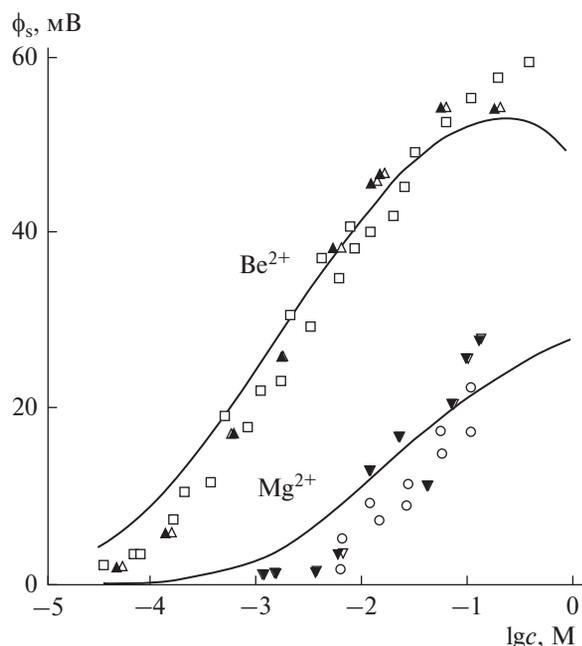


Рис. 5. Изменения поверхностного потенциала плоских БЛМ (темные треугольники) и липосом из фосфатидилхолина в присутствии фонового электролита (0.1 М КСl, 20 мМ имидазола, рН 6.4), построенные с учетом измеренных значений ζ -потенциала в плоскости скольжения на расстоянии 0.2 нм. Теоретические кривые построены в рамках модели Гуи–Чепмена, дополненной изотермой Ленгмюра с константами связывания 400 и 5 М⁻¹ для катионов Be^{2+} и Mg^{2+} соответственно [21].

чимых объектов подробно исследована нами в обзоре [25].

Завершая этот краткий обзор первых шагов в изучении электрической структуры межфазных границ, необходимо отметить значительные усилия Ю.А. Чизмаджева в организации экспериментальных и теоретических исследований в этой области физической химии, которая получила название биоэлектрохимии. Конечно, эмпирические методы анализа электростатических явлений на границах мембран всегда вызывали критику Ю.А. Чизмаджева и его теоретической группы. Более приемлемыми для развития новых теоретических подходов оказались такие явления, как электропорация мембран, влияние физических факторов на их проницаемость, в том числе при наличии белков, обеспечивающих трансмембранный перенос веществ. Эти направления исследований представлялись более привлекательными для оценки роли мембран в биохимии клеток и для разработки новых биомедицинских приложений. Тем не менее развитый в лаборатории подход к изучению электрической структуры межфазной границы оказался достаточно продуктивным и привел к заметным успехам в последующие годы.

Сравнительно недавно стало понятным участие неорганических ионов в организации распределения электрического поля в полярной области мембран и важная роль молекул воды, формирующих систему водородных связей [26, 27]. Более того, удалось доказать влияние некоторых мембрано-активных катионов (Gd^{3+} и Be^{2+}) не только на величину поверхностного заряда и потенциала мембран, но и на структуру самой границы. Наиболее ярко это проявилось в значительном, до 140 мВ, изменении дипольной компоненты граничного потенциала мембран, в составе которых присутствуют молекулы фосфатидилсерина (PS). Ее величина была рассчитана как разность изменений граничного потенциала плоских БЛМ и поверхностного потенциала липосом, найденного в рамках модифицированной нами модели Гуи–Чепмена по результатам электрокинетических измерений [28]. Эти наблюдения в дальнейшем были подтверждены измерением Вольта-потенциала липидных монослоев и было доказано, что адсорбция обоих катионов вызывает фазовый переход в мембране, который сопровождается конденсацией молекул PS. Удалось экспериментально показать, что это явление приводит к “замораживанию” мембранных белков и блокированию механочувствительных каналов *Escherichia coli* [29], а также к нарушению первых стадий апоптоза в результате маскировки молекул PS на поверхности клеток и, следовательно, к серьезному заболеванию бериллиозу [30]. Недавно с применением метода малоуглового рассеяния рентгеновского излучения на липидных монослоях димиристоил-производных фосфатидилсерина удалось получить важные сведения о структурном различии жидкокристаллического и конденсированного состояния монослоя, которое проявляется в значительном увеличении дипольной компоненты граничного потенциала. Анализ структуры монослоя методами молекулярной динамики позволил установить конкретные изменения в гидратационной оболочке фосфолипида, которые ответственны за изменение граничного потенциала и его дипольной компоненты [31]. Тем самым удалось завершить многолетние исследования в этом направлении и получить ответы на вопросы, возникшие уже на первых шагах применения биоэлектрохимических методов, разработанных в нашей лаборатории. Высокая информативность этих методов широко используется в настоящее время при изучении адсорбции на липидных мембранах заряженных полимеров и полипептидов [32]. Для количественного анализа экспериментальных данных разрабатываются новые теоретические модели сотрудниками теоретической группы, созданной и выпестованной Ю.А. Чизмаджевым.

Конфликт интересов. Автор декларирует отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Источники финансирования. Работа поддержана темой АААА-А20-120101090002-4, запланированной в ИФХЭ РАН Министерством науки и образования России.

Соответствие принципам этики. Статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Фрумкин А.Н. 1925. К вопросу о строении поверхностного слоя. Часть 4. Электрические свойства мономолекулярных слоев. В кн.: *Сборник работ по чистой и прикладной химии*. Ред. Бах А.Н. Петроград: Химический ин-т им. Л.Я. Карпова, с. 75–87.
2. Фрумкин А.Н. 1925. К вопросу о строении поверхностного слоя. Часть 5. Об одном способе проверки уравнения Гиббса. В кн.: *Сборник работ по чистой и прикладной химии*. Ред. Бах А.Н. Петроград: Химический ин-т им. Л.Я. Карпова, с. 88–89.
3. Babakov A.V., Ermishkin L.N., Liberman E.A. 1966. Influence of electric field on the capacity of phospholipid membranes. *Nature*. **210**, 953–955.
4. Alvarez O., Latorre R. 1978. Voltage-dependent capacitance in lipid bilayers made from monolayers. *Biophys. J.* **21** (1), 1–17.
5. Берестовский Г.Н. 1981. Электрострикция плоских липидных мембран и модули упругости. *Биофизика*. **26**, 474–480.
6. Пасечник В.И. 1981. Электрострикционные измерения вязкоупругих свойств бислойных липидных мембран. В кн.: *Биофизика мембран*. М.: ВИНТИ, с. 267–305.
7. Лейкин С.Л. 1985. Тепловые колебания и емкость бислойных липидных мембран в электрическом поле. *Биол. мембраны*. **2**, 222–233.
8. Абидор И.Г., Айтъян С.Х., Черномордик Л.В., Черный В.В., Чизмаджев Ю.А. 1979. Измерение внутримембранного скачка потенциала потенциодинамическим методом. *ДАН СССР*. **245**, 977–981.
9. Соколов В.С., Кузьмин С.Г. 1980. Измерение разности поверхностных потенциалов бислойных липидных мембран по второй гармонике емкостного тока. *Биофизика*. **25**, 170–172.
10. Ермаков Ю.А., Юсипович А.И. 2002. Граничный потенциал и натяжение плоских БЛМ в присутствии гадолиния. Регистрация в условиях непрерывной перфузии ячейки. *Биол. мембраны*. **19** (6), 541–548.
11. Marukovich N., McMurray M., Finogenova O., Nesterenko A., Batishchev O., Ermakov Yu. 2013. Interaction of polylysines with the surface of lipid membranes: The electrostatic and structural aspects. In: *Advances in planar lipid bilayers and liposomes*. Ed. Iglic A., Genova J. Amsterdam, London, San Diego: Elsevier, p. 139–166.
12. McLaughlin S. 1977. Electrostatic potentials at membrane-solution interfaces. In: *Current topics membranes and transport*. Ed. Bronnen F., Kleinzeller A. Cambridge: Acad. Press, p. 71–144.
13. Eisenberg M., Gresalfi T., Riccio T., McLaughlin S. 1979. Adsorption of monovalent cations to bilayer membranes containing negative phospholipids. *Biochemistry*. **18** (23), 5213–5223.
14. McLaughlin S., Mulrine N., Gresalfi T., Vaio G., McLaughlin A. 1981. Adsorption of divalent cations to bilayer membranes containing phosphatidylserine. *J. Gen. Physiol.* **77**, 445–473.
15. Maity P., Saha B., Kumar G.S., Karmakar E. 2016. Binding of monovalent alkali metal ions with negatively charged phospholipid membranes. *Biochem. Biophys. Acta*. **1858**, 706–714.
16. Ermakov Y.A. 1990. The determination of binding site density and association constants for monovalent cation adsorption onto liposomes made from mixtures of zwitterionic and charged lipids. *Biochim. Biophys. Acta*. **1023** (1), 91–97.
17. Ермаков Ю.А. 1990. Определение констант адсорбции и плотности центров связывания одновалентных катионов на поверхности липосом. *Электрохимия*. **26** (2), 212–221.
18. Ermakov Yu.A., Sokolov V.S. 2003. Boundary potentials of bilayer lipid membranes: Methods and interpretations. In: *Planar lipid bilayers (BLMs) and their applications*. Ed. Tien H.T., Ottova A. Amsterdam: Elsevier, p. 109–141.
19. Ермаков Ю.А., Черный В.В., Соколов В.С., Татулян С.А. 1983. Граничные потенциалы на липидных мембранах в присутствии ионов 1-анилино-8-нафталенсульфоната. *Биофизика*. **28** (6), 1010–1013.
20. Козлов М.М., Черный В.В., Соколов В.С., Ермаков Ю.А., Маркин В.С. 1983. Теория адсорбции гидрофобных ионов в БЛМ с учетом их латерального взаимодействия и дискретности зарядов. *Биофизика*. **28** (1), 61–66.
21. Ермаков Ю.А., Черный В.В., Соколов В.С. 1992. Адсорбция бериллия на нейтральных и заряженных липидных мембранах. *Биол. мембраны*. **9**, 201–213.
22. Cafiso D., McLaughlin A., McLaughlin S., Winiski A. 1989. Measuring electrostatic potentials adjacent to membranes. *Methods Enzymol.* **171**, 342–364.
23. Kim J., Mosior M., Chung L.A., Wu H., McLaughlin S. 1991. Binding of peptides with basic residues to membranes containing acidic phospholipids. *Biophys. J.* **60** (1), 135–148.
24. McLaughlin S. 1989. The electrostatic properties of membranes. *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* **18**, 113–136.
25. Ермаков Ю.А. 2000. Равновесие ионов вблизи липидных мембран – эмпирический анализ простейшей модели. *Коллоид. журн.* **6** (4), 437–449.
26. Марукович Н.И., Нестеренко А.М., Ермаков Ю.А. 2014. Структурные факторы во взаимодействии лизина и полилизина с липидными мембранами. *Биол. мембраны*. **31** (6), 401–409.
27. Нестеренко А.М., Ермаков Ю.А. 2012. Молекулярная динамика фосфолипидных мембран: распределение ионов вблизи границы нейтрального и заряженного жидкокристаллического бислоя. *Биол. мембраны*. **29** (5), 374–384.
28. Ermakov Y.A., Makhmudova S.S., Averbakh A.Z. 1998. Two components of boundary potentials at the lipid membrane surface: Electrokinetic and complementary

- methods studies. *Colloids and Surfaces A—Physicochemical and Engineering Aspects*. **140** (1–3), 13–22.
29. Ermakov Y.A., Kamaraju K., Sengupta K., Sukharev S. 2010. Gadolinium ions block mechanosensitive channels by altering the packing and lateral pressure of anionic lipids. *Biophys. J.* **98** (6), 1018–1027.
 30. Ermakov Yu., Kamaraju K., Dunina-Barkovskaya A., Vishnyakova K., Egorov Y., Anishkin A., Sukharev S. 2017. High-affinity interactions of beryllium (2+) with phosphatidylserine result in a cross-linking effect reducing surface recognition of the lipid. *Biochemistry*. **56**, 5457–5470.
 31. Ermakov Yu.A., Asadchikov V.E., Roshchin B.S., Volkov Yu.O., Khomich D.A., Nesterenko A.M., Tikhonov A.M. 2019. Comprehensive study of the LE-LC phase transition in DMPS monolayers: Surface pressure, Volta potential, X-ray reflectivity and MD modeling. *Langmuir*. **35**, 12326–12338.
 32. Molotkovsky R.J., Galimzyanov T.R., Ermakov Yu.A. 2021. Heterogeneity in lateral distribution of polycations at the surface of lipid membrane: From the experimental data to the theoretical model. *MDPI, Materials*. **14**, 6623.

First Steps in Detection and Interpretation of the Lipid Membrane Boundary Potential

Yu. A. Ermakov*

Frumkin Institute of Physical Chemistry and Electrochemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia

**e-mail: yury.a.ermakov@gmail.com*

The main stages in the development of electrokinetic studies at the Laboratory of Bioelectrochemistry of the Institute of Physical Chemistry, Russian Academy of Sciences, headed by corr. member of RAS Yu.A. Chizmadzhev, are described. Methods of recording and analyzing the results of measuring the electrophoretic mobility of liposomes using dynamic light scattering techniques are briefly overviewed. The advantage of using electrokinetic data in combination with the measurement of the boundary potentials of planar bilayer lipid membranes using the intramembrane field compensation method has been shown. The data obtained in the framework of this approach is illustrated by studies of effects of some membrane-active ions and compounds on the surface and dipole components of the electric field at the lipid membrane interfaces with an aqueous environment.

Keywords: lipid membranes, liposomes, planar bilayer lipid membranes (BLM), electric field at the membrane interface, boundary potential, surface and dipole components, electrokinetic measurements, intramembrane field compensation (IFC) method

УДК 577.352

ИССЛЕДОВАНИЯ ЭЛЕКТРОГЕННОГО ИОННОГО ТРАНСПОРТА В Na^+ , K^+ -АТФ-азе НА БИСЛОЙНЫХ ЛИПИДНЫХ МЕМБРАНАХ ИМПЕДАНСНЫМ МЕТОДОМ

© 2022 г. В. С. Соколов*

*Институт физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина РАН, Москва, 119071 Россия***e-mail: sokolovvs@mail.ru*

Поступила в редакцию 04.05.2022 г.

После доработки 24.05.2022 г.

Принята к публикации 26.05.2022 г.

Рассмотрены результаты исследования электрогенного транспорта, осуществляемого Na^+ , K^+ -АТФ-азой – белком, обеспечивающим активный транспорт ионов Na^+ и K^+ через мембраны клеток. Основной вклад в электрический ток при функционировании Na^+ , K^+ -АТФ-азы вносит перемещение ионов натрия в каналах доступа – каналоподобных структурах, соединяющих центры связывания ионов с растворами. Электрогенный транспорт изучали на модельной системе, состоящей из бислойной липидной мембраны с адсорбированными на ней фрагментами мембран, содержащих Na^+ , K^+ -АТФ-азу. Применение импедансного метода для изучения электрогенного транспорта, осуществляемого Na^+ , K^+ -АТФ-азой позволило изучить каналы доступа ионов в этом белке. Большой вклад в эти исследования внес Ю.А. Чизмаджев, при активном участии которого разрабатывалась теоретическая модель транспорта ионов Na^+ , K^+ -АТФ-азой, частично рассматриваемая в данной работе.

Ключевые слова: Na^+ , K^+ -АТФ-аза, электрогенный транспорт, каналы доступа, импеданс**DOI:** 10.31857/S0233475522050115

ВВЕДЕНИЕ

Исследования ионного транспорта через мембрану начали интенсивно развиваться, с тех пор как в 1963 году был описан способ формирования бислойной липидной мембраны – простой и удобной для измерения электрических токов модели биологической мембраны [1]. Эта мембрана представляет собой хороший изолятор, но если в нее встроить белки или более простые соединения, мембрана может начать проводить электрический ток, измеряя который можно исследовать механизмы ионной проницаемости мембраны, индуцированной этими соединениями. В Институте электрохимии такие исследования начались по инициативе А.Н. Фрумкина и значительно ускорились благодаря Ю.А. Чизмаджеву после того, как была организована лаборатория биоэлектрохимии. Исследования проводились как на теоретическом, так и на экспериментальном уровне. Первоначально их предметом были простые соединения и пептиды, делающие мембрану проницаемой для ионов щелочных металлов или водорода. Теоретические модели такого транспорта были изложены в монографии [2]. В дальнейшем предметом исследований стали более сложные виды пассивного обменного транспорта ионов калия и водорода, индуцированного соединениями нигерицинового ряда

[3–5], активный транспорт протонов, осуществляемый бактериородопсином [6], и Na^+ , K^+ -АТФ-аза, осуществляющая активный транспорт ионов калия и натрия. Несмотря на то что этот белок представляет собой довольно сложную молекулярную машину, цикл функционирования которой включает переходы между большим числом состояний, оказалось, что отдельные стадии осуществляемого ею транспорта электрогенны, т.е. сопровождаются переносом внутри мембраны электрического заряда, и их можно изучать сравнительно простыми методами. Было показано, что активный транспорт ионов осуществляется за счет последовательного открывания и закрывания особых структур в белке, напоминающих ионные каналы, закрытые с одного конца. Они получили название “каналы доступа”. Каналы доступа обеспечивают перенос ионов калия или натрия к центрам связывания в белке. Сам цикл функционирования получил название “цикл Алберса–Поста” [7] (рис. 1). Наиболее существенной особенностью цикла Алберса–Поста является наличие двух основных конформаций белка E1 и E2, в которых открыт доступ ионов к центрам связывания либо из цитоплазмы, либо из внеклеточной среды. Конформационный переход из E1 в E2 происходит в результате гидролиза АТФ, причем освободившийся в

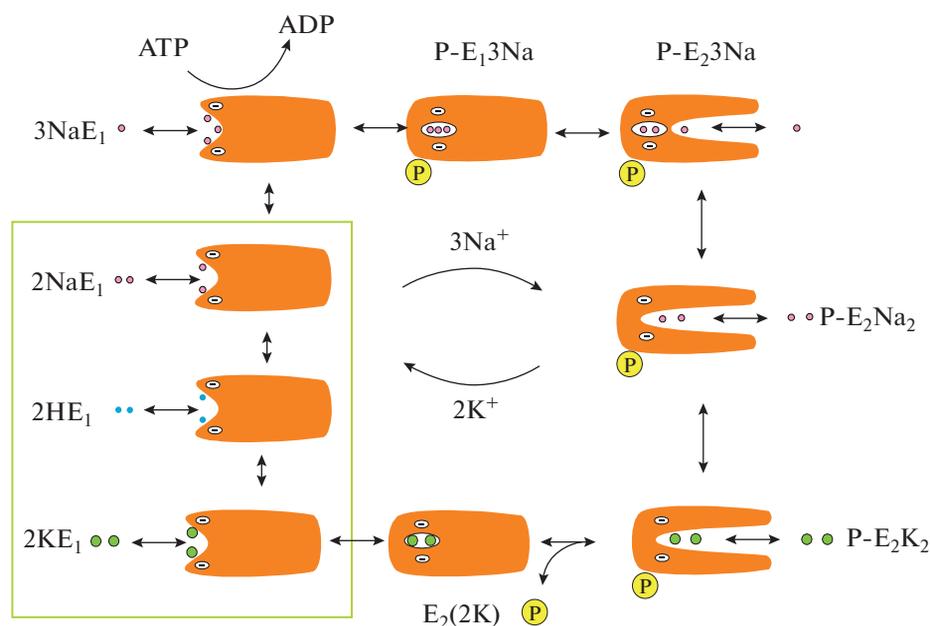


Рис. 1. Упрощенная схема транспорта ионов натрия Na^+ , K^+ -АТФ-азой на основе ферментативного цикла Алберса—Поста, модифицированного согласно [18]. Левая сторона диаграммы отражает реакции на цитоплазматической стороне мембраны, правая — на внеклеточной стороне. Символы E1 и E2 обозначают две основные конформации белка, стрелки указывают переходы между состояниями. В прямоугольной рамке представлены гипотетические состояния Na^+ , K^+ -АТФ-азы, в которых для осуществления транспорта ионов могут принимать участие протоны.

результате фосфат остается связанным с белком (происходит фосфорилирование) и освобождается только при обратном переходе из E2 в E1. Первоначально цикл Алберса—Поста был установлен в результате биохимических исследований в виде формальной схемы, но затем методами рентгеновского рассеяния были установлены структуры белка в разных состояниях этого цикла [8–13]. По схожему механизму функционирует целый ряд белков, осуществляющих активный транспорт различных ионов [14–17].

ЭЛЕКТРОГЕННЫЙ ТРАНСПОРТ, ОСУЩЕСТВЛЯЕМЫЙ Na^+ , K^+ -АТФ-азой

Значительный прогресс в исследованиях электрогенного транспорта, осуществляемого Na^+ , K^+ -АТФ-азой, был достигнут после публикаций 1980-х годов нескольких групп из Германии и США. Было показано, что перенос ионов в каналах доступа между раствором и центром связывания в белке является электрогенным и происходит пассивно, т.е. на распределение ионов между центром связывания и раствором можно влиять, прикладывая к мембране электрическое поле [19–22]. Скачкообразное изменение напряжения на мембране с Na^+ , K^+ -АТФ-азой приводит к появлению переходного электрического тока, вызванного перераспределением ионов между центром связывания и раствором, и заканчивающимся установле-

нием нового равновесия. Изучение этого процесса, впервые открытого в электрофизиологических исследованиях на изолированных клетках сердечных миоцитов [23], давало возможность узнать свойства канала доступа, скорость переноса в нем ионов и оценить глубину канала. Информацию о глубине канала доступа можно получить, определив “диэлектрический коэффициент”, который характеризует “степень электрогенности” процесса переноса ионов в канале. Этот параметр определяет относительную глубину, в которой происходит в мембране перенос заряда, по вкладу этого перемещения заряда в мембране в измеряемый электрический ток. К сожалению, это не совсем глубина канала: вклад в ток, регистрируемый во внешней цепи, зависит не только от величины смещения заряда, но и от поляризуемости среды, в которой это смещение происходит [19, 24]. Диэлектрический коэффициент определяет, какая часть приложенного к мембране напряжения влияет на перенос заряда в белке, либо во сколько раз меньший заряд должен быть перенесен во внешней цепи в условиях короткозамкнутой цепи по сравнению с зарядом, перенесенным внутри белка [25]. Изучение электрогенного транспорта проводили на изолированных клетках сердечных миоцитов, ооцитов, гигантских аксонов кальмара, а также на изолированных фрагментах мембран (методом patch-clamp) [26–28]. Из-за того что электрический ток, генерируемый Na^+ , K^+ -АТФ-азой,

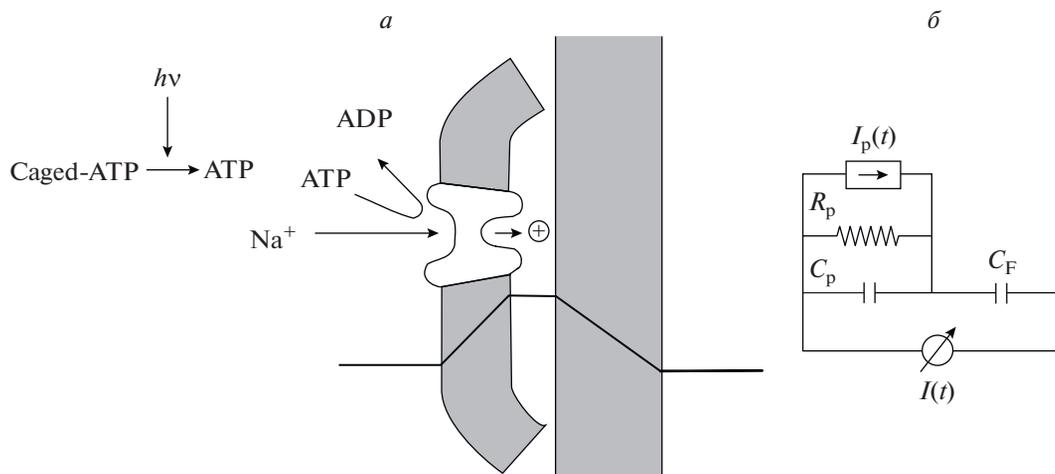


Рис. 2. *а* – Схематическое изображение БЛМ с адсорбированным мембранным фрагментом, содержащим Na^+, K^+ -АТФ-азу [25]. Сплошной линией показан профиль электрического потенциала, возникающий в результате зарядки контактирующих мембран при переносе ионов Na^+, K^+ -АТФ-азой в условиях коротко замкнутой цепи. *б* – эквивалентная электрическая схема: C_p – суммарная емкость адсорбированных на БЛМ мембранных фрагментов, содержащих Na^+, K^+ -АТФ-азу; C_F – емкость области БЛМ, контактирующей с фрагментами; $I_p(t)$ – ток, генерируемый всеми активными Na^+, K^+ -АТФ-азами; $I(t)$ – ток, регистрируемый в эксперименте.

мал по сравнению с типичными токами, регистрируемыми в ионных каналах, стандартный метод patch-clamp оказался неприменим, и для регистрации таких токов был разработан метод “giant patch-clamp”, позволивший намного увеличить площадь изолированного фрагмента мембраны [29, 30].

ИССЛЕДОВАНИЯ НА БИСЛОЙНЫХ МЕМБРАНАХ

На бислойных липидных мембранах (БЛМ) изучение Na^+, K^+ -АТФ-азы началось с работ двух групп в Германии [31, 32]. Встроить Na^+, K^+ -АТФ-азу в липидный бислой не удалось, и фрагменты мембран, содержащие этот белок, адсорбировали на поверхности БЛМ, в результате чего образовывалась двухслойная структура (рис. 2).

Одна из сторон мембраны с Na^+, K^+ -АТФ-азой при этом обращена в щель между ней и БЛМ. Такая структура не позволяет контролировать напряжение на мембране с Na^+, K^+ -АТФ-азой и регистрировать проходящий через нее постоянный электрический ток, но в ней можно регистрировать переменный ток в условиях короткозамкнутой цепи. Он возникает из-за того, что перемещение заряда в белке приводит к изменению заряда электрической емкости мембранного фрагмента, содержащего Na^+, K^+ -АТФ-азу, и для его компенсации во внешней цепи происходит перемещение заряда в обратном направлении, которое и регистрируется в эксперименте. Для того чтобы инициировать возникновение переходных токов в

Na^+, K^+ -АТФ-азе, были использованы так называемые “Caged” – соединения [33], в которых субстрат, необходимый для функционирования Na^+, K^+ -АТФ-азы, быстро освобождался из неактивного комплекса под действием вспышки ультрафиолетового света. Наиболее популярным соединением был Caged-АТФ, позволяющий “включать” Na^+, K^+ -АТФ-азу с помощью быстрого освобождения молекул АТФ. Позднее для изучения Na^+, K^+ -АТФ-азы стали применять другие соединения: Caged-Р для быстрого освобождения фосфата [34], а также Caged- H^+ для быстрого изменения рН.

Данная модельная система была использована в лаборатории биоэлектрохимии для изучения Na^+, K^+ -АТФ-азы. Исследования были начаты по инициативе Ю.А. Чизмадзе. Большую помощь оказал профессор Х.Ю. Апель из Университета г. Констанц (Германия). В начале исследований уже было известно, что электрические токи возникают в Na^+, K^+ -АТФ-азе в отсутствие ионов калия, когда белок не может совершать полный цикл функционирования, и основной вклад в электрический ток в этих условиях вносит перемещение ионов натрия в канал доступа, открытым с внеклеточной стороны белка. Такое перемещение приводит к появлению переходных токов, которые в экспериментах на клетках наблюдали в ответ на скачкообразное изменение мембранного потенциала. К мембранным фрагментам, адсорбированным на БЛМ, невозможно контролируемо приложить скачки напряжения, и переходные токи наблюдали в ответ на быстрое освобождение

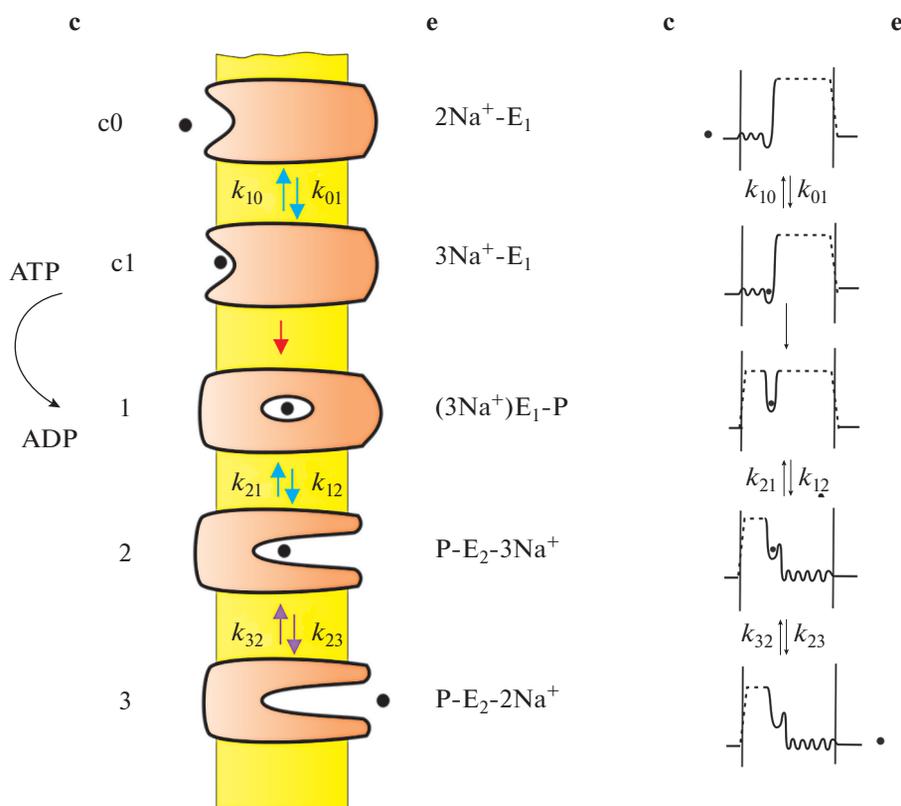


Рис. 3. Теоретическая модель нестационарного транспорта ионов натрия Na^+ , K^+ -АТФ-азой [36]. Слева — совокупность состояний Na^+ , K^+ -АТФ-азы, реализующихся в ходе гидролиза АТФ. с — Цитоплазматическая сторона системы, е — внутриклеточная сторона. Символами E_1 и E_2 обозначен белок в двух разных конформациях. Справа — динамические потенциальные барьеры, введенные в рассмотрение Лойгером и Апелем [19, 24]. Ион натрия, участвующий в транспорте, обозначен черным кружком.

АТФ из Saged-АТФ. Для того чтобы изучать влияние электрического поля на эти переходные токи, был применен оригинальный подход, когда к мембране прикладывали переменное напряжение синусоидальной формы. Это напряжение вызывало появление переменной составляющей тока. В эксперименте эта переменная составляющая тока могла быть измерена как изменение емкости и проводимости мембраны с адсорбированными на ней фрагментами с Na^+ , K^+ -АТФ-азой [35] в ответ на быстрое освобождение АТФ из Saged-АТФ. Такой подход позволил изучить натриевый ток в Na^+ , K^+ -АТФ-азе в широком диапазоне концентраций ионов натрия. Оказалось, что помимо перемещения ионов натрия во внеклеточном канале, которое было достаточно хорошо изучено, данный подход позволяет обнаружить перемещение ионов натрия во внутриклеточном канале. Такой процесс приводит к появлению электрического тока, небольшого по величине по сравнению с током, связанным с перемещением во внеклеточном канале, поскольку глубина внутриклеточного канала значительно меньше глубины внеклеточного канала. Перемещение ионов натрия в этом

канале происходит в отсутствие АТФ, но после связывания и гидролиза АТФ канал закрывается и открывается внеклеточный канал. Поэтому транспорт ионов во внутриклеточном канале не могли обнаружить в экспериментах на клетках, где электрические токи регистрировали в присутствии АТФ. Проведенные с помощью данного метода эксперименты позволили детально изучить перенос ионов натрия во внутриклеточном канале, определить скорость переноса и относительную глубину канала (диэлектрический коэффициент). Для этого при непосредственном участии Ю.А. Чизмадзе была разработана теоретическая модель переноса ионов натрия в каналах Na^+ , K^+ -АТФ-азы [36] (рис. 3).

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ ПЕРЕНОСА ИОНОВ НАТРИЯ В КАНАЛАХ Na^+ , K^+ -АТФ-азы

Транспорт ионов натрия рассматривается как переход между несколькими состояниями белка, в которых открыты каналы доступа ионов с цитоплазматической (обозначены как E_1) или внекле-

точной (E_2) сторон мембраны. С физической точки зрения все состояния белка могут быть представлены как последовательная смена потенциальных барьеров для ионов натрия в мембране. Имеется также состояние окклюзии, в котором ион заперт (находится в потенциальной яме между двумя высокими потенциальными барьерами). В остальных состояниях остается только по одному из этих высоких барьеров, закрывающих каналы либо с внеклеточной (в состояниях s_0 и s_1), либо с цитоплазматической стороны (в состояниях 2 и 3). Электрогенными считаются только перемещения ионов натрия в цитоплазматическом и внеклеточном каналах доступа (переходы между состояниями s_0 и s_1 , а также между состояниями 2 и 3). Эти переходы представляют из себя диффузию или миграцию Na^+ в каналах доступа, во время которых никаких конформационных перестроек в белке не происходит. Перемещение ионов в каналах происходит благодаря приложению электрического напряжения к мембране, и приводит к появлению электрического тока во внешней цепи. Если электрическое поле в каналах и концентрация в них ионов Na^+ малы, транспорт ионов в каналах может рассматриваться как перескоки через невысокие (по сравнению с рассмотренными выше) потенциальные барьеры. Математически переходы между состояниями были представлены дифференциальными уравнениями, решение которых позволило определить изменения емкости и проводимости мембраны в зависимости от концентрации ионов натрия и частоты приложенного переменного напряжения. Это позволило объяснить экспериментальные результаты, полученные на модельной системе, состоящей из содержащих Na^+, K^+ -АТФазу мембранных фрагментов, адсорбированных на БЛМ.

ИМПЕДАНСНЫЕ ИЗМЕРЕНИЯ НА БЛМ

В эксперименте к мембране прикладывали переменное напряжение и записывали кинетику изменения тока при фотоиндуцированном освобождении АТФ из Caged-АТФ [37]. Полученные зависимости от времени тока короткого замыкания, его интеграла, а также изменения емкости и проводимости БЛМ с адсорбированными на ней фрагментами, содержащими Na^+, K^+ -АТФазу в ответ на освобождение АТФ из Caged-АТФ при вспышке ультрафиолетового света изображены на рис. 4. Записи приводятся при двух концентрациях ионов натрия: 150 мМ (слева) и 3 мМ (справа). При высокой концентрации ионов натрия освобождение АТФ вызывает увеличение емкости и проводимости мембраны, а при низкой концентрации емкость уменьшается. Уменьшение емкости мембраны при низкой концентрации ионов натрия, в соответствии с рассмотренной выше моделью, объясняется тем, что в эксперименте регистрируется

разностный сигнал: переменный ток, измеренный после введения АТФ, вычитается из тока, измеренного в отсутствие АТФ. Поэтому отрицательное приращение емкости и проводимости может быть вызвано электрогенным транспортом ионов, который подавляется при гидролизе АТФ и последующем фосфорилировании Na^+, K^+ -АТФазы. Таким транспортом является электрогенное перемещение ионов в цитоплазматическом канале Na^+, K^+ -АТФазы.

Зависимости приращений емкости и проводимости мембраны от частоты переменного напряжения измерялись при разных концентрациях ионов натрия в диапазоне от 3 мМ до 1 М. В соответствии с рассмотренной моделью, частотные зависимости приращений емкости ΔC и проводимости ΔG описывались линейной комбинацией функций Лоренца с разными характерными частотами. В частотной области эти функции эквивалентны экспонентам во временной области, с помощью которых описывались переходные токи после скачкообразного изменения напряжения в экспериментах на клетках. Каждая из таких функций отражает переход белка между двумя состояниями, а соответствующая ей характерная частота – скорость такого перехода. Характерная частота ω_0 отражает скорость конформационного перехода из E_1 в E_2 . Это самая медленная стадия. Характерная частота ω_1 отражает скорость перемещения ионов натрия во внеклеточном, а ω_2 в цитоплазматическом канале доступа. Амплитуды этих функций зависят от концентрации ионов натрия, принимая максимальное значение при концентрации, близкой к константе связывания в данной стадии. Амплитуда C_2 с отрицательным знаком отражает вклад в переменный ток транспорта ионов натрия в цитоплазматическом канале, который закрывается после перехода Na^+, K^+ -АТФазы в состояние E_2 в результате гидролиза АТФ:

$$\Delta C = C_0 \frac{\omega_0^2}{\omega^2 + \omega_0^2} + C_1 \frac{\omega_1^2}{\omega^2 + \omega_1^2} - C_2 \frac{\omega_2^2}{\omega^2 + \omega_2^2} + C_i,$$

$$\Delta G = C_0 \omega_0 \frac{\omega^2}{\omega^2 + \omega_0^2} + C_1 \omega_1 \frac{\omega^2}{\omega^2 + \omega_1^2} - C_2 \omega_2 \frac{\omega^2}{\omega^2 + \omega_2^2}.$$

В результате аппроксимации частотных зависимостей емкости и проводимости этими функциями были получены значения их параметров при разной концентрации ионов натрия в растворе. Зависимости амплитуд C_0 , C_1 , C_2 и характерных частот ω_0 , ω_1 , ω_2 , трех Лоренцианов от концентрации ионов натрия изображены на рис. 5.

То, что характерная частота ω_0 определяется скоростью конформационного перехода Na^+, K^+ -АТФазы, было подтверждено при изучении эффектов высоких концентраций солей на кинетику функционирования белка. Известно, что солевой эф-

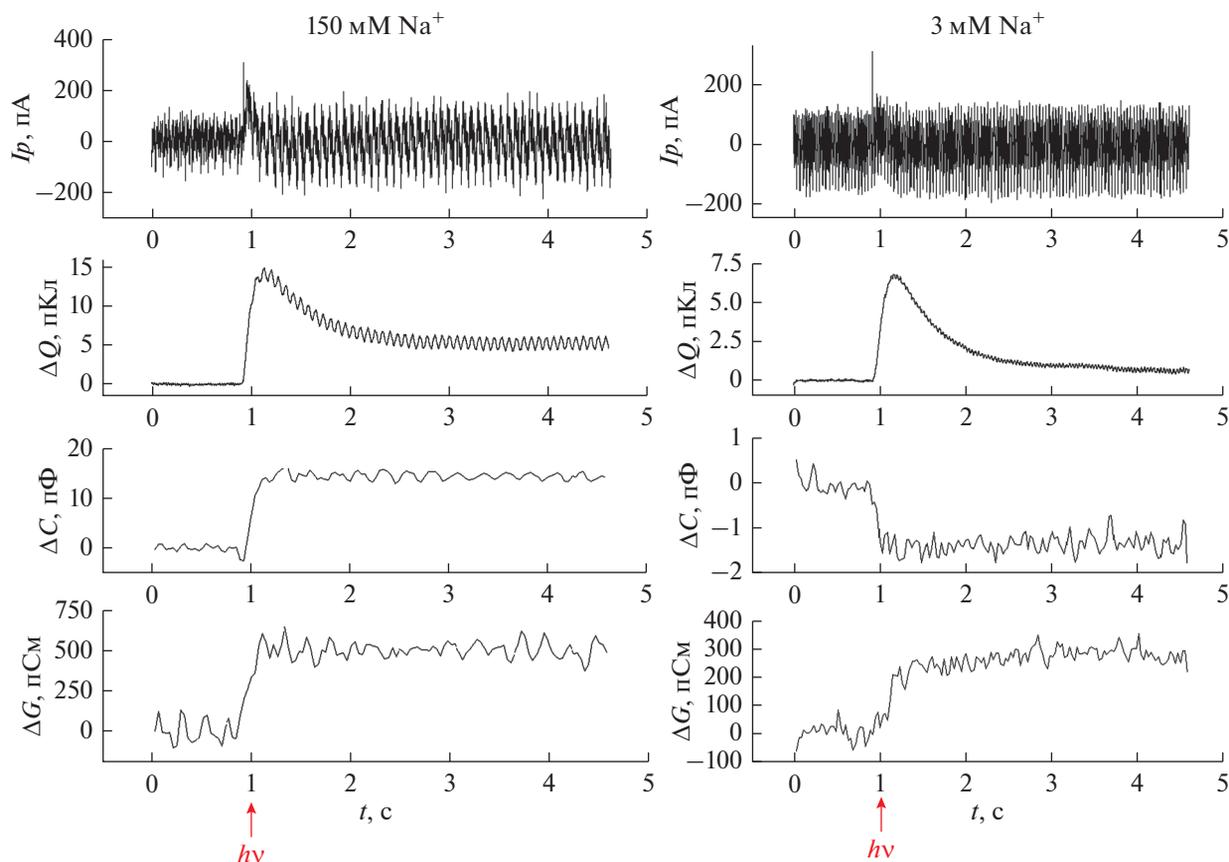


Рис. 4. Сигналы, регистрируемые в эксперименте при двух концентрациях ионов натрия: 150 мМ (слева) и 3 мМ (справа). Сверху вниз показаны: регистрируемый в эксперименте ток, интеграл этого тока, изменения емкости и проводимости во времени, полученные в результате вычислений и используемые для определения изменений адмиттанса мембраны. Стрелками указаны моменты вспышки УФ-света. Водный раствор содержал 150 мМ NaCl, 10 мМ MgCl₂, 30 мМ имидазол, 1 мМ EDTA, pH 6.5, а также 100 мкМ Caged-ATP и суспензию фрагментов с Na⁺,K⁺-ATP-азой (0.05 мг белка на 1 мл раствора).

фект приводит к замедлению конформационного перехода [38]. В экспериментах, проведенных на БЛМ с помощью используемых нами методов было показано, что увеличение концентрации анионов Cl⁻, Br⁻ или I⁻ приводило к значительному уменьшению величины ω_0 [39]. Значения скоростей ω_0 и ω_1 оказались в несколько раз меньше постоянных времени экспонент, аппроксимирующих переходные токи, измеренные при скачке напряжения на гигантском аксоне кальмара [26]. Такое отличие может быть вызвано несколькими причинами. Одна из них может быть связана с тем, что Na⁺,K⁺-АТФ-аза обладает сильной температурной зависимостью, и измерения на клетках обычно проводились при температурах около 37°C, в то время как в данной работе измерения проводились при более низких температурах (20–25°C).

Константа диссоциации Na⁺ в активном центре с внеклеточной стороны, $1/K_e$, оказалась равной 0.74 М, а с внутриклеточной — 1.5 мМ. Эти

значения близки к литературным, полученным с помощью флуоресцентных зондов, где они составляли соответственно 500 мМ и 1–5 мМ (в последнем случае значение зависело от концентрации ионов магния) [40, 41]. Константы скорости связывания и освобождения ионов натрия в цитоплазматическом канале были определены впервые: первая (k_{12} , константа скорости перехода из состояния с1 в состояние с2 около 2.4 с⁻¹, вторая (k_{21} , обратного перехода) — около 500 с⁻¹. Константа скорости перехода между состояниями 2 и 3 (освобождение Na⁺ из внеклеточного канала доступа) — около 1500 с⁻¹. Диэлектрический коэффициент перемещения натрия (характеризующий относительную глубину канала, соединяющего раствор с центром связывания) с цитоплазматической стороны (0.2) оказался значительно меньше, чем с внеклеточной стороны (0.89). Таким образом, место связывания третьего иона натрия расположено в мембране асимметрично и находится ближе к цито-

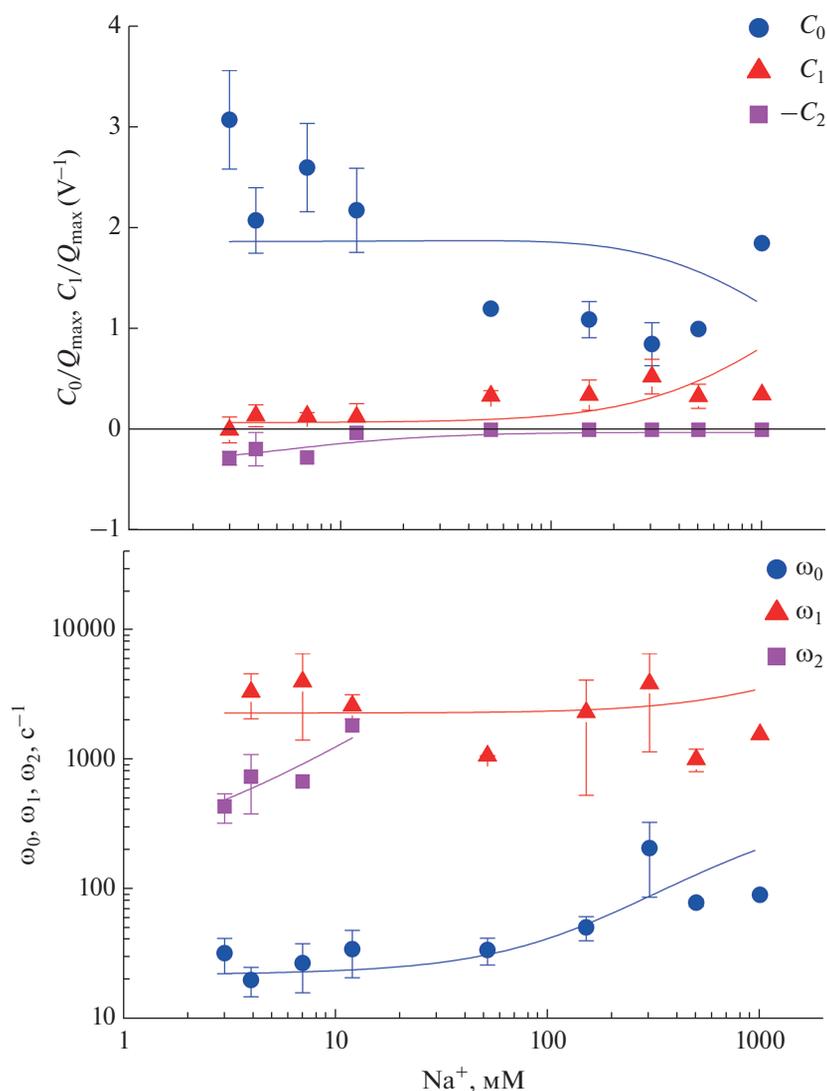


Рис. 5. Зависимость амплитуд (вверху) и характерных частот (внизу) функций Лоренца, аппроксимирующих частотные зависимости изменений емкости и проводимости, вызванных скачкообразным освобождением АТФ при функционировании Na^+ , K^+ -АТФ-азы от концентрации ионов натрия в растворе. Точки получены при усреднении результатов не менее трех экспериментов. Сплошные линии – теоретические кривые [37].

плазматической стороне мембраны. Несмотря на то что сделанные оценки достаточно грубые, они хорошо согласуются с оценками диэлектрических коэффициентов, полученными независимыми методами, где были получены значения диэлектрических коэффициентов 0.25 для цитоплазматического канала и 0.7 для внеклеточного [18, 42, 43].

УЧАСТИЕ ПРОТОНОВ В ФУНКЦИОНИРОВАНИИ Na^+ , K^+ -АТФ-азы

Дальнейшие работы были посвящены более детальному изучению связывания и транспорта ионов натрия и калия с цитоплазматической стороны белка. Оказалось, что связывание ионов происходит в обмен на протоны. Протонному транс-

порту и влиянию рН на транспорт других ионов Na^+ , K^+ -АТФ-азой были посвящены исследования нескольких групп [44–47]. Оказалось, что рН не только влияет на скорость функционирования Na^+ , K^+ -АТФ-азы, но протоны участвуют в ее транспортном цикле, а в определенных условиях могут переноситься белком вместо ионов натрия и калия. Это объясняется гомологическим и структурным сходством Na^+ , K^+ -АТФ-азы с другими АТФ-азами Р-типа, способными транспортировать через мембрану протоны, особенно с K^+ , H^+ -АТФ-азой. Они наиболее близки по структуре и в определенных условиях могут “подменять” друг друга [48, 49]. На участие протонов в функционировании Na^+ , K^+ -АТФ-азы указывают и рентгеноструктурные данные, согласно которым в связывании ионов

в центре белка участвуют диссоциированные отрицательно заряженные аминокислотные остатки, которые при низких концентрациях ионов могут находиться в протонированном состоянии [12]. В исследованиях, проведенных нами на БЛМ с приложением переменного напряжения, было показано, что АТФ-зависимые электрические токи зависят от рН и могут наблюдаться в условиях отсутствия ионов Na^+ , что говорит о возможности транспорта протонов Na^+ , K^+ -АТФ-азой [50]. Для более детального исследования участия протонов в функционировании Na^+ , K^+ -АТФ-азы вместо Caged-АТФ для инициирования электрических сигналов стали применять другое соединение – Caged- H^+ . Это позволило исследовать токи смещения в цитоплазматическом канале Na^+ , K^+ -АТФ-азы, вызванные быстрым скачком рН. В результате этих исследований удалось определить константы диссоциации ионов натрия и калия в центре связывания с цитоплазматической стороны белка [51–53].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, применение импедансного метода для изучения активного транспорта, осуществляемого Na^+ , K^+ -АТФ-азой, позволило получить существенную информацию о механизме этого транспорта, в частности, оценить кинетические и равновесные параметры связывания ионов, а также относительные глубины каналов, соединяющих центры связывания ионов с растворами с двух сторон белка.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Источники финансирования. Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (регистрационный номер темы АААА-А20-12010190002-4).

Соответствие принципам этики. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Mueller P., Rudin D.O., Tien H.T., Wescott W.C. 1963. Methods for the formation of single bimolecular lipid membranes in aqueous solution. *J. Phys. Chem.* **67**, 534–535.
- Маркин В.С., Чизмаджев Ю.А. 1974. Индуцированный ионный транспорт. М.: Наука, 251 с.
- Маркин В.С., Соколов В.С. 1986. Мембранный потенциал при сопряженном электрогенном транспорте. Термодинамическое рассмотрение. *Биол. мембраны.* **3**, 638–649.
- Соколов В.С., Маркин В.С. 1984. Электрогенный транспорт ионов калия и водорода через мембрану, осуществляемый антибиотиками нигерицином и гризориоксином. *Биол. мембраны.* **1** (10), 1071–1086.
- Markin V.S., Sokolov V.S. 1990. A new concept of electrochemical membrane equilibrium. Coupled transport and membrane potential. *Bioelectrochem. Bioenerg.* **23**, 1–16.
- Portnov V.I., Mirsky V.M., Markin V.S. 1990. Bacteriorhodopsin: Current-voltage characteristics. *Bioelectrochem. Bioenerg.* **23**, 45–63.
- Post R.L., Hegyvary C., Kame S. 1972. Activation by adenosine triphosphate in the phosphorylation kinetics of sodium and potassium ion transport adenosine triphosphatase. *J. Biol. Chem.* **247**, 6530–6540.
- Morth J.P., Pedersen B.P., Toustrup-Jensen M.S., Sorensen T.L., Petersen J., Andersen J.P., Vilsen B., Nissen P. 2007. Crystal structure of the sodium-potassium pump. *Nature.* **450** (7172), 1043–1049.
- Ogawa H., Shinoda T., Cornelius F., Toyoshima C. 2009. Crystal structure of the sodium-potassium pump (Na^+ , K^+ -ATPase) with bound potassium and ouabain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **106** (33), 13742–13747.
- Shinoda T., Ogawa H., Cornelius F., Toyoshima C. 2009. Crystal structure of the sodium-potassium pump at 2.4 Å resolution. *Nature.* **459** (7245), 446–450.
- Kanai R., Ogawa H., Vilsen B., Cornelius F., Toyoshima C. 2013. Crystal structure of a Na^+ -bound Na^+ , K^+ -ATPase preceding the E1P state. *Nature.* **502** (7470), 201–206.
- Toyoshima C., Kanai R., Cornelius F. 2011. First crystal structures of Na^+ , K^+ -ATPase: New light on the oldest ion pump. *Structure.* **19** (12), 1732–1738.
- Nyblom M., Poulsen H., Gourdon P., Reinhard L., Andersson M., Lindahl E., Fedosova N., Nissen P. 2013. Crystal structure of Na^+ , K^+ -ATPase in the Na^+ -bound state. *Science.* **342** (6154), 123–127.
- Bublitz M., Morth J.P., Nissen P. 2011. P-type ATPases at a glance. *J. Cell Sci.* **124** (Pt 15), 2515–2519.
- Axelsen K.B., Palmgren M.G. 1998. Evolution of substrate specificities in the P-type ATPase superfamily. *J. Mol. Evol.* **46** (1), 84–101.
- Palmgren M.G., Axelsen K.B. 1998. Evolution of P-type ATPases. *Biochim. Biophys. Acta.* **1365** (1–2), 37–45.
- Pedersen C.N., Axelsen K.B., Harper J.F., Palmgren M.G. 2012. Evolution of plant p-type ATPases. *Front. Plant Sci.* **3**, 31.
- Wuddel I., Apell H.J. 1995. Electrogenicity of the sodium transport pathway in the Na,K-ATPase probed by charge-pulse experiments. *Biophys. J.* **69** (3), 909–921.
- Lauger P. 1991. *Electrogenic ion pumps*. Sunderland, Massachusetts, USA: Sinauer Associates, Inc., 312 p.
- De Weer P., Gadsby D.C., Rakowski R.F. 1988. Voltage dependence of the Na-K pump. *Ann. Rev. Physiol.* **50**, 225–241.
- Gadsby D.C., Rakowski R.F., De Weer P. 1993. Extracellular access to the Na,K-pump: Pathway similar to ion channel. *Science.* **260**, 100–103.
- Apell H.-J., Borlinghaus R., Lauger P. 1989. Electrogenic properties of the Na/K pump-voltage dependence and kinetics of charge translocation. *Curr. Top. Membr. Transp.* **34**, 229–252.

23. Nakao M., Gadsby D.C. 1986. Voltage dependence of Na translocation by the Na/K pump. *Nature*. **323** (6089), 628–630.
24. Apell H.J., Borlinghaus R., Lauger P. 1987. Fast charge translocations associated with partial reactions of the Na,K-pump: II. Microscopic analysis of transient currents. *J. Membrane Biol.* **97** (3), 179–191.
25. Павлов К.В., Соколов В.С. 1999. Электрогенный транспорт ионов Na^+ , K^+ , АТФ-азой. *Биол. мембраны*. **16** (6), 604–638.
26. Holmgren M., Wagg J., Bezanilla F., Rakowski R.F., De Weer P., Gadsby D.C. 2000. Three distinct and sequential steps in the release of sodium ions. *Nature*. **403**, 898–901.
27. Rakowski R.F., Paxson C.L. 1988. Voltage dependence of Na/K pump current in *Xenopus* oocytes. *J. Membrane Biol.* **106**, 173–182.
28. Holmgren M., Rakowski R.F. 2006. Charge translocation by the Na^+/K^+ pump under Na^+/Na^+ exchange conditions: Intracellular Na^+ dependence. *Biophys. J.* **90** (5), 1607–1616.
29. Hilgemann D.W. 1994. Channel-like function of the Na,K pump probed at microsecond resolution in giant membrane patches. *Science*. **263**, 1429–1432.
30. Lu C.-C., Kabakov A., Markin V.S., Mager S., Frazier S., Frazier G.A., Hilgemann D.W. 1995. Membrane Transport mechanisms probed by capacitance measurements with megahertz voltage clamp. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **1995**, 11220–11224.
31. Fendler K., Grell E., Haubs M., Bamberg E. 1985. Pump currents generated by the Na^+ , K^+ -ATPase from kidney on black lipid membranes. *EMBO J.* **4**, 3079–3085.
32. Borlinghaus R., Apell H.J., Lauger P. 1987. Fast charge translocations associated with partial reactions of the Na,K-pump: I. Current and voltage transients after photochemical release of ATP. *J. Membrane Biol.* **97** (3), 161–178.
33. McCray J.A., Trentham D.R. 1989. Properties and uses of photoreactive caged compounds. *Annu. Rev. Biophys. Chem.* **18**, 239–270.
34. Apell H.J., Roudna M., Corrie J.E., Trentham D.R. 1996. Kinetics of the phosphorylation of Na,K-ATPase by inorganic phosphate detected by a fluorescence method. *Biochemistry*. **35** (33), 10922–10930.
35. Соколов В.С., Павлов К.В., Джанджугазян К.Н., Бамберг Е. 1992. Изменение емкости и проводимости модельной мембраны при функционировании Na^+ , K^+ , АТФ-азы. *Биол. мембраны*. **9**, 961–969.
36. Щербаков А.А., Чизмаджев Ю.А., Ленц А.А., Соколов В.С. 2005. Импедансная спектроскопия транспорта ионов натрия в Na^+ , K^+ , АТФ-азе. *Биол. мембраны*. **22** (6), 511–523.
37. Sokolov V.S., Shcherbakov A.A., Lenz A.A., Chizmadzhev Yu.A., Apell H.J. 2008. Electrogenic transport of sodium ions in cytoplasmic and extracellular ion access channels of Na^+ , K^+ -ATPase probed by admittance measurement technique. *Biochemistry (Moscow) Supplement Series A: Membrane and Cell Biology*. **2** (2), 161–180.
38. Post R.L., Suzuki K. 1991. *The sodium pump: Structure, mechanism and regulation*. Ed. De Weer P., Kaplan J.H. New York: Rockefeller University Press, p. 202–209.
39. Sokolov V.S., Ayuyan A.G., Apell H.J. 2001. Assignment of charge movements to electrogenic reaction steps of Na,K-ATPase by analysis of salt effects on the kinetics of charge movements. *Eur. Biophys. J.* **30** (7), 515–527.
40. Schneeberger A., Apell H.J. 2001. Ion selectivity of the cytoplasmic binding sites of the Na,K-ATPase: II. Competition of various cations. *J. Membrane Biol.* **179** (3), 263–273.
41. Schneeberger A., Apell H.J. 1999. Ion selectivity of the cytoplasmic binding sites of the Na,K-ATPase: I. Sodium binding is associated with a conformational rearrangement. *J. Membrane Biol.* **168** (3), 221–228.
42. Heyse S., Wuddel I., Apell H.J., Sturmer W. 1994. Partial reactions of the Na,K-ATPase: Determination of rate constants. *J. Gen. Physiol.* **104** (2), 197–240.
43. Domaszewicz W., Apell H. 1999. Binding of the third Na^+ ion to the cytoplasmic side of the Na,K-ATPase is electrogenic. *FEBS Lett.* **458** (2), 241–246.
44. Apell H.J., Diller A. 2002. Do H^+ ions obscure electrogenic Na^+ and K^+ binding in the E1 state of the Na,K-ATPase? *FEBS Lett.* **532** (1–2), 198–202.
45. Apell H.J., Benz G., Sauerbrunn D. 2011. Proton diet for the sodium pump. *Biochemistry*. **50** (3), 409–418.
46. Vasilyev A., Khater K., Rakowski R.F. 2004. Effect of extracellular pH on presteady-state and steady-state current mediated by the Na^+/K^+ pump. *J. Membrane Biol.* **198** (2), 65–76.
47. Vedovato N., Gadsby D.C. 2014. Route, mechanism, and implications of proton import during Na^+/K^+ exchange by native Na^+/K^+ -ATPase pumps. *J. Gen. Physiol.* **143** (4), 449–464.
48. Polvani C., Blostein R. 1988. Protons as substitutes for sodium and potassium in the sodium pump reaction. *J. Biol. Chem.* **263** (32), 16757–16763.
49. Polvani C., Sachs G., Blostein R. 1989. Sodium ions as substitutes for protons in the gastric H,K-ATPase. *J. Biol. Chem.* **264** (30), 17854–17859.
50. Гришанин К.О., Ташкин В.Ю., Ленц А.А., Апель Х.-Ю., Соколов В.С. 2010. О возможном участии протонов в функционировании Na^+ , K^+ , АТФ-азы. *Биол. мембраны*. **27** (6), 512–518.
51. Ташкин В.Ю., Гаврильчик А.Н., Иловайский А.И., Апель Х.-Ю., Соколов В.С. 2015. Электрогенное связывание ионов с цитоплазматической стороны Na^+ , K^+ -АТФ-азы. *Биол. мембраны*. **32** (2), 110–118.
52. Ташкин В.Ю., Щербаков А.А., Апель Х.-Ю., Соколов В.С. 2013. Конкурентный транспорт ионов натрия и протонов в цитоплазматическом канале Na^+ , K^+ -АТФ-азы. *Биол. мембраны*. **30** (2), 105–114.
53. Вишнякова В.Е., Ташкин В.Ю., Терентьев А.О., Апель Х.-Ю., Соколов В.С. 2018. Связывание ионов калия в канале доступа с цитоплазматической стороны Na^+ , K^+ -АТФ-азы. *Биол. мембраны*. **35** (5), 376–383.

Investigations of Electrogenic Ion Transport by Na,K-ATPase in Bilayer Lipid Membranes by Impedance Method

V. S. Sokolov*

*Frumkin Institute of Physical Chemistry and Electrochemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia
e-mail: sokolovvs@mail.ru

The results of investigation of electrogenic transport by the Na,K-ATPase – enzyme providing the active transport of Na and K ions through cell membrane are reviewed. The main contribution to electric current generated through functioning of the Na,K-ATPase is assigned to movements of ions in access channels – the channel like structures connecting the ion binding centers with the solutions. The electrogenic transport was studied on the model system consisting of bilayer lipid membrane with adsorbed membrane fragments containing the Na,K-ATPase. The impedance method applied to this study allowed the investigation of the access channels in the Na,K-ATPase. The review notes a significant contribution of Yu.A. Chizmadzhev to the development of the theoretical model of transport processes in Na,K-ATPase.

Keywords: Na,K-ATPase, electrogenic transport, access channels, impedance

УДК 577.352.26

МЕХАНИЗМЫ ИНГИБИРОВАНИЯ СЛИЯНИЯ ЛИПИДНЫХ ВЕЗИКУЛ ЭКСТРАКТАМИ ЧАГИ И ЛИСТЬЕВ ОБЛЕПИХИ

© 2022 г. С. С. Ефимова^а, *, П. Д. Злодеева^а, Е. В. Шекунов^а, О. С. Остроумова^а^аИнститут цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064 Россия

*e-mail: efimova@incras.ru

Поступила в редакцию 16.04.2022 г.

После доработки 01.06.2022 г.

Принята к публикации 02.06.2022 г.

В работе оценена способность экстрактов семян грейпфрута (ЭСГ), листьев облепихи (ЭЛО) и чаги (ЭЧ) ингибировать слияние мембран. Установлено, что ЭЛО и ЭЧ подавляют слияние фосфатидил-глицерин-обогащенных липидных везикул под действием кальция: индекс ингибирования составляет около 90 и 100% соответственно. ЭСГ не характеризуется способностью ингибировать слияние отрицательно заряженных липосом, индуцированное введением кальция. Помимо кальций-опосредованного слияния липосом ЭЧ ингибирует и слияние везикул из смеси фосфатидилхолина и холестерина под действием полиэтиленгликоля с молекулярной массой 8000 Да (индекс ингибирования равен 80%). Два других экстракта на полимер-индуцированное слияние незаряженных мембран не действуют. Проведена оценка влияния на слияние везикул некоторых мажорных компонентов тестируемых экстрактов. Показано, что флавонолы кверцетин и мирицетин, являющиеся мажорными компонентами ЭЛО, ингибируют слияние отрицательно заряженных мембран под действием кальция (индекс ингибирования составляет около 85 и 60% соответственно). Другой флавонол ЭЛО, гликозид кверцетина рутин, такого действия не оказывает. Полученные данные позволяют связывать подавление ЭЛО кальций-индуцированного слияния липидных везикул с наличием в его составе кверцетина и мирицетина. Эти флавонолы практически не влияют на полиэтиленгликоль-индуцированное слияние везикул, что согласуется с отсутствием действия ЭЛО на слияние липосом под действием полимера. Продемонстрирована способность кверцетина и мирицетина уменьшать температуру плавления фосфатидилглицерина с насыщенными углеводородными цепями и увеличивать полуширину соответствующего плаванию пика. Наблюдаемая корреляция между параметрами, характеризующими термотропное поведение липида в присутствии кверцетина и мирицетина, и индексом ингибирования этими соединениями кальций-опосредованного слияния липосом может указывать на взаимосвязь между способностью флавонолов влиять на упаковку мембранных липидов и подавлять слияние везикул. Пентациклические тритерпеноиды бетулин и люпеол, входящие в состав ЭЧ, не подавляют слияние везикул под действием как кальция, так и полиэтиленгликоля, и их присутствие в составе ЭЧ не может быть ответственно за антифьюзогенную активность ЭЧ.

Ключевые слова: природные экстракты, ингибиторы слияния мембран, липосомы, флавонолы, сапонины

DOI: 10.31857/S0233475522050048

ВВЕДЕНИЕ

Природные экстракты широко используются в медицине как самостоятельные лекарственные препараты, так и в комбинации с другими биологически активными соединениями. Кроме того, экстракты активно используют в составе косметических средств, поскольку они оказывают выраженный

противовоспалительный и антимикробный эффекты.

Литературные данные указывают на высокую противовирусную активность экстракта семян грейпфрута (ЭСГ). Установлено, что ЭСГ имеет значительный потенциал применения в птицеводстве в качестве дезинфектанта, поскольку существенно снижает титр вирусов, вызывающих инфекционные заболевания у домашних птиц, в частности, птичьего гриппа и болезни Ньюкасла [1]. Результаты недавно опубликованных работ показали, что коммерчески доступный назальный спрей, содержащий экстракт семян грейпфрута (ЭСГ), может быть использован в качестве

Принятые сокращения: ДОФХ – 1,2-диолеил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин, ДОФГ – 1,2-диолеоил-*sn*-глицеро-3-фосфо-(1'-*rac*-глицерин), ХОЛ – холестерин, ДПФГ – 1,2-дипальмитоил-*sn*-глицеро-3-фосфо-(1'-*rac*-глицерин), ПЭГ-8000 – полиэтиленгликоль с молекулярной массой 8000 Да, ЭСГ – экстракт семян грейпфрута, ЭЛО – экстракт листьев облепихи, ЭЧ – экстракт чаги.

дополнительной терапии COVID-19 легкой и средней степени тяжести [2].

Известно, что облепиха проявляет противовирусные свойства в отношении вируса денге [3, 4]. Так, экстракт листьев облепихи (ЭЛО) оказался столь же эффективен в поддержании жизнеспособности клеток, инфицированных вирусом денге, как и известный противовирусный препарат рибавирин [5]. Показано, что ЭЛО также проявляет сравнимую с осельтамивиром активность против вирусов гриппа А и Б [6].

В последнее время широко обсуждается противовирусная активность березового гриба или чаги, в том числе в отношении SARS-CoV-2 [7, 8]. Результаты проведения молекулярного докинга показали, что компоненты экстракта чаги (ЭЧ) (беталукозан, галактоманнан и бетулиновая кислота) связываются с С-концевым фрагментом рецептор-связывающего домена S-белка SARS-CoV-2 [9]. ЭЧ также ингибирует слияние вируса простого герпеса 1 типа с клеточной мембраной [10]. Обнаружено, что ЭЧ проявляет противовирусную активность в отношении большого числа вирусов, вызывающих заболевания у кошек: калицивируса, герпеса 1 типа, гриппа H3N2 и H5N6, панлейкопении, инфекционного перитонита и иммунодефицита [11, 12]. Исследование механизма противовирусного действия ЭЧ в отношении кошачьего калицивируса показало, что ингибирующее действие экстракта связано с блокированием связывания/абсорбции вируса [11]. Протеомонстрирована активность ЭЧ и против вируса иммунодефицита человека [13].

Очевидно, что противовирусная активность природных экстрактов должна быть обусловлена их специфическим химическим составом. Известно, что в состав ЭСГ в большом количестве входят гликозиды флавононов: нарингин, гесперидин и нарирутин [14]. Нарингин и нарирутин являются гликозидами нарингенина, а гесперидин — гликозидом близкого аналога нарингенина, гесперетина. Анализ литературных данных показывает, что ЭЛО богаты флавонолами: кверцетином, мирицетином и кемпферолом, а также различными гликозидами кверцетина, в частности, рутином (кверцетин-3-рутинозидом) [15–17]. К настоящему моменту в составе ЭЧ идентифицировано около сорока ланостановых тритерпеноидов, прежде всего, ланостерин и его производное, инотодиол. В несколько раз меньших концентрациях, чем тетрациклические тритерпеноиды, в составе чаги обнаруживаются пентациклические тритерпеноиды, такие как, бетулин и люпеол, а также другие стеринны, в частности, эргостерин [18].

В работе проведена оценка способности ЭСГ, ЭЛО и ЭЧ ингибировать слияние отрицательно заряженных и незаряженных липидных везикул под действием кальция и высокомолекулярного

полиэтиленгликоля соответственно. Определена роль некоторых компонентов экстрактов в ингибировании слияния липосом, а также установлено, модуляция каких физико-химических свойств бислоя ответственна за ингибирование слияния мембран компонентами экстрактов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали следующие реактивы: хлорид натрия (NaCl), HEPES, NaOH, этанол, диметилсульфоксид (ДМСО), тритон X-100, сефадекс G-50, кальцеин, сорбитол, хлорид кальция (CaCl_2), полиэтиленгликоль с молекулярной массой 8000 Да (ПЭГ-8000), кверцетин, мирицетин, рутин, бетулин, люпеол, 1,2-диолеил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин (ДОФХ), 1,2-диолеил-*sn*-глицеро-3-фосфо-(1'-*rac*-глицерин) (ДОФГ), холестерин (ХОЛ), 1,2-дипальмитоил-*sn*-глицеро-3-фосфо-(1'-*rac*-глицерин) (ДПФГ) и 1,2-дипальмитоил-*sn*-глицеро-3-фосфоэтанолламин-N-(лиссамин родамин) производства фирмы Sigma (США).

Экстракт семян грейпфрута (ЭСГ), экстракт листьев облепихи (ЭЛО) и экстракт чаги (ЭЧ) предоставлены ЗАО “Эвалар”. Тестирование проводилось для трех образцов каждого экстракта, представляющих собой независимые серии экстрагирования.

Исследование способности тестируемых экстрактов и их компонентов ингибировать слияние липидных везикул, опосредованное различными индукторами. Одноламеллярные липидные везикулы из смесей ДОФХ/ХОЛ (80/20 мол. %) и ДОФХ/ДОФГ/ХОЛ (40/40/20 мол. %), нагруженные флуоресцентным маркером кальцеином, формировали с помощью мини-экструдера производства Avanti Polar Lipids (США). Исходный раствор липидов в хлороформе помещали в вials, после чего растворитель удаляли потоком азота. Полученную липидную пленку гидратировали буфером (35 мМ кальцеина, 10 мМ HEPES-NaOH, pH 7.4) и после пятикратного замораживания–размораживания 13 раз пропускали через поликарбонатную мембрану (Nucleopore TM, США) с диаметром пор 100 нм для получения гомогенной популяции больших однослойных липосом. Не захваченный липосомами кальцеин удаляли гель-фильтрацией на колонке, заполненной сефадексом G-50. В качестве элюента использовали свободный от кальцеина буфер (150 мМ NaCl, 10 мМ HEPES-NaOH, pH 7.4). Кальцеин внутри липосом в концентрации 35 мМ испытывал самотушение. Для индукции слияния ДОФХ/ДОФГ/ХОЛ и ДОФХ/ХОЛ липосом использовали кальций (40 мМ CaCl_2) и полиэтиленгликоль с молекулярной массой 8000 Да (ПЭГ-8000 в концентрации 20 вес. %) соответственно [19–22].

Образцы экстрактов из исходных растворов в воде или ДМСО вводили в суспензию липосом до концентрации 100 мкг/мл.

Интенсивность свечения кальцеина, вытекающего в окружающий липидные везикулы раствор при их слиянии, измеряли с помощью спектрофлуориметра Флюорат Панорама-02 (при длине волны возбуждения 490 нм, эмиссии 520 нм). В конце каждого эксперимента в раствор вводили тритон X-100. При концентрации 10 мМ этот детергент разрушает все липосомы в суспензии, высвобождая захваченный везикулами маркер.

Индекс ингибирования слияния липидных везикул (*ИИ*) тестируемыми экстрактами рассчитывали как:

$$ИИ = \frac{RF_{Ind} - RF_{Inh}}{RF_{Ind}} \cdot 100\%, \quad (1)$$

где RF_{Ind} и RF_{Inh} представляют собой среднюю максимальную утечку флуоресцентного маркера из везикул, индуцированную введением хлорида кальция или ПЭГ-8000 в отсутствие и в присутствии тестируемого экстракта соответственно.

Величины утечки RF (%) (RF_{Ind} и RF_{Inh}) определяли по формуле:

$$RF = \frac{I_1 - I_0}{1.1I_{max} - I_0} \cdot 100\%, \quad (2)$$

где I_1 и I_0 – интенсивности флуоресценции раствора в присутствии и отсутствие тестируемого экстракта, I_{max} – интенсивность флуоресценции раствора после добавки тритона X-100 (множитель 1.1 введен для учета разбавления образца водным раствором детергента). Оценка RF_{Inh} выполнена с учетом возможного собственного влияния экстрактов на проницаемость липосом для маркера (утечки кальцеина вследствие разупорядочения липидов под действием экстрактов).

Кинетику высвобождения маркера под действием индукторов слияния до и после введения тестируемых экстрактов характеризовали временем увеличения относительной флуоресценции в e раз.

Для каждого вида экстракта было выполнено девять независимых повторений с образцами из трех различных партий. Параметры, характеризующие действие отдельных компонентов экстрактов на слияние мембран, определены путем вычисления среднего арифметического величин, полученных в 2–3 независимых экспериментах.

Чтобы доказать статистическую значимость обнаруженных различий средних величин RF до и после введения экстрактов или их компонентов, использовали непараметрический критерий Манна–Уитни–Уилкоксона (* $p \leq 0.01$).

Конфокальная флуоресцентная микроскопия гигантских липосом. Визуализацию изменений в поведении везикул до и после введения в суспензию

ПЭГ-8000 и экстракта чаги проводили с использованием конфокальной флуоресцентной микроскопии. Гигантские однослойные везикулы готовили из смеси ДОФХ/ХОЛ (80/20 мол. %) и 1 мол. % флуоресцентного липидного зонда 1,2-дипальмитоил-*sn*-глицеро-3-фосфоэтаноламин-N-(лиззамин родамина) методом электроформации (стандартный протокол, 3 В, 10 Гц, 1 ч, 25°C) с использованием коммерчески доступного прибора Nanion vesicle prep pro (Германия). Полученная суспензия липосом содержала 0.5 мМ липида в 1 М растворе сорбитола. Для индукции слияния везикул в суспензию вводили ПЭГ-8000 до концентрации 10 вес. % и инкубировали в течение 5–10 мин при комнатной температуре ($25 \pm 1^\circ\text{C}$). В экспериментальные образцы последовательно вводили 35 мкг/мл ЭЧ и 10 вес. % ПЭГ-8000 с инкубацией на каждом этапе 10 мин. Липосомы наблюдали через иммерсионный объектив $100.0 \times /1.4$ HCX PL в Leica TCS SP5 конфокальной лазерной системы Аро (Leica Microsystems, Германия). Наблюдение препаратов проводили при температуре 25°C. Свечение 1,2-дипальмитоил-*sn*-глицеро-3-фосфоэтаноламин-N-(лиззамин родамина) возбуждали светом с длиной волны 543 нм (гелий-неоновый лазер).

Дифференциальная сканирующая микрокалориметрия липидных везикул, модифицированных компонентами экстрактов. Гигантские одноламеллярные липосомы формировали из ДПФГ методом электроформации с помощью прибора Nanion vesicle prep pro (Германия). На стекла подавали переменное напряжение с амплитудой 3 В и частотой 10 Гц в течение 1 ч при температуре 55°C. Концентрация липида составляла 3 мМ. В экспериментальные образцы вводили кверцетин, мирицетин и рутин до достижения соотношения липид : флавонол, равного 10 : 1. Термограммы липосомальных суспензий получали при помощи дифференциального сканирующего микрокалориметра μDSC7 (Setaram, Франция). Воспроизводимости температурной зависимости теплоемкости достигали путем повторного нагревания образца сразу после охлаждения с постоянной скоростью 0.2°C/мин. Пики на термограммах характеризовали максимальной температурой основного фазового перехода (T_m) ДПФГ и шириной основного пика на полувысоте ($T_{1/2}$). Изменение указанных параметров позволяет судить о влиянии флавонолов на плотность упаковки мембранных липидов.

Параметры, характеризующие действие флавонолов на термотропное поведение липидов, определены путем вычисления среднего арифметического величин, полученных для 2 независимых серий приготовления липосом.

Величины RF , t , *ИИ*, ΔT_m , и $\Delta T_{1/2}$ представлены в виде среднее \pm стандартная ошибка среднего (среднее \pm SE).

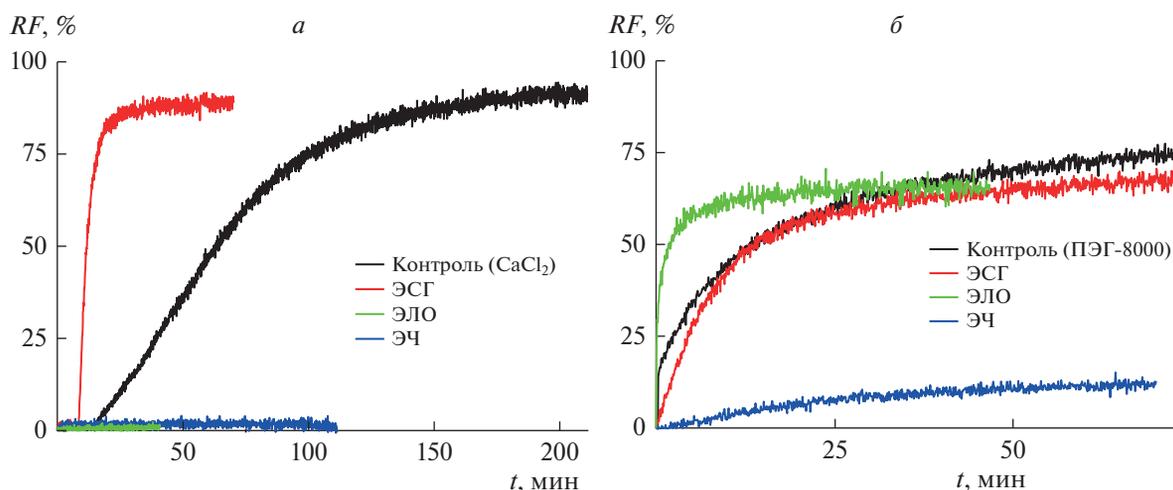


Рис. 1. Зависимость относительной интенсивности флуоресценции кальцеина (RF , %), вытекшего при (а) кальций-опосредованном слиянии ДОФХ/ДОФГ/ХОЛ (40/40/20 мол. %) липосом или (б) ПЭГ-8000-индуцированном слиянии ДОФХ/ХОЛ (80/20 мол. %) везикул в отсутствие (контроль, черная линия) или после инкубации с 100 мкг/мл ЭСГ (красная линия), ЭЛО (зеленая линия) и ЭЧ (синяя линия), от времени.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На рис. 1а представлены временные зависимости относительной интенсивности флуоресценции кальцеина (RF , %), вытекающего из ДОФХ/ДОФГ/ХОЛ (40/40/20 мол. %) липосом при слиянии везикул, индуцированном введением в суспензию 40 мМ CaCl_2 до и после инкубации с ЭСГ, ЭЛО и ЭЧ при концентрации 100 мкг/мл в течение 30 мин при комнатной температуре. В табл. 1 приведены средние значения максимальной утечки кальцеина (RF) при слиянии ДОФХ/ДОФГ/ХОЛ везикул под действием кальция в отсутствие и в присутствии различных экстрактов. Средняя максимальная утечка флуорофора

при слиянии немодифицированных экстрактами липидных везикул при введении хлорида кальция составляет около 90%. Снижение или рост этой величины указывает на ингибирование или активацию кальций-опосредованного слияния отрицательно заряженных везикул в присутствии соответствующего экстракта. Из рис. 1а и табл. 1 видно, что ЭЛО и ЭЧ существенно подавляют слияние ДОФХ/ДОФГ/ХОЛ везикул, вызванное введением в суспензию хлорида кальция: соответствующие величины RF составляют 8 и 2% соответственно. Для сравнения антифьюзионной активности экстрактов на основании значений RF в соответствии с формулой (1) были рассчитаны их индексы ингибирования ($ИИ$) (табл. 1). $ИИ$ ЭЛО

Таблица 1. Параметры, характеризующие влияние экстрактов в концентрации 100 мкг/мл на утечку кальцеина при слиянии везикул, сформированных из смеси ДОФХ/ДОФГ/ХОЛ (40/40/20 мол. %) или ДОФХ/ХОЛ (80/20 мол. %), при введении 40 мМ CaCl_2 или 20 вес. % ПЭГ-8000 соответственно

Экстракт	RF , %	t , мин	$ИИ$, %	RF , %	t , мин	$ИИ$, %
	CaCl_2			ПЭГ-8000		
–	90 ± 6	61 ± 6	–	75 ± 5	46 ± 8	–
ЭСГ	92 ± 5	9 ± 5	-3 ± 2	73 ± 6	33 ± 5	-10 ± 5
ЭЛО	$8 \pm 3^*$	–#	90 ± 3	72 ± 7	4 ± 2	-8 ± 9
ЭЧ	$2 \pm 1^*$	–#	97 ± 3	$13 \pm 5^*$	–#	79 ± 3

Примечание. RF – максимальная утечка флуоресцентного маркера при слиянии липосом, сформированных из смеси ДОФХ/ДОФГ/ХОЛ (40/40/20 мол. %) и ДОФХ/ХОЛ (80/20 мол. %), при добавлении в суспензию 40 мМ CaCl_2 или 20 вес. % ПЭГ-8000 в отсутствие (–) и в присутствии тестируемых экстрактов в концентрации 100 мкг/мл; t – константа времени, характеризующая кинетику высвобождения маркера при слиянии везикул (зависимость вытекания маркера от времени аппроксимирована одноэкспоненциальной функцией); $ИИ$ – индекс ингибирования экстрактами кальций- и ПЭГ-8000-опосредованного слияния липидных везикул различного состава.

Оценка не проведена ввиду малости величины RF , %.

* $p \leq 0.01$ (критерий Манна–Уитни–Уилкоксона, сравнение кальций- или ПЭГ-8000-индуцированной утечки красителя из везикул в отсутствие и в присутствии экстрактов).

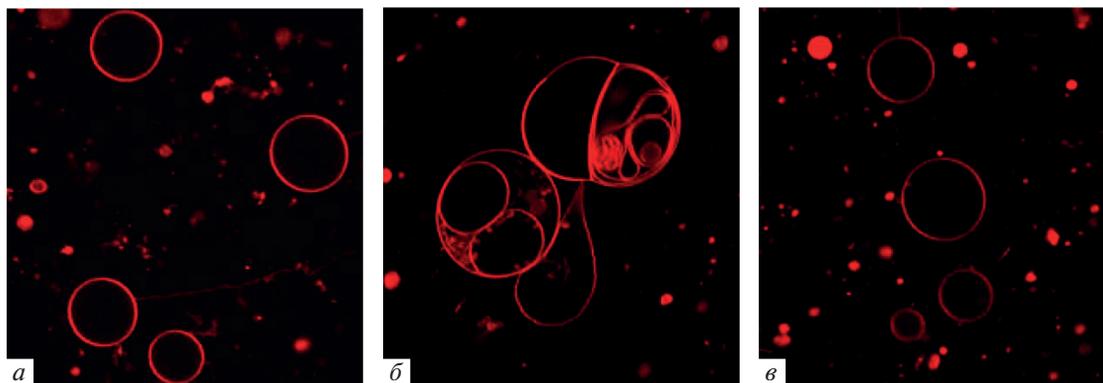


Рис. 2. Примеры флуоресцентных микрофотографий гигантских везикул, сформированных из смеси ДОФХ/ХОЛ (80/20 мол. %) и 1 мол. % флуоресцентного липидного зонда, дипальмитоилфосфатидилэтанолamina-N-(лиссамина родамин В сульфонила), в отсутствие каких-либо агентов (*а*), в присутствии 10% ПЭГ-8000 (*б*) и после введения 10 вес. % ПЭГ-8000 в суспензию липосом, предварительно обработанных 35 мкг/мл ЭЧ (*в*). Размер каждой микрофотографии составляет 65×65 мкм.

составляет около 90%, а в случае ЭЧ достигает практически 100% (табл. 1). ЭСГ способностью ингибировать кальций-опосредованное слияние отрицательно заряженных липосом не характеризуется (рис. 1*а* и табл. 1).

На рис. 1*б* представлены временные зависимости относительной интенсивности флуоресценции кальцеина (*RF*, %), вытекающего при слиянии ДОФХ/ХОЛ (80/20 мол. %) везикул после введения 20 вес. % ПЭГ-8000 до и после инкубации с 100 мкг/мл ЭСГ, ЭЛО и ЭЧ. Средняя максимальная утечка при слиянии немодифицированных экстрактами липосом при введении ПЭГ-8000 в отсутствие экстрактов составляет 75% (табл. 1). Из рис. 1*б* и табл. 1 видно, что ЭСГ и ЭЛО не способны подавлять ПЭГ-индуцированное слияние незаряженных везикул: соответствующие величины *RF* (79 и 72% соответственно) близки к контрольному значению. При этом как и в случае кальций-индуцированного слияния отрицательно заряженных липосом, ЭЧ подавляет слияние незаряженных везикул под действием ПЭГ-8000: *RF* составляет около 10%, а *ИИ* превышает 70% (табл. 1).

В табл. 1 также представлены характеристические времена высвобождения маркера при слиянии липосом в отсутствие и в присутствии экстрактов. Из представленных данных видно, что константа времени, характеризующая кинетику высвобождения маркера при слиянии ДОФХ/ДОФГ/ХОЛ (40/40/20 мол. %) и ДОФХ/ХОЛ (80/20 мол. %) везикул под действием кальция и ПЭГ, составляет около 60 и 50 мин соответственно. Обращает на себя внимание ускорение кинетики слияния ДОФХ/ДОФГ/ХОЛ (40/40/20 мол. %) везикул под действием кальция в присутствии ЭСГ и ДОФХ/ХОЛ (80/20 мол. %) липосом под действием ПЭГ-8000 в присутствии ЭЛО в несколько раз. Эти различия можно объяснить ускорением ад-

сорбции соответствующих индукторов слияния на мембранах, модифицированных тестируемыми экстрактами.

Для визуализации слияния везикул под действием ПЭГ-8000 и его ингибирования ЭЧ была проведена конфокальная флуоресцентная микроскопия гигантских однослойных везикул, сформированных из смеси ДОФХ/ХОЛ (80/20 мол. %). На рис. 2 представлены флуоресцентные микрофотографии ДОФХ/ХОЛ липосом в отсутствие каких-либо агентов (рис. 2*а*), в присутствии 10 вес. % ПЭГ-8000 (рис. 2*б*) и после введения 10 вес. % ПЭГ-8000 к липосомам, предварительно модифицированным 35 мкг/мл ЭЧ (рис. 2*в*). ПЭГ-8000 вызывает увеличение размера липосом, их деформацию и индуцирует образование многослойных и мультивезикулярных везикул (рис. 2*б*), что указывает на высокую эффективность слияния липидных везикул под действием полимера. При этом из рис. 2*в* видно, что ПЭГ-8000 не оказывает подобного эффекта на обработанные ЭЧ липидные везикулы: вероятность появления мультислойных структур мала, в суспензии в большом количестве обнаруживаются одиночные одноламеллярные везикулы. Эти данные подтверждают вывод о подавлении ЭЧ слияния везикул под действием ПЭГ-8000.

Для выяснения механизмов ингибирования кальций- и ПЭГ-индуцированного слияния везикул ЭЛО и ЭЧ нами проведена оценка влияния на этот процесс некоторых мажорных компонентов экстрактов: флавонолов, входящих в состав ЭЛО, кверцетина, рутина и мирицетина, а также пентациклических тритерпеноидов, обнаруживаемых в составе ЭЧ, бетулина и люпеола. Химические структуры перечисленных соединений представлены на рис. 3.

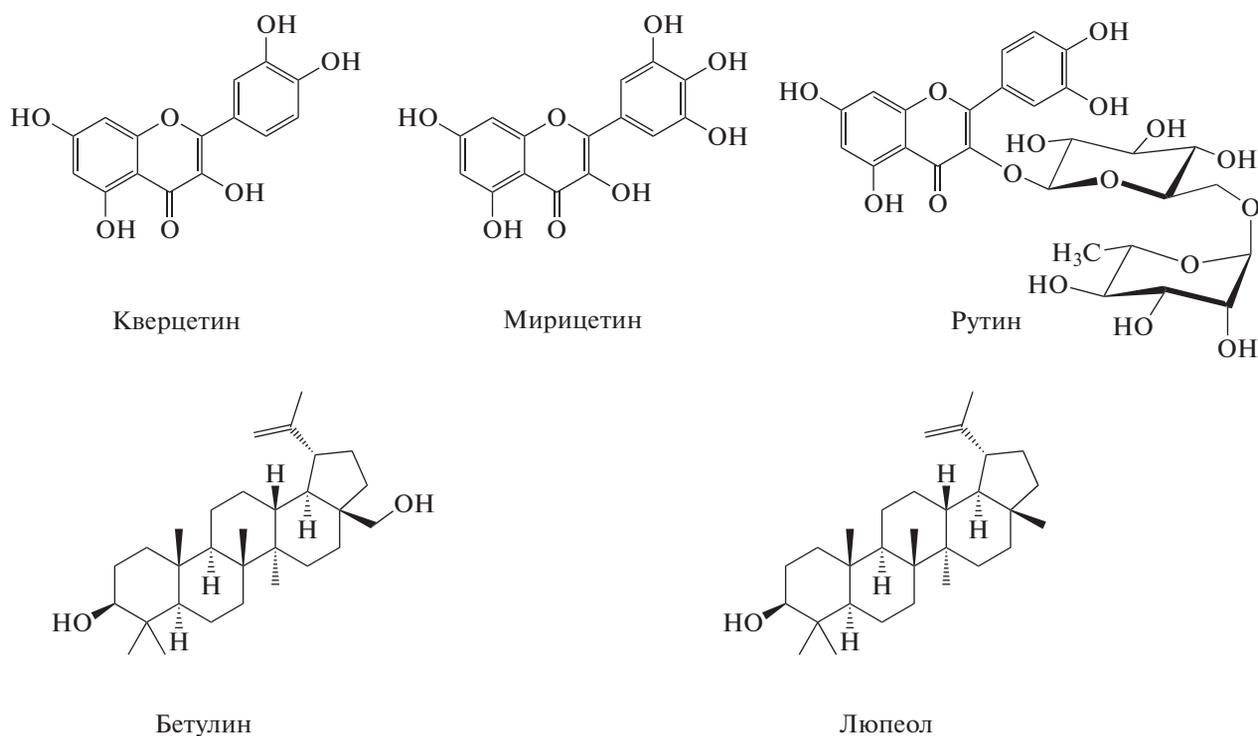


Рис. 3. Химическая структура некоторых компонентов ЭЛО и ЭЧ: кверцетина, мирицетина, рутина, бетулина и люпеола.

Рисунок 4 и табл. 2 суммируют данные, полученные при исследовании антифюзогенной активности тестируемых компонентов ЭЛО и ЭЧ. Из рис. 4а и табл. 2 видно, что флавонолы ЭЛО, кверцетин и мирицетин, ингибируют слияние отрицательно заряженных мембран под действием кальция (*ИИ* составляет около 85 и 60% соответственно), другой компонент ЭЛО, гликозид кверцетина, рутин, таким эффектом не характеризуется. Таким образом, подавление кальций-индуцированного слияния липидных везикул под действием ЭЛО можно связывать с наличием в его составе кверцетина и мирицетина. Неспособность флавонолов ингибировать слияние незаряженных липосом под действием ПЭГ-8000 (рис. 4б и табл. 2) хорошо согласуется с отсутствием влияния ЭЛО на этот процесс (табл. 1).

Для понимания взаимосвязи между влиянием компонентов ЭЛО на слияние отрицательно заряженных липосом, обогащенных фосфатидилглицерином, и их способностью модифицировать физические свойства фосфатидилглицерин-содержащих мембран было изучено термотропное поведение ДПФГ до и после введения в липосомальную суспензию кверцетина, мирицетина и рутина. В отсутствие флавонолов температура главного фазового перехода ДПФГ, T_m , составляет 41.3°C, ширина пика на полувысоте, $T_{1/2}$, равна 0.6°C (рис. 5). Основные параметры, характеризующие плавление

ДПФГ в присутствии флавонолов, представлены в табл. 2. Кверцетин и мирицетин при соотношении липид : флавонол 10 : 1 вызывают падение T_m на 1.2 и 1.1°C соответственно. При этом кверцетин увеличивает $T_{1/2}$ на 0.8°C, а мирицетин — на 0.6°C (табл. 2). Введение рутина в такой же концентрации не сопровождается изменением термотропного поведения ДПФГ (табл. 2). Наблюдаемая корреляция между параметрами, характеризующими плавление ДПФГ в присутствии флавонолов, и их антифюзогенной активностью в отношении кальций-индуцированного слияния фосфатидилглицерин-содержащих везикул (табл. 2) указывает на взаимосвязь между их способностью влиять на плотность упаковки мембранообразующих липидов и ингибировать слияние липосом. Аналогичное заключение было сделано нами при сопоставлении влияния алкалоидов на кальций-опосредованное слияние везикул и термотропное поведение липидов [23].

Ранее нами показано, что кверцетин и мирицетин оказывают менее выраженное действие на термотропное поведение дипальмитоилфосфолина (ДПФХ), чем ДПФГ: при соотношении ДПФХ : флавонол 10 : 1 кверцетин и мирицетин вызывают падение T_m на 0.3°C и рост $T_{1/2}$ на 0.7 и 0.2°C соответственно [24]. Как и в случае ДПФГ, рутин не оказывает влияния на плавление ДПФХ [24]. С учетом данных о значительном по-

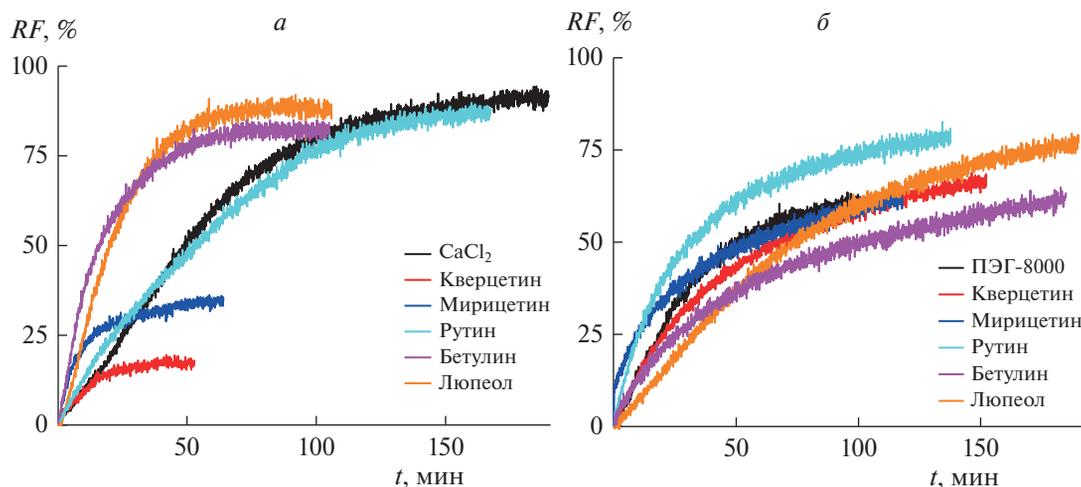


Рис. 4. Зависимость относительной интенсивности флуоресценции (RF , %) кальцеина, вытекшего при (а) кальций-опосредованном слиянии ДОФХ/ДОФГ/ХОЛ (40/40/20 мол. %) липосом или (б) ПЭГ-8000-индуцированном слиянии ДОФХ/ХОЛ (80/20 мол. %) везикул в отсутствие (контроль, черная линия) и после инкубации с 20 мкМ флавонолов (кверцетина (красная линия), мирицетина (синяя линия) и рутина (циановая линия)) или 10 мкМ пентациклических тритерпеноидов (бетулина (фиолетовая линия) и люпеола (оранжевая линия)).

давлении кальций-опосредованного слияния фосфатидилглицерин-содержащих везикул в присутствии кверцетина и мирицетина и отсутствием ингибирующей способности этих флавонолов в отношении ПЭГ-8000-индуцированного слияния фосфатидилхолин-обогащенных везикул (табл. 2), выраженное действие кверцетина и мирицетина на плавление ДПФГ (табл. 2) и снижение эффектов в случае ДПФХ [24] позволяют полагать, что антифьюзогенная активность этих флавонолов обусловлена их способностью разупорядочивать мембрану из фосфатидилглицеринов. При этом менее выраженное влияние кверцетина и мирицетина на

плотность упаковки бислоев из фосфатидилхолинов приводит к неспособности флавонолов подавлять слияние фосфатидилхолин-обогащенных везикул.

На рис. 4 видно, что пентациклические тритерпеноиды, входящие в состав ЭЧ, бетулин и люпеол, практически не подавляют слияния ни отрицательно заряженных везикул под действием кальция (рис. 4а), ни незаряженных липосом в присутствии ПЭГ-8000 (рис. 4б). Таким образом, ввиду невыраженной антифьюзогенной активности этих тритерпеноидов в обеих системах (табл. 2), бетулин и люпеол не могут быть компонентами,

Таблица 2. Параметры, характеризующие влияние компонентов тестируемых экстрактов, на утечку кальцеина при слиянии везикул, сформированных из смеси ДОФХ/ДОФГ/ХОЛ (40/40/20 мол. %) или ДОФХ/ХОЛ (80/20 мол. %), под действием 40 мМ CaCl_2 или 20 вес. % ПЭГ-8000 соответственно

Компонент, мкМ	RF , %	$ИИ$, %	RF , %	$ИИ$, %	$-\Delta T_m$, °C	$\Delta T_{1/2}$, °C
	CaCl_2		ПЭГ-8000		ДПФГ	
—	90 ± 6	—	75 ± 5	—	—	—
Кверцетин, 20	$9 \pm 1^*$	85 ± 2	77 ± 11	-2 ± 5	1.2 ± 0.2	0.8 ± 0.1
Мирицетин, 20	$31 \pm 3^*$	58 ± 4	76 ± 12	3 ± 10	1.1 ± 0.2	0.6 ± 0.2
Рутин, 20	88 ± 1	-5 ± 2	80 ± 3	-7 ± 6	0	0
Бетулин, 10	90 ± 2	1 ± 1	67 ± 5	11 ± 2	0.1 ± 0.1^a	0.1 ± 0.1^a
Люпеол, 10	82 ± 9	7 ± 8	70 ± 4	8 ± 2	0.1 ± 0.1^a	0.2 ± 0.1^a

Примечание. ^a согласно [25]; RF — максимальная утечка флуоресцентного маркера при слиянии липосом; $ИИ$ — индекс ингибирования мажорными компонентами тестируемых экстрактов кальций- и ПЭГ-8000-опосредованного слияния везикул; ΔT_m , $\Delta T_{1/2}$ — изменение температуры и полуширины пика главного фазового перехода ДПФГ (соотношение липид : флавонол и липид : тритерпеноид составляет 10 : 1 и 50 : 1, соответственно).

* $p < 0.01$ (критерий Манна–Уитни–Уилкоксона, сравнение кальций- или ПЭГ-8000-индуцированной утечки красителя из везикул в отсутствие и в присутствии компонентов экстрактов).

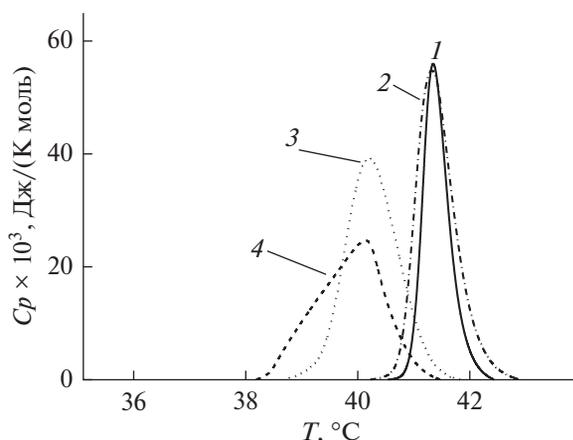


Рис. 5. Термограммы плавления ДПФГ ($C_p(T)$) в отсутствие (1) и в присутствии рутина (2), мирицетина (3) и кверцетина (4). Соотношение липид : флавонол составляет 10 : 1.

ответственными за подавление ЭЧ слияния везикул под действием как кальция, так и ПЭГ-8000 (табл. 1). Следует отметить, что тестируемые тритерпеноиды характеризуются невыраженным действием на термотропное поведение ДПФГ (T_m уменьшается менее чем на 0.3°C , а $T_{1/2}$ увеличивается на 0.1°C (табл. 2)) и ДПФХ [25]. Это хорошо согласуется с предположением о связи разупорядочивающей способности тестируемых соединений с их антифьюзогенной активностью: слабое влияние бетулина и люпеола на плавление ДПФГ (табл. 2) и ДПФХ [25] выражается в неспособности этих тритерпеноидов ингибировать слияние фосфатидилглицерин- и фосфатидилхолин-обогатенных везикул (табл. 2).

Маловероятно, что антифьюзогенная способность ЭЧ обусловлена присутствием в его составе стероидов, поскольку они известны своей способностью увеличивать отрицательную спонтанную кривизну липидных монослоев при адсорбции [26] и тем самым могут скорее индуцировать слияние мембран. Наличие гидроксильной группы в боковой цепи гидрофильного производного ланостерина, инотодиола, может препятствовать его погружению в углеводородный остов бислоя и изменять трансмембранный профиль латерального давления таким образом, чтобы увеличивать энергию образования промежуточных интермедиатов слияния и подавлять процесс объединения мембран. Ингибирование экстрактом чаги слияния незаряженных липидных везикул может указывать на противовирусное действие этого экстракта.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Источник финансирования. Работа выполнена при частичной финансовой поддержке ЗАО “Эвалар”. Исследования влияния флавонолов на сли-

яние мембран и термотропное поведение липидов выполнены при поддержке Российского научного фонда (проект № 22-15-00417).

Соответствие принципам этики. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Komura M., Suzuki M., Sangsriratanakul N., Ito M., Takahashi S., Alam M.S., Ono M., Daio C., Shoham D., Takehara K. 2019. Inhibitory effect of grapefruit seed extract (GSE) on avian pathogens. *J. Vet. Med. Sci.* **81**, 466–472.
2. Go C.C., Pandav K., Sanchez-Gonzalez M.A., Ferrer G. 2020. Potential role of xylitol plus grapefruit seed extract nasal spray solution in COVID-19: Case series. *Cureus.* **12**, e11315.
3. Monika J.A., Sudipta C., Malleswara R.E., Lilly G. 2016. Effect of hippophae rhamnoides leaf extract against dengue virus infection in U937 cells. *Virol-Mycol.* **5**, 157.
4. Singh P.K., Rawat P. 2017. Evolving herbal formulations in management of dengue fever. *J. Ayurveda Integr. Med.* **8**, 207–210.
5. Jain M., Ganju L., Katiyal A., Padwad Y., Mishra K.P., Chanda S., Karan D., Yogendra K.M.S., Sawhney R.C. 2008. Effect of *Hippophae rhamnoides* leaf extract against Dengue virus infection in human blood-derived macrophages. *Phytomedicine.* **15**, 793–799.
6. Enkhtaivan G., Maria John K.M., Pandurangan M., Hur J.H., Leutou A.S., Kim D.H. 2017. Extreme effects of seabuckthorn extracts on influenza viruses and human cancer cells and correlation between flavonol glycosides and biological activities of extracts. *Saudi J. Biol. Sci.* **24**, 1646–1656.
7. Shahzad F., Anderson D., Najafzadeh M. 2020. The antiviral, anti-inflammatory effects of natural medicinal herbs and mushrooms and SARS-CoV-2 infection. *Nutrients.* **12**, 2573.
8. Arunachalam K., Sasidharan S., Yang X. 2022. A concise review of mushrooms antiviral and immunomodulatory properties that may combat against COVID-19. *Food Chem. Advances.* **1**, 100023.
9. Eid J.I., Das B., Al-Tuwaijri M.M., Basal W.T. 2021. Targeting SARS-CoV-2 with Chaga mushroom: An in silico study toward developing a natural antiviral compound. *Food. Sci. Nutr.* **9**, 6513–6523.
10. Pan H.H., Yu X.T., Li T., Wu H.L., Jiao C.W., Cai M.H., Li X.M., Xie Y.Z., Wang Y., Peng T. 2013. Aqueous extract from a Chaga medicinal mushroom, *Inonotus obliquus* (higher Basidiomycetes), prevents herpes simplex virus entry through inhibition of viral-induced membrane fusion. *Int. J. Med. Mushrooms.* **15**, 29–38.
11. Tian J., Hu X., Liu D., Wu H., Qu L. 2017. Identification of *Inonotus obliquus* polysaccharide with broad-spectrum antiviral activity against multi-feline viruses. *Int. J. Biol. Macromol.* **95**, 160–167.
12. Seetaha S., Ratanabunyoung S., Tabtimmai L., Choowongkamon K., Rattanasrisomporn J., Choengpanya K. 2020. Anti-feline immunodeficiency virus reverse transcriptase properties of some medicinal and edible mushrooms. *Vet. World.* **13**, 1798–1806.

13. Choengpanya K., Ratanabunyong S., Seetaha S., Tabtimmai L., Choowongkomon K. 2021. Anti-HIV-1 reverse transcriptase property of some edible mushrooms in Asia. *Saudi J. Biol. Sci.* **28**, 2807–2815.
14. Avula B., Sagi S., Wang Y.H., Wang M., Gafner S., Manthey J.A., Khan I.A. 2016. Liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry analysis of limonoids and flavonoids in seeds of grapefruits, other citrus species, and dietary supplements. *Planta Med.* **82**, 1058–1069.
15. Yogendra Kumar M.S., Tirdude R.J., Maheshwari D.T., Bansal A., Misra K. 2013. Antioxidant and antimicrobial properties of phenolic rich fraction of Seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides L.*) leaves in vitro. *Food Chem.* **141**, 3443–3450.
16. Pop R.M., Socaciu C., Pintea A., Buzoianu A.D., Sanders M.G., Gruppen H., Vincken J.-P. 2013. UHPLC/PDA-ESI/MS analysis of the main berry and leaf flavonol glycosides from different carpathian *Hippophae rhamnoides L.* varieties. *Phytochem. Anal.* **24**, 484–492.
17. Criste A., Urcan A.C., Bunea A., Pripon Furtuna F.R., Olah N.K., Madden R.H., Corcionivoschi N. 2020. Phytochemical composition and biological activity of berries and leaves from four romanian sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides L.*) varieties. *Molecules.* **25**, 1170.
18. Nikitina S.A., Khabibrakhmanova V.R., Sysoeva M.A. 2016. Composition and biological activity of triterpenes and steroids from *Inonotus obliquus* (chaga). *Biochem. (Moscow) Supplement Series B.* **62**, 369–375.
19. Chicka M.C., Hui E., Liu H., Chapman E.R. 2008. Synaptotagmin arrests the SNARE complex before triggering fast, efficient membrane fusion in response to Ca^{2+} . *Nat. Struct. Mol. Biol.* **15**, 827–835.
20. Lai A.L., Millet J.K., Daniel S., Freed J.H., Whitaker G.R. 2017. The SARS-CoV fusion peptide forms an extended bipartite fusion platform that perturbs membrane order in a calcium-dependent manner. *J. Mol. Biol.* **429**, 3875–3892.
21. Yang Q., Guo Y., Li L., Hui S.W. 1997. Effects of lipid headgroup and packing stress on poly(ethylene glycol)-induced phospholipid vesicle aggregation and fusion. *Biophys. J.* **73**, 277–282.
22. Lentz B.R. 2007. PEG as a tool to gain insight into membrane fusion. *Europ. Biophys. J.* **36**, 315–326.
23. Shekunov E.V., Efimova S.S., Yudin N.M., Muryleva A.A., Zarubaev V.V., Slita A.V., Ostroumova O.S. 2021. Plant alkaloids inhibit membrane fusion mediated by calcium and fragments of MERS-CoV and SARS-CoV/SARS-CoV-2 fusion peptides. *Biomedicine.* **9**, 1434.
24. Ефимова С.С., Захарова А.А., Чернышова Д.Н., Остроумова О.С. 2022. Особенности действия экстрактов семян грейпфрута, листьев облепихи и чаги на свойства модельных липидных мембран. *Цитология.* В печати.
25. Efimova S.S., Ostroumova O.S. 2021. Is the membrane lipid matrix a key target for action of pharmacologically active plant saponins? *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 3167.
26. Chlanda P., Mekhedov E., Waters H., Schwartz C.L., Fischer E.R., Ryham R.J., Cohen F.S., Blank P.S., Zimmerberg J. 2016. The hemifusion structure induced by influenza virus haemagglutinin is determined by physical properties of the target membranes. *Nat. Microbiol.* **1**, 16050.

Mechanisms of Inhibition of Lipid Vesicles Fusion by Extracts of Chaga and Buckthorn Leaves

S. S. Efimova^{1,*}, P. D. Zlodeeva¹, E. V. Shekunov¹, O. S. Ostroumova¹

¹*Institute of Cytology, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, 194064 Russia*

*e-mail: efimova@incras.ru

The ability of extracts of grapefruit seeds (ESG), sea buckthorn leaves (ESBL), and chaga (EC) to inhibit membrane fusion was evaluated. It was established that ESBL and EC inhibited the fusion of phosphatidylglycerol-enriched lipid vesicles under the action of calcium: the inhibition index was about 90 and 100%, respectively. ESG did not inhibit the fusion of negatively charged liposomes induced by the introduction of calcium. EC also inhibited the fusion of vesicles made from a mixture of phosphatidylcholine and cholesterol under the action of polyethylene glycol with a molecular weight of 8000 Da (inhibition index was 80%). ESG and ESBL had no effect on the polymer-induced fusion of uncharged liposomes. The effects of some major components of the tested extracts on the fusion of vesicles were also evaluated. It was shown that the major flavonols of ESBL, quercetin and myricetin, inhibited the fusion of negatively charged membranes under the action of calcium (the inhibition index was about 85 and 60%, respectively), while rutin had no effect. The ability of quercetin and myricetin to decrease the melting temperature of phosphatidylglycerol and to increase the half-width of the main peak was demonstrated. The observed correlation between the parameters characterizing the lipid thermotropic behavior in the presence of quercetin and myricetin and their antifusogenic activity may indicate the relationship between the ability of flavonols to influence the lipid packing and to inhibit vesicle fusion. Pentacyclic triterpenoids of EC, betulic acid and lupeol, did not suppress the fusion of vesicles under the action of either calcium or polyethylene glycol, and their presence in EC could not be responsible for the antifusogenic activity of the extract. The ability of EC to suppress membrane fusion may indicate a possible antiviral activity of these extracts against enveloped viruses.

Keywords: natural extracts, membrane fusion inhibitors, liposomes, flavonols, saponins

УДК 577.352

ШУМ В УЛЬТРАКОРОТКИХ ЭЛАСТИЧНЫХ МЕМБРАННЫХ НАНОТРУБКАХ

© 2022 г. К. А. Иванова^{a, b}, П. В. Башкиров^{a, c, *}^aФедеральный научно-клинический центр физико-химической медицины
Федерального медико-биологического агентства, Москва, 119435 Россия^bМосковский физико-технический институт, Долгопрудный, 141701 Россия^cНаучно-исследовательский институт системной биологии
и медицины Роспотребнадзора, Москва, 117246 Россия

*e-mail: pavel.bashkirov@sbsbiomed.ru

Поступила в редакцию 04.05.2022 г.

После доработки 02.06.2022 г.

Принята к публикации 03.06.2022 г.

Проведено исследование флуктуаций ионного тока в эластичных нанопорах в широком диапазоне частот и представлено полное описание их шумовых характеристик. В качестве модели эластичной нанопоры использовался просвет ультракоротких (<200 нм) липидных нанотрубок (укНТ), заполненный раствором электролита. Показано, что на низких частотах ($f < 300$ Гц) превалирует $1/f$ -тип шума. Этот низкочастотный шум был проанализирован при различных концентрациях соли и геометрических размерах нанопоры и обнаружено, что мощность $1/f$ шума пропорциональна обратному числу носителей заряда, что хорошо согласуется с эмпирическим соотношением Хуга. Линейная аппроксимация показала, что параметр Хуга для эластичных нанопор равен $(2.5 \pm 0.5) \times 10^{-3}$ – это оказалось на порядок больше, чем для твердотельных аналогов. В высокочастотном режиме ($f > 1$ кГц) преобладающим становится белый шум, плотность мощности которого линейно зависит от ширины пропускания сигнала и при уменьшении длины укНТ и увеличении ионной силы хорошо согласуется с представлением его как суммы теплового шума Джонсона–Найквиста и дробового шума Шоттки.

Ключевые слова: нанопоры, липидный бислой, мембранная нанотрубка, электрические шумы**DOI:** 10.31857/S0233475522050061

ВВЕДЕНИЕ

Нанопоры, заполненные раствором электролита, через просвет которых под действием электрического поля течет ионный ток, обладают отличным потенциалом для использования в качестве универсального детектора и анализатора одиночных молекул ДНК и белков [1–3] благодаря своим исключительным разрешающим и пропускным способностям, а также низкой стоимости. Нанопоры могут быть как биологическими (например, порообразующие белки, встроенные в липидную [4, 5] или полимерную [6] мембрану), так и синтетическими (искусственными), полученными методами травления или высверливания отверстия в тонких пленках различного вещества [3, 7]. Независимо от природы нанопоры измерения основаны на регистрации и анализе формы импульсов падения ионного тока, вызванных электрофоретическим переносом одиночных молекул через просвет нанопоры. Средние значения глубины и длительности провалов тока несут информацию об объеме и суммарном заря-

де молекулы [2, 5]. Характерная форма сигнала отражает динамические преобразования молекулы на микросекундном или наносекундном временном масштабе и может быть использована для определения коэффициента вращательной диффузии и дипольного момента молекулы [8, 9]. Важнейшим фактором, определяющим чувствительность данного метода, является соотношение сигнал/шум, которое зависит от природы, структуры и формы нанопоры [10–14]. Ознакомиться с особенностями шумовых характеристик биологических и синтетических нанопор, а также с методами, направленными на уменьшение шумов, можно в обзорах [15, 16].

В то время как чувствительность биологических нанопор намного превышает разрешающую способность искусственных аналогов [16], последние в свою очередь не имеют ограничений в размерах и намного стабильнее. Для пассивации, изменения гидрофобных/гидрофильных свойств, заряда поверхности твердотельных нанопор используются различные модификаторы. Липидный бислой (ЛБ) – это двумерный жидкий кристалл, поэтому

молекулы, закрепившиеся на его поверхности, могут свободно перемещаться вдоль него. Следовательно, модификация нанопор липидом не только придает им биомиметические свойства [8, 17–21]. Неспецифическая адсорбция молекулы анализита на поверхность ЛБ или ее специфическое связывание с рецептором, расположенным в ЛБ, существенно повышает пропускную способность нанопоры, предотвращает забивание просвета, а высокая вязкость липидного бислоя замедляет прохождение молекулы через нанопору, увеличивая длительность сигнала, что имеет большое значение для улучшения соотношения сигнал/шум [8, 21].

Липидный бислой обладает изгибной упругостью, что позволяет формировать из него устойчивые мембранные полые цилиндры [22]. В клетках такие трубки соединяют мембранные компартменты между собой, формируя транспортную сеть, в которой вещества переносятся через просвет или вдоль поверхности трубок [23, 24]. Радиус мембранного цилиндра определяется отношением модуля изгиба к латеральному натяжению мембраны. Из-за низкого натяжения мембран в клетках просвет трубочек обычно значительно превышает размеры транспортируемых молекул. Однако мембранные нанотрубки (НТ) с радиусом просвета 10 нм и менее могут быть сформированы из модельных бислоев липидных мембран (БЛМ), латеральное натяжение которых на несколько порядков больше, чем у клеток [25]. Использование пэтч-кламп-подхода для вытягивания НТ из плоской БЛМ стеклянной или кварцевой микропипеткой позволяет проводить измерение ионного тока, текущего через просвет НТ [26]. Высокое латеральное натяжение обеспечивает стабильность ультракоротких НТ (укНТ) длиной 50–200 нм, которые по своим геометрическим характеристикам соответствуют твердотельным нанопорам, используемым для детектирования одиночных макромолекул. Только в отличие от твердотельных нанопор стенка мембранных нанотрубок эластична и может упруго деформироваться под действием внешних факторов [27]. Для определения минимальной величины деформации, равно как и минимального размера макромолекулы, проходящей через просвет укНТ, который может быть разрешен как характерный сигнал изменения проводимости просвета укНТ, необходимо провести исследование шума ионного тока, текущего через укНТ.

В данной работе мы представляем исследование шума ионного тока для укНТ как в низкочастотном, так и высокочастотном режимах. Дан краткий обзор общих характеристик эластичных нанопор, для напряжений менее 100 мВ, показано линейное соотношение зависимости ток–напряжение (I – U) со значениями сопротивления, которые могут варьироваться с изменением длины и радиуса нанопоры. Мы показали, что спек-

тральная плотность мощности высокочастотного тока хорошо описывается тепловым шумом Джонсона и дробовым шумом Шоттки. Исследование зависимости низкочастотного шума $1/f$ в укНТ различного размера и заполненных электролитом разной концентрации показало, что этот шум, как и в твердотельных нанопорах [28], связан с количеством носителей заряда и описывается эмпирическим соотношением Хуга. В заключение мы, используя наши результаты для расчета соотношения сигнал/шум, определяем оптимальные условия, в которых возможно детектирование деформации укНТ одиночным белком.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Формирование БЛМ. Для приготовления модельных мембран использовали липиды (Avanti Polar Lipids Inc., США): 1,2-диолеоил-*sn*-глицеро-3-фосфоэтаноламин (ДОФЭ), 1,2-диолеоил-*sn*-глицеро-3-фосфолхолин (ДОФХ) и холестерин (Хол) и органические растворители, сквалан, октан и декан (Sigma, США). Растворенные в хлороформе липиды смешивались в молярном соотношении ДОФХ : ДОФЭ : Хол 6 : 3 : 1, после чего хлороформ испаряли под слабой струей аргона и полученную сухую смесь липидов растворяли в сквалане и в смеси октан/декан 1 : 1 в концентрациях 20 и 10 г/л соответственно. Плоские липидные мембраны формировали методом Рудина–Мюллера [29] на отверстиях медной сетки, обычно используемой в электронной микроскопии в качестве подложки для образца. Предварительно на поверхность сеточек наносили небольшое (0.4 мкл) количество раствора липидов в смеси октан/декан, после чего органический растворитель испаряли в атмосфере азота в течение 10–15 мин. Далее обработанную сетку закрепляли на дне чашки Петри и заполняли чашку буферным раствором с pH 7.0. Все растворы готовились путем разведения стокового раствора (1М KCl, 20 мМ HEPES, 5 мМ EDTA) бидистиллированной водой. Далее на отверстия в медной сетке наносили толстые пленки из раствора липидов в сквалане. БЛМ спонтанно формировались в результате сужения таких пленок под действием расклинивающего давления, при этом весь лишний липидный материал и растворитель выдавливался на периферию, где формировался тороидальный мениск – резервуар липида. За образованием БЛМ наблюдали с помощью световой микроскопии.

Формирование укНТ. Липидные нанотрубки (НТ) вытягивали из БЛМ стеклянной или кварцевой микропипеткой с радиусом кончика около 1 мкм, используя метод пэтч-кламп, подробный протокол описан в работах [27, 30]. Объем пэтч-пипетки заполняли тем же раствором электролитом, что и чашку Петри. Внутрь пипетки помещали измерительный Ag/AgCl-электрод. Ag/AgCl-элек-

трод заземления располагали в объеме чашки Петри. Электрическое сопротивление пэтч-пипетки в буфере 100 мМ КСl составляло 3–6 МОм.

Формирование НТ контролировали с помощью измерения ионного тока, используя электрофизиологический пэтч-кламп-усилитель (Axon 200B, Molecular Devices Inc., США). Ионный ток I измеряли в режиме фиксации разности потенциалов $U = 100$ мВ между электродами. Пипетку медленно подводили к БЛМ с помощью пьезомикроманипуляторов (Sensapex, Финляндия) до формирования плотного контакта между кончиком пипетки и БЛМ (сопротивление доступа более 10 ГОм). Далее участок мембраны, изолированный внутри пипетки, разрушали коротким электрическим импульсом высокого напряжения или скачком отрицательного гидростатического давления, подаваемого к пипетке через внешний порт держателя. После этого пипетку плавно отводили вертикально от БЛМ и вытягивали НТ, которая образовывалась в результате коллапса (резкого сужения) мембранного катеноида при его критическом удлинении [26, 31]. Момент формирования НТ регистрировали по резкому падению измеряемого ионного тока. Длину НТ контролировали с помощью прецизионного нанопозиционера (ESA-CSA, Newport, США) и контроллера к нему (Newport Motion Controller, Model 860-C2, Newport, США), который позволяет менять вертикальное смещение пипетки в диапазоне 30 мкм с точностью шага 10 нм. Показания контроллера нанопозиционера, усилителя и значение подаваемого напряжения оцифровывали и записывали на жесткий диск компьютера с помощью системы сбора данных (Digit Data 1550, Molecular Devices Inc., США). Данные собирали с частотой дискретизации (1/100 кГц) с использованием программного обеспечения pClamp 9.2 (Molecular Devices, США). Для защиты от вибрации и внешних радиационных электрических помех экспериментальная установка была размещена на антивибрационном столе и заключена в металлический ящик Фарадея. Все оборудование (корпус микроскопа, антивибрационный стол и изолированные части) было заземлено.

Радиус и длину просвета НТ находили из аппроксимации зависимости измеряемой проводимости $G = I/U$ от величины вертикального смещения микропипетки гиперболической функций, как это подробно описано в [27]. Вкратце, радиус НТ находили, используя уравнение Ома для цилиндрического проводника $r = \sqrt{\frac{G_{NT} L_{NT}}{\gamma \pi}}$, где L_{NT} — длина НТ (фиксируется нанопозиционером), G_{NT} — ионная проводимость просвета НТ, γ — удельная проводимость электролита, заполняющего внутренний просвет НТ, которая для электронейтральных мембран равна объемному значению [32].

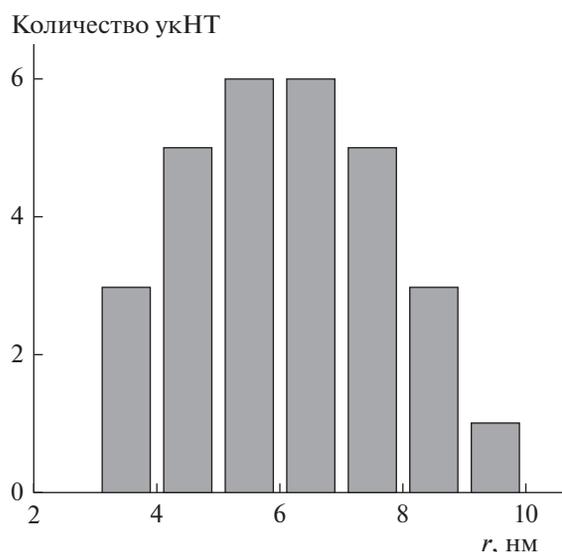


Рис. 1. Гистограмма распределения значений радиусов просвета ультракоротких нанотрубок (укНТ), вытянутых из разных БЛМ с липидным составом ДОФХ : ДОФЭ : Хол в мольном соотношении 6 : 3 : 1.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Общая характеристика эластичных нанопор. Согласно линейной теории упругости Хельфрика, значение радиуса НТ определяется исключительно механическими параметрами мембраны, а именно отношением модуля изгиба k к латеральному

натяжению σ : $r = \sqrt{\frac{k}{2\sigma}}$. Модуль изгиба мембраны определяется ее липидным составом, и для используемой нами мембраны он составляет $\sim 0.6 \times 10^{-19}$ Дж [25], в то время как значение латерального натяжения может заметно меняться от мембраны к мембране. Поэтому радиус просвета НТ, вытянутых из разных БЛМ, был в диапазоне 3.5–9.0 нм (рис. 1) со средним значением $r = 6.0 \pm 1.6$ нм. Было показано, что радиус НТ согласно линейной теории упругости не изменялся при укорочении НТ до 50 нм. При значениях длины 50–200 нм геометрические параметры просвета ультракоротких НТ (укНТ) становятся сравнимыми с размерами твердотельных нанопор, обычно используемых для детектирования одиночных молекул [3]. Стоит отметить, что минимальный диаметр твердотельных нанопор, поверхность которых удавалось покрыть липидным бислоем, составлял 17 нм [33]. Таким образом, мембранные укНТ представляют собой самые узкие наноканалы, чья внутренняя поверхность является двумерной жидкостью — липидным бислоем.

Исследование вольт-амперных характеристик укНТ при различных концентрациях электролита показало линейную зависимость тока от напряжения. Так, на рис. 2 изображены вольт-амперные за-

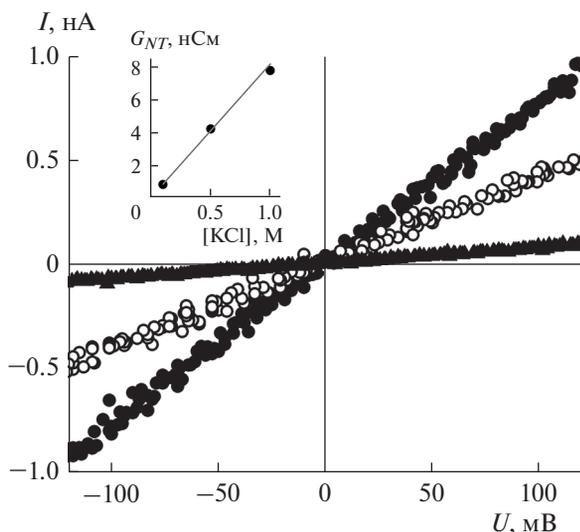


Рис. 2. Вольт-амперная характеристика укНТ при различных концентрациях электролита: черные точки соответствуют концентрации электролита KCl 1 М, белые точки – 0.5 М, черные треугольники – 0.1 М. Радиус просвета укНТ 5 нм, длина 100 нм. На вставке – зависимость проводимости просвета укНТ от концентрации электролита, вычисленная из линейной аппроксимации вольт-амперных характеристик укНТ.

висимости, полученные при трех различных концентрациях электролита (0.1, 0.5 и 1 М KCl) для одной и той же укНТ с длиной 100 нм и радиусом просвета 5 нм. Приведенные на рис. 2 измерения демонстрируют, что для всех значений ионной силы в диапазоне от –100 до 100 мВ ток линейно зависит от напряжения, откуда следует, что изменение формы укНТ – расширение под действием электрокапиллярных сил [31] при указанных значениях напряжения не существенно. Важно, что проводимость просвета укНТ, G_{NT} , вычисленная из наклона прямых $I(U)$ пропорциональна концентрации электролита (рис. 2, вставка), следовательно, радиус укНТ, сформированной из незаряженных липидов, не меняется с увеличением или уменьшением концентрации ионов в омывающем ее растворе.

На рис. 3а изображены записи ионного тока для просвета укНТ с одинаковым радиусом, но разной длиной, которые существенно различаются по сопротивлению. Более низкое сопротивления соответствует укНТ длиной 70 нм. Увеличение длины укНТ в 4 раза ожидаемо в 4 раза увеличивает электрическое сопротивление ее просвета. Обе записи получены при приложенном напряжении 100 мВ и на частотах усилителя 100 и 1 кГц, как указано на рис. 3а. Отфильтрованные на 100 кГц сигналы ионного тока (черные кривые на рис. 3а) демонстрируют почти одинаковую амплитуду флуктуаций тока, что отражается в незначительном раз-

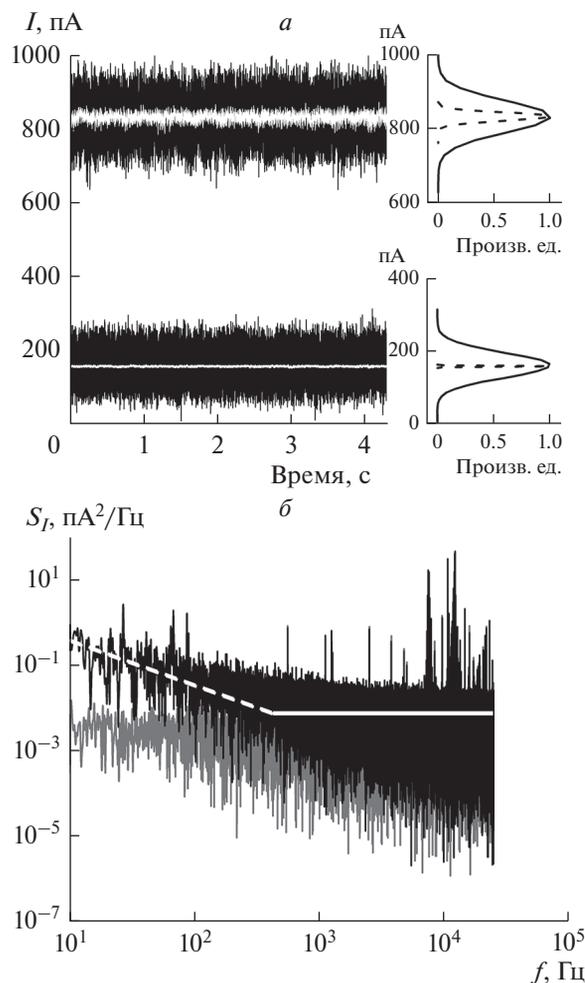


Рис. 3. а – Записи ионного тока просвета укНТ при приложенном напряжении 100 мВ при разных длинах: более низкое сопротивление соответствует НТ длиной 70 нм, более высокое сопротивление – 300 нм. Записи отфильтрованы по низким частотам на 100 кГц (черные кривые; сплошная линия в распределении справа) и 1 кГц (белым цветом, пунктирная линия в распределении). б – Спектральные мощности шума ионного тока укНТ разной длины: черным цветом обозначен спектр для НТ длиной 70 нм, серым цветом – 300 нм.

личии ширины их гистограмм (обозначенных сплошной линией на рис. 3а). Стандартное отклонение тока составляет 33 и 42 пА для укНТ длиной 300 и 70 нм соответственно. Однако разница в величине шума сигналов становится более очевидной при их фильтрации на частоте 1 кГц (белые кривые на рис. 3а). Из сравнения токов, измеренных при разных значениях сопротивления просвета укНТ, видно, что фильтрация на частоте 1 кГц на порядок эффективнее понижает флуктуации сигнала при более высоком сопротивлении. Действительно, после фильтрации стандартное отклонение тока на частоте 1 кГц уменьшается до 1 и 11 пА для укНТ длиной 300 и 70 нм со-

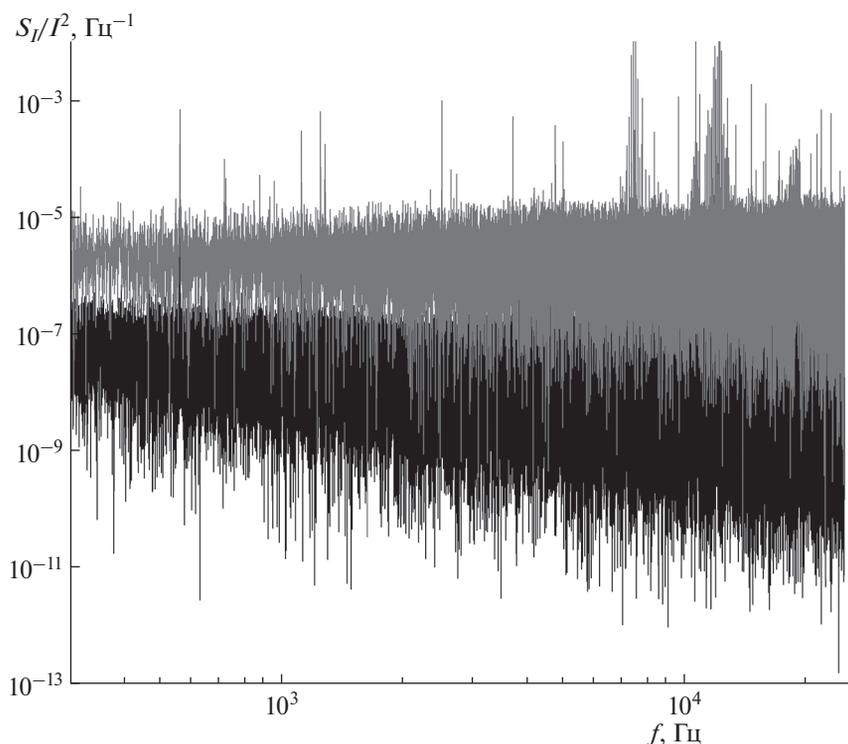


Рис. 4. Спектральная плотность мощности шума тока в НТ при разных концентрациях электролита: серым цветом обозначен спектр с концентрацией KCl 0.1 М, черным цветом – 1 М.

ответственно. Можно заключить, что увеличение флуктуаций тока нанопоры с уменьшением длины канала обусловлены, в первую очередь, усилением низкочастотных шумов, что также видно из анализа спектральных мощностей тока S_I , показанных на рис. 3б, где черная кривая соответствует более короткой уКНТ.

Стоит отметить, что, в отличие от твердотельных нанопор, в спектральную мощность ионного тока уКНТ, измеряемого с помощью стандартно используемого в таких случаях пэтч-кламп-усилителя Axon 200В, на полосе пропускания сигнала 100 кГц вклад вносят только низкочастотный $1/f$ шум и белый шум, в то время как диэлектрический шум, спектральная мощность которого линейно растет с частотой пропорционально электрической емкости в цепи, не вносит заметного вклада в общий шум уКНТ. Мы считаем, что это связано с тем, что емкость в электрической цепи (микропипетка + уКНТ) на порядки ниже емкости нитридкремниевых (SiN) или оксид-кремниевых пленок, обычно используемых для травления в них нанопор [7, 34]. В итоге мощность шума ионного тока, текущего через просвет уКНТ, на полосе пропускания сигнала 100 кГц соответствует самым лучшим показателям, которые удалось совсем недавно достичь в твердотельных нанопорах [14].

Анализ высокочастотных шумов ионного тока в уКНТ. Как указано выше, основными источ-

никами шума ионного тока уКНТ на частотах ниже $f < 300$ Гц является, так называемый “розовый” $1/f$ шум (обозначен белой штриховой линией на рис. 3б), при частотах $f > 1000$ Гц превалирует белый шум. Измеряемая плотность спектральной мощности белого шума S_I/I^2 увеличивается по мере уменьшения проводимости уКНТ как за счет удлинения или уменьшения радиуса ее просвета, так и при понижении концентрации электролита в растворе (рис. 4). Для НТ длиной около 100 нм в больших ионных силах шум в высокочастотном диапазоне приближается фундаментальному белому шуму, спектральная мощность которого определяется тепловым движением (тепловой шум) и флуктуацией количества носителей заряда (дробовой шум) в просвете уКНТ. Согласно формулам Джонсона–Найквиста и Шоттки, тепловой шум $(I_{rms, \text{тепл}})^2 = 4k_B T G_{NT} \Delta f$, а дробовой $(I_{rms, \text{дроб}})^2 = 2q U G_{NT} \Delta f$. Так как источники шумов независимы, то их дисперсии аддитивны, следовательно, среднеквадратичная амплитуда флуктуаций ионного тока в высокочастотном диапазоне I_{rms} может быть рассчитана как:

$$I_{rms} = \sqrt{(4k_B T G_{NT} + 2q U G_{NT}) \Delta f}, \quad (1)$$

где q – элементарный заряд электрона, Δf – полоса пропускания высокочастотного фильтра. На рис. 5 в логарифмической шкале показана экспе-

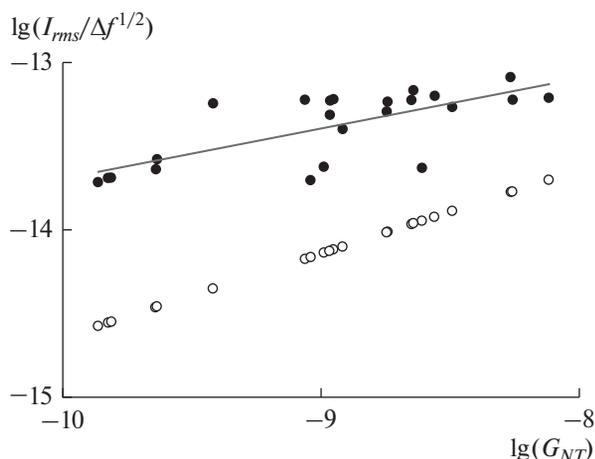


Рис. 5. Зависимость отношения $I_{rms}/\Delta f^{1/2}$ белого шума от проводимости укНТ G_{NT} , представленная в логарифмической шкале: черные точки – экспериментально измеренные величины, белые точки – теоретически предсказанные значения, серая прямая аппроксимация линейной функцией.

риментально измеренная зависимость среднеквадратичной амплитуды флуктуаций ионного тока в высокочастотном диапазоне $f > 1$ кГц от проводимости укНТ (закрашенные круги), которая рассчитывалась по формуле: $I_{rms} = \sqrt{\int_{1 \text{ кГц}}^{50 \text{ кГц}} S_I df}$, и зависимость $I_{rms}(G_{NT})$, предсказываемая уравнением (1), если бы единственным источником белого шума был адмиттанс укНТ (незакрашенные круги). Серая прямая на рис. 5, аппроксимирующая экспериментальные данные линейной функцией, указывает на сближение с теоретическими расчетами при увеличении проводимости укНТ. Очевидно, что при уменьшении проводимости укНТ основной вклад в высокочастотном диапазоне вносят адмиттанс и тепловой шум контура обратной связи, а также шум, генерируемый усилителем [28].

1/f шум укНТ. Согласно феноменологической модели Хуга, мощность шума в низкочастотном диапазоне ($f < 300$ Гц) определяется формулой

$$S_I = \frac{AI^\gamma}{f^\beta}, \quad (2)$$

где A – амплитуда шума, I – среднее значение тока, а показатели степеней β и γ зависят от природы происхождения шумов и в электронных шумах обычно равны 1 и 2 соответственно. Из линейной аппроксимации зависимости плотности спектральной мощности шума S_I/P^2 от частоты в диапазоне 1–300 Гц (см. рис. 3б, белая штриховая линия) следует, что для укНТ значение $\beta = 0.9 \pm 0.1$ близ-

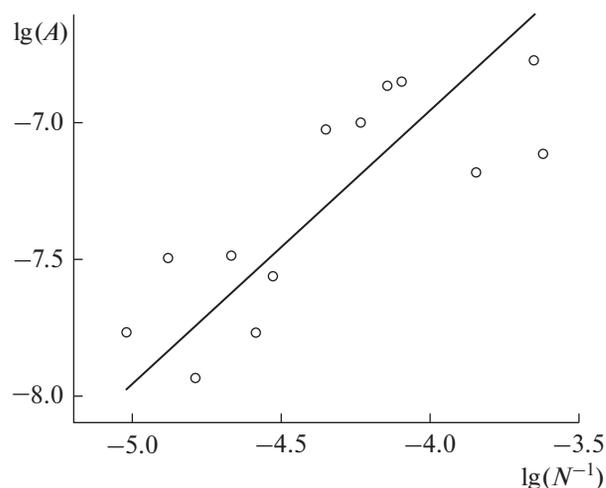


Рис. 6. Зависимость коэффициента шума A от обратного числа носителей заряда N в логарифмической шкале для укНТ разной длины и различной концентрации электролита.

ко к единице. Следовательно, 1/f шум ультракотких НТ – равновесный процесс, в котором флуктуации тока вызваны флуктуациями электрического сопротивления просвета НТ. В таком случае амплитуда шума A связана с количеством

носителей заряда N , $A = \frac{\alpha_H}{N}$, где α_H – коэффициент Хуга, эмпирический параметр, который количественно определяет величину 1/f шума. Мы определили величину A из линейной аппроксимации S_I/P^2 от f . Амплитуда низкочастотного шума НТ могла меняться на два порядка по величине в зависимости от длины НТ и ионной силы раствора. Так как мы использовали электронейтральные липиды, то объемная концентрация ионов внутри укНТ не отличалась от концентрации c в окружающем растворе [35]. Поэтому количество ионов внутри НТ мы определяли из простого выражения: $N = c\pi r^2 L_{NT}$. Прямая на рис. 6 показывает наилучшее линейное приближение полученной зависимости A от N^{-1} , из которого следует,

что коэффициент Хуга $\alpha_H = 2.5 \times 10^{-3}$ для укНТ. Данное значение существенно больше того, что было измерено для нанопор, протравленных в SiN-пленках ($\alpha_H = 10^{-4}$) [28], следовательно, измерения ионного тока в укНТ намного больше подвержены влиянию низкочастотных шумов, чем в твердотельных нанопорах. Это может быть связано с тем, что в каналах радиусом меньше 10 нм может быть существенным или даже доминирующим поверхностный 1/f шум, значение параметра Хуга для которого в некоторых случаях более чем на три порядка превышает объемное значение параметра Хуга [36]. Наблюдаемое в низкочастотном диапазоне усиление флуктуаций ионного тока в

твердотельных нанопорах после их пассивации липидным бислоем [33] подтверждает предположение о том, что процессы, происходящие на поверхности ЛБ в укНТ, являются основным источником $1/f$ шума. Ответственными за высокий поверхностный $1/f$ шум могут быть флуктуации числа носителей заряда на границе раздела пор с электролитом, связанные с адсорбцией/десорбцией ионов на поверхности. Неоднородности на поверхности поры приводят к неоднородности констант реакции сорбции/десорбции и, следовательно, к генерации нескольких бистабильных шумов, имеющих разные Лоренцевские спектры, сумма которых приводит к возникновению характерного $1/f$ -спектра [37, 38]. В случае укНТ источником таких неоднородностей могут быть гидрофобные дефекты на поверхности мембраны [39–42]. Помимо поверхностных эффектов тепловые флуктуации формы эластичной укНТ также могут быть причиной увеличения в $1/f$ шума. Однако несмотря на то, что шумовые характеристики укНТ в низкочастотном диапазоне уступают нанопорам в SiN-пленках, обычно использующимся для детектирования и распознавания одиночных молекул, сенсор, сделанный на основе укНТ, будет обладать рядом уникальных преимуществ. Во-первых, это самый тонкий наноканал, поверхность которого представлена жидкокристаллическим липидным бислоем, соответственно, сохраняется возможность транспортировки вдоль его поверхности веществ, адсорбирующихся из объема [43]. Модификация липидного состава позволяет формировать укНТ с радиусом просвета, подстраиваемым под размер исследуемой молекулы белка за счет увеличения или уменьшения модуля изгиба мембраны [25, 44]. При уменьшении разницы в размерах просвета укНТ и молекулы аналита чувствительность измерения может значительно увеличиться за счет нелинейной зависимости амплитуды сигнала (падения тока) от величины зазора между молекулой и стенками канала. Во-вторых, мембрана укНТ обладает упругостью и, следовательно, может деформироваться при адсорбции на ее поверхность белков снаружи [27]. Существует целый класс белков, адсорбция которых на поверхности липидного бислоя индуцирует в нем спонтанную кривизну, и, если текущая геометрия мембраны не соответствует спонтанной, в липидном бислое возникает изгибный стресс. Адсорбция такого белка на поверхность укНТ приводит к ее локальной деформации — проминанию, что на языке измерения ионного тока, текущего через просвет укНТ, будет восприниматься как частичное перекрытие просвета нанопоры. Таким образом, укНТ может выступать универсальным строительным блоком для изготовления нанофлюидных устройств и нанопоровых сенсоров, которые помимо классической (внутри канала) обладают дополнительной измерительной модой.

Соответствие принципам этики. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Wu Y., Gooding J.J. 2022. The application of single molecule nanopore sensing for quantitative analysis. *Chem. Soc. Rev.* **51**, 3862–3885.
2. Varongchayakul N., Song J., Meller A., Grinstaff M.W. 2018. Single-molecule protein sensing in a nanopore: A tutorial. *Chem. Soc. Rev.* **47**, 8512–8524.
3. Lee K., Park K.B., Kim H.J., Yu J.S., Chae H., Kim H.M., Kim K.B. 2018. Recent progress in solid-state nanopores. *Adv. Mater.* **30**, 1–28.
4. Kasianowicz J.J., Brandin E., Branton D., Deamer D.W. 1996. Characterization of individual polynucleotide molecules using a membrane channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **93**, 13770–13773.
5. Venkatesan B.M., Bashir R. 2011. Nanopore sensors for nucleic acid analysis. *Nat. Nanotechnol.* **6**, 615–624.
6. Jain M., Olsen H.E., Paten B., Akeson M. 2016. The oxford nanopore MinION: Delivery of nanopore sequencing to the genomics community. *Genome Biol.* **17** (1), 239.
7. Ying C., Houghtaling J., Eggenberger O.M., Guha A., Nirmalraj P., Awasthi S., Tian J., Mayer M. 2018. Formation of single nanopores with diameters of 20–50 nm in silicon nitride membranes using laser-assisted controlled breakdown. *ACS Nano.* **12**, 11458–11470.
8. Yusko E.C., Bruhn B.R., Eggenberger O.M., Houghtaling J., Rollings R.C., Walsh N.C., Nandivada S., Pindrus M., Hall A.R., Sept D., Li J., Kalonia D.S., Mayer M. 2017. Real-time shape approximation and fingerprinting of single proteins using a nanopore. *Nat. Nanotechnol.* **12**, 360–367.
9. Houghtaling J., Ying C., Eggenberger O.M., Fennouri A., Nandivada S., Acharjee M., Li J., Hall A.R., Mayer M. 2019. Estimation of shape, volume, and dipole moment of individual proteins freely transiting a synthetic nanopore. *ACS Nano.* **13**, 5231–5242.
10. Su S., Guo X., Fu Y., Xie Y., Wang X., Xue J. 2020. Origin of nonequilibrium $1/f$ noise in solid-state nanopores. *Nanoscale.* **12**, 8975–8981.
11. Kumar A., Park K.B., Kim H.M., Kim K.B. 2013. Noise and its reduction in graphene based nanopore devices. *Nanotechnology.* **24** (49), 495503.
12. Bafna J.A., Soni G.V. 2016. Fabrication of low noise borosilicate glass nanopores for single molecule sensing. *PLoS One.* **11** (6), e0157399.
13. Wen C., Zeng S., Arstila K., Sajavaara T., Zhu Y., Zhang Z., Zhang S.L. 2017. Generalized noise study of solid-state nanopores at low frequencies. *ACS sensors.* **2**, 300–307.
14. Uram J.D., Ke K., Mayer M.L. 2008. Noise and bandwidth of current recordings from submicrometer pores and nanopores. *ACS Nano.* **2**, 857–872.

15. Liang S., Xiang F., Tang Z., Nouri R., He X., Dong M., Guan W. 2020. Noise in nanopore sensors: Sources, models, reduction, and benchmarking. *Nami Jishu yu Jingmi Gongcheng/Nanotechnology Precis. Eng.* **3**, 9–17.
16. Fragasso A., Schmid S., Dekker C. 2020. Comparing current noise in biological and solid-state nanopores. *ACS Nano*. **14**, 1338–1349.
17. Korman C.E., Megens M., Ajo-Franklin C.M., Horsley D.A. 2013. Nanopore-spanning lipid bilayers on silicon nitride membranes that seal and selectively transport ions. *Langmuir*. **29**, 4421–4425.
18. Venkatesan B.M., Polans J., Comer J., Sridhar S., Wendell D., Aksimentiev A., Bashir R. 2011. Lipid bilayer coated Al₂O₃ nanopore sensors: Towards a hybrid biological solid-state nanopore. *Biomed. Microdevices*. **13**, 671–682.
19. Marchand R., Thibault C., Carcenac F., Vieu C., Trévisiol E. 2017. Integration of solid-state nanopores into a functional device designed for electrical and optical cross-monitoring. *Biomed. Microdevices*. **19** (3), 60.
20. Dulka B.N., Bourdon A.K., Clinard C.T., Muvvala M.B.K., Campagna S.R., Cooper M.A. 2017. Metabolomics reveals distinct neurochemical profiles associated with stress resilience. *Neurobiol. Stress*. **7**, 103–112.
21. Yusko E.C., Johnson J.M., Majd S., Prangkio P., Rollings R.C., Li J., Yang J., Mayer M. 2011. Controlling protein translocation through nanopores with bio-inspired fluid walls. *Nat. Nanotechnol.* **6**, 253–260.
22. Zhong-Can O.Y., Helfrich W. 1989. Bending energy of vesicle membranes: General expressions for the first, second, and third variation of the shape energy and applications to spheres and cylinders. *Phys. Rev. A, Gen. Phys.* **39**, 5280–5288.
23. Chia P.Z.C., Gleeson P.A. 2014. Membrane tethering. *F1000Prime Rep.* **6**, 74.
24. Toh W.H., Gleeson P.A. 2016. Emerging insights into the roles of membrane tethers from analysis of whole organisms: The tip of an iceberg. *Front. Cell Dev. Biol.* **4**, 12.
25. Bashkirov P.V., Kuzmin P.I., Lillo J.V., Frolov V.A. 2022. Molecular shape solution for mesoscopic remodeling of cellular membranes. *Annu. Rev. Biophys.* **51**, 473–497.
26. Frolov V.A., Lizunov V.A., Dunina-Barkovskaya A.Y., Samsonov A.V., Zimmerberg J. 2003. Shape bistability of a membrane neck: A toggle switch to control vesicle content release. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **100**, 8698–8703.
27. Bashkirov P.V., Kuzmin P.I., Chekashkina K., Arrasate P., Vera Lillo J., Shnyrova A.V., Frolov V.A. 2020. Reconstitution and real-time quantification of membrane remodeling by single proteins and protein complexes. *Nat. Protoc.* **15**, 2443–2469.
28. Smeets R.M.M., Keyser U.F., Dekker N.H., Dekker C. 2008. Noise in solid-state nanopores. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **105**, 417–421.
29. Mueller P., Rudin D.O. 1967. Action potential phenomena in experimental bi-molecular lipid membranes. *Nature*. **213**, 603–604.
30. Bashkirov P.V., Chekashkina K.V., Shnyrova A.V., Frolov V.A. 2020. Electrophysiological methods for detection of membrane and hemifission by dynamin 1. *Methods Mol. Biol.* **2159**, 141–162.
31. Ivchenkov D.V., Kuzmin P.I., Galimzyanov T.R., Shnyrova A.V., Bashkirov P.V., Frolov V.A. 2021. Nonlinear material and ionic transport through membrane nanopores. *Biochim. Biophys. Acta – Biomembr.* **1863**, 183677.
32. Евсеев А.И., Башкиров П.В. 2008. Деление мембранной нанотрубки, вызванное осмотическим давлением. *Биол. мембраны*. **25**, 227–232.
33. Eggenberger O.M., Leriche G., Koyanagi T., Ying C., Houghtaling J., Schroeder T.B.H., Yang J., Li J., Hall A., Mayer M. 2019. Fluid surface coatings for solid-state nanopores: Comparison of phospholipid bilayers and archaea-inspired lipid monolayers. *Nanotechnology*. **30**, 325504.
34. De Vreede L.J., Ying C., Houghtaling J., Figueiredo Da Silva J., Hall A.R., Lovera A., Mayer M. 2019. Wafer-scale fabrication of fused silica chips for low-noise recording of resistive pulses through nanopores. *Nanotechnology*. **30**, 265301.
35. Vlassioux I., Smirnov S., Siwy Z. 2008. Ionic selectivity of single nanochannels. *Nano Lett.* **8**, 1978–1985.
36. Vandamme L.K.J. 1989. Bulk and surface 1/f noise. *IEEE Trans. Electron Devices*. **36**, 987–992.
37. Zhang D., Solomon P., Zhang S.L., Zhang Z. 2018. An impedance model for the low-frequency noise originating from the dynamic hydrogen ion reactivity at the solid/liquid interface. *Sensors Actuators B Chem.* **254**, 363–369.
38. Kamada M., Laitinen A., Zeng W., Will M., Sarkar J., Tappura K., Seppä H., Hakonen P. 2021. Electrical low-frequency 1/f^γ noise due to surface diffusion of scatterers on an ultra-low-noise graphene platform. *Nano Lett.* **21**, 7637–7643.
39. Krylov N.A., Pentkovsky V.M., Efremov R.G. 2013. Nontrivial behavior of water in the vicinity and inside lipid bilayers as probed by molecular dynamics simulations. *ACS Nano*. **7**, 9428–9442.
40. Vanni S., Hirose H., Barelli H., Antonny B., Gautier R. 2014. A sub-nanometre view of how membrane curvature and composition modulate lipid packing and protein recruitment. *Nat. Commun.* **5**, 4916.
41. Campelo F., Kozlov M.M. 2014. Sensing membrane stresses by protein insertions. *PLoS Comput. Biol.* **10** (4), e1003556.
42. Tripathy M., Thangamani S., Srivastava A. 2020. Three-dimensional packing defects in lipid membrane as a function of membrane order. *J. Chem. Theory Comput.* **16**, 7800–7816.
43. Чекашкина К.В., Галимзянов Т.Р., Кузьмин П.И., Акимов С.А., Романов С.А., Позмогова Г.Е., Клинов Д.В., Башкиров П.В. 2017. Регистрация молекул ДНК в каналах липидных нанотрубок в условиях малой ионной силы. *Биол. мембраны*. **34**, 261–269.
44. Bashkirov P.V., Chekashkina K.V., Akimov S.A., Kuzmin P.I., Frolov V.A. 2011. Variation of lipid membrane composition caused by strong bending. *Biochem. (Moscow) Suppl. Ser. A Membr. Cell Biol.* **5**, 205–211.

Noise in Ultrashort Elastic Membrane Nanotube

K. A. Ivanova^{1, 2}, P. V. Bashkirov^{1, 3, *}

¹*Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine
of Federal Medical Biological Agency, Moscow, 119435 Russia*

²*Moscow Institute of Physics and Technology, Dolgoprudny, 141701 Russia*

³*Scientific Research Institute for Systems Biology and Medicine, Moscow, 117246 Russia*

*e-mail: pavel.bashkirov@sysbiomed.ru

Fluctuations of the ion current in elastic nanopores are studied in a wide frequency range and a complete description of their noise characteristics is presented. The lumen of ultrashort (<200 nm) lipid nanotubes filled with an electrolyte solution was used as a model of an elastic nanopore. It is shown that at low frequencies ($f < 300$ Hz) the $1/f$ noise type prevails. This low frequency noise was analyzed at different salt concentrations and nanopore geometries and it was found that the $1/f$ noise power is proportional to the reciprocal of the number of charge carriers, which is in good agreement with the empirical Hug relation. Linear approximation showed that the Hug parameter for elastic nanopores is $(2.5 \pm 0.5) \times 10^{-3}$, which turned out to be an order of magnitude higher than for solid analogs. In the high-frequency regime ($f > 1$ kHz), white noise becomes dominant, the power density of which depends linearly on the signal bandwidth and, as the length of the ultrashort NT decreases and the ionic strength increases, it is in good agreement with its representation as the sum of the Johnson–Nyquist thermal noise and the fractional Schottky noise.

Keywords: nanopores, lipid bilayer, membrane nanotube, electrical noise

УДК 577.352

ФОРМИРОВАНИЕ ПОР АМФИПАТИЧЕСКИМИ ПЕПТИДАМИ В ЗАМКНУТЫХ МЕМБРАНАХ

© 2022 г. О. В. Кондрашов^а, П. И. Кузьмин^а, С. А. Акимов^а *^аИнститут физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина РАН, Москва, 119071 Россия

*e-mail: akimov_sergey@mail.ru

Поступила в редакцию 08.04.2022 г.

После доработки 23.05.2022 г.

Принята к публикации 24.05.2022 г.

Многие амфипатические антимикробные пептиды (АМП) убивают бактерии за счет формирования сквозных пор в плазматических мембранах. Ранее высказывались по крайней мере два альтернативных типа гипотез о механизмах порации мембран АМП. Так называемые нелокальные модели предполагают, что АМП при взаимодействии с мембраной модифицируют ее интегральные упругие характеристики, в частности латеральное натяжение, что приводит к уменьшению энергии деформаций в процессе образования чисто липидной поры. Молекулы АМП при этом могут находиться вдали от образующейся поры. В локальных моделях предполагается, что поры формируются в непосредственной близости от одиночных молекул АМП или их агрегатов; при этом пептиды частично или полностью выстилают кромку поры. В обоих типах моделей предполагается, что процесс образования поры проходит через промежуточную структуру, так называемый гидрофобный дефект. В настоящей работе мы рассчитали энергию образования гидрофобного дефекта в мембране с адсорбированными молекулами АМП в предположении о нелокальном механизме порации. Было показано, что АМП действительно понижают энергию гидрофобного дефекта. Однако это понижение энергии оказывается недостаточным, чтобы объяснить наблюдаемое экспериментально среднее время ожидания порации мембран. Таким образом, можно заключить, что амфипатические пептиды образуют поры в мембранах преимущественно по локальному механизму, непосредственно участвуя в формировании кромки поры, хотя нелокальные эффекты взаимодействия АМП с мембраной несколько облегчают порацию мембраны в целом.

Ключевые слова: антимикробный пептид, теория упругости, пора, латеральное натяжение, гидрофобный дефект

DOI: 10.31857/S0233475522050073

ВВЕДЕНИЕ

Амфипатические пептиды рассматриваются в качестве перспективных антимикробных препаратов с чрезвычайно низкой прогнозируемой вероятностью возникновения резистентности. Некоторые виды антимикробных пептидов (АМП) убивают бактерии путем формирования в их мембранах сквозных пор [1–3]. К ним, в частности, относятся многие природные пептиды: мелиттин из пчелиного яда [1, 4], магаинин из яда африканских лягушек *Xenopus laevis* [2, 5], кроталицидин из яда гремучей змеи [1]. Большой положительный электрический заряд молекул таких пептидов (например, +4 у мелиттина, +5 у магаинина, +16 у кроталицидина) обуславливает их избирательное связывание с отрицательно заряженными бактериальными мембранами [1–5]. При связывании с мембраной данные пептиды переходят в α -спиральную конформацию, причем одна боковая сторона спирали гидрофильна, а противо-

положная ей – гидрофобна. Молекула пептида встраивается в липидный монослой на небольшую глубину [6–8], при этом “раздвигая” в стороны полярные головки липидов, что приводит к деформации мембраны [9–11]. Было установлено, что интенсивное формирование пор в мембранах происходит при превышении некоторой пороговой поверхностной концентрации пептидов, причем пороговая поверхностная концентрация на мембране слабо зависит от деталей химической структуры пептидов и составляет приблизительно 1/25–1/100 мольных долей (пептид/липид) [1, 3, 12–14].

В большом количестве работ исследование по рообразующей активности АМП проводится на модельных мембранах, в частности на больших или гигантских однослойных везикулах. Мембрана каждой однослойной везикулы представляет из себя липидный бислой. В суспензии больших однослойных везикул (БОВ) формирование пор

регистрируется по утечке водорастворимого флуоресцентного красителя, предварительно загруженного внутрь БОВ, либо по тушению красителя внутри БОВ водорастворимым тушителем, добавленным снаружи. Измеряется зависимость интегральной флуоресценции от времени при различных объемных концентрациях антимикробного пептида [1]. В экспериментах, проводимых на гигантских однослойных везикулах (ГОВ), регистрируются не интегральные характеристики ансамбля, а изменение свойств одиночных ГОВ. В частности, регистрируется изменение флуоресценции внутреннего пространства ГОВ при воздействии АМП на мембрану [5]. Кроме того, в экспериментах по всасыванию мембраны ГОВ в микропипетку под действием небольшого отрицательного гидростатического давления [15, 16] возможно зарегистрировать увеличение площади мембраны ГОВ вследствие адсорбции АМП, а также момент необратимого разрушения мембраны по полному втягиванию всей ГОВ в микропипетку [2, 3]. Большие и гигантские однослойные везикулы являются замкнутыми мембранами без резервуара, т.е. мембрана каждой везикулы состоит из определенного числа липидных молекул, не изменяющегося в процессе эксперимента. Плазматические мембраны бактерий, по-видимому, с достаточной точностью также могут считаться системами с постоянным числом частиц, и поэтому БОВ и ГОВ являются более адекватными моделями бактериальных мембран при исследованиях антимикробной активности АМП, чем, например, связанные с липидным резервуаром плоские мембраны, формируемые методами Мюллера–Рудина [17], Монтала [18] или их модификациями [19]. Кроме того, плоские липидные бислои, как правило, находятся под значительным латеральным натяжением [20, 21], которое может влиять на процесс образования сквозных пор под действием АМП. В частности, было установлено, что приложенное латеральное натяжение активизирует индуцируемую маганином порацию мембран ГОВ [22].

Молекулярные механизмы формирования пор в мембранах под действием АМП в настоящее время остаются невыясненными. В ряде работ показано, что частично встроенные пептиды могут находиться на поверхности мембраны, так что их продольные оси практически параллельны плоскости мембраны (S-конфигурация), либо пронизывать мембрану насквозь (I-конфигурация); в этом случае между осью α -спирали пептида и плоскостью мембраны имеется значительный угол [7, 12]. Однако переход между S- и I-конфигурациями и его промежуточные состояния в настоящее время детально не изучены. Относительно механизмов образования пор под действием АМП высказывались различные гипотезы, которые условно можно разделить на “локальные” и “нелокальные”. Локаль-

ные гипотезы подразумевают сильное латеральное взаимодействие пептидов, вследствие которого несколько пептидных молекул, собравшись вместе на небольшом участке мембраны, образуют сквозную пору [23], частично или полностью выстилающая ее кромку [10, 24, 25]. Нелокальное действие АМП подразумевает модификацию средних упругих параметров мембраны (модуля изгиба, спонтанной кривизны липидных монослоев, латерального натяжения) таким образом, что энергия деформаций мембраны в процессе формирования сквозной поры значительно снижается. При этом пептидные молекулы могут находиться вдали от образующейся поры и влияют на ее образование опосредованно через изменение интегральных характеристик мембраны [6, 26].

Гипотеза о нелокальном действии АМП наглядно иллюстрируется на примере порации замкнутых мембран БОВ или ГОВ. При добавлении раствора АМП к суспензии БОВ или снаружи от одиночной ГОВ амфипатические молекулы АМП частично встраиваются лишь в наружные монослои везикул. Встраивание твердых пептидных молекул должно приводить к увеличению площади наружных монослоев мембран. Однако между наружным и внутренним монослоем не образуются полости, поэтому увеличение площади наружного монослоя мембраны ГОВ должно сопровождаться увеличением площади также и внутреннего монослоя, т.е. его латеральным растяжением. Величина относительного растяжения внутреннего монослоя может быть несколько уменьшена за счет латерального сжатия липида наружного монослоя. Таким образом, при встраивании АМП, в наружных монослоях мембран БОВ или ГОВ должно возникать латеральное давление, а во внутренних – латеральное натяжение. Латеральное давление и натяжение – интегральные свойства липидных монослоев, одинаковые по всему монослою и не зависящие от расстояния до ближайших встроенных молекул АМП. Используя закон Гука, нетрудно показать, что при встраивании в наружный монослой везикулы пептидов суммарной площадью S_p в равновесии наружный липидный монослой будет сжат на величину $S_p/2$, а внутренний липидный монослой растянут на ту же величину; увеличение площади мембраны везикулы составит $S_p/2$. В ряде работ латеральное натяжение внутренних монослоев мембран БОВ или ГОВ рассматривалось в качестве основной причины образования пор и считалось главным механизмом порообразующей активности АМП [6, 26, 27], однако количественный анализ энергетики формирования сквозной поры в таких условиях, насколько нам известно, не проводился.

По-видимому, первая модель формирования пор в тонкой бесструктурной пленке, к которой приложено латеральное натяжение σ , была разра-

ботана Дерягиным и Гутопом [28]. В этой модели предполагалось, что энергия поры в пленке зависит от избыточной энергии материала пленки на кромке поры по сравнению с его энергией вдали от поры и от работы латерального натяжения в процессе образования поры. Первый вклад пропорционален периметру поры ($2\pi R$ для круглой поры радиуса R), а второй — ее площади (πR^2): $E = 2\pi R\gamma - \pi R^2\sigma$, где γ — так называемое линейное натяжение кромки поры. Первое слагаемое является изменением внутренней энергии системы при образовании поры, а второе слагаемое описывает (отрицательную) работу внешних сил в этом процессе. Энергия имеет максимум при критическом радиусе поры $R^* = \gamma/\sigma$. Поры, радиус которых меньше критического, самопроизвольно закрываются ($dE/dR > 0$ при $R < R^*$); поры закритического радиуса неограниченно растут ($dE/dR < 0$ при $R > R^*$), что приводит к необратимому разрушению пленки. Модель Дерягина—Гутопа описывает образование пор в липидных мембранах лишь приблизительно, качественно, поскольку при типичных величинах критических радиусов пор (порядка единиц нанометров) мембрану нельзя считать ни бесконечно тонкой, ни бесструктурной пленкой. Наличие внутренней структуры мембран приводит к тому, что формально пора нулевого радиуса просвета не является интактным плоским липидным бислоем. Действительно, в плоском горизонтальном бислое продольные оси всех липидных молекул в среднем ориентированы вертикально, т.е. перпендикулярно плоскости бислоя. В поре даже нулевого радиуса часть липидных молекул на кромке ориентирована горизонтально, т.е. лежит в плоскости межмонослойной поверхности (рис. 1). Таким образом, для построения детальной модели формирования поры в плоском липидном бислое необходимо введение некоторого промежуточного состояния между бислоем и порой, в котором ориентация липидных молекул, составляющих кромку, будет непрерывно изменяться от вертикальной (плоский бислой) до горизонтальной (сквозная пора). Уже в самых ранних работах по электрическому пробою липидных мембран, выполненных сотрудниками лаборатории биоэлектродхимии ИЭЛАН под руководством Ю.А. Чизмадзе [29, 30], в качестве такого промежуточного состояния был предложен так называемый гидрофобный дефект. Гидрофобный дефект образуется при радиальном смещении липидных молекул от некоторой оси, перпендикулярной плоскости бислоя, приводящем к формированию заполненного водой цилиндра, пронизывающего мембрану насквозь, боковые стенки которого выстланы гидрофобными цепями липидных молекул. На границе гидрофобного дефекта мембрана деформируется таким образом, что ориентация липидных молекул непрерывно изменяется от вертикальной при малых радиусах дефекта до горизонтальной при

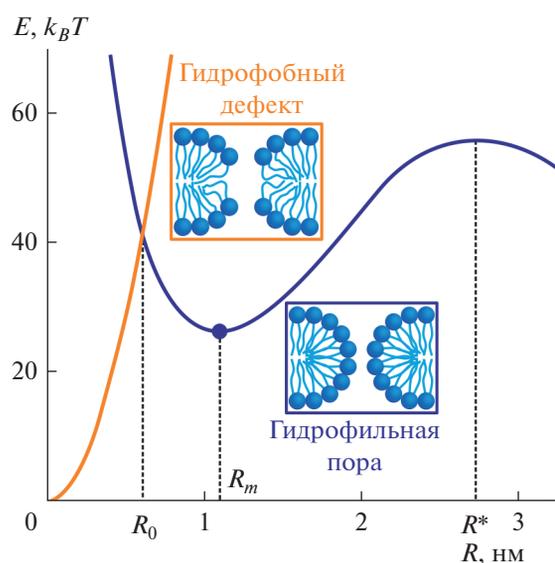


Рис. 1. Качественные зависимости энергии гидрофильной поры (синяя кривая) и гидрофобного дефекта (оранжевая кривая) от радиуса. Кривые пересекаются при радиусе R_0 , соответствующем вершине энергетического барьера перехода гидрофобного дефекта в гидрофильную пору. Энергия поры имеет локальный минимум при $R = R_m$. При превышении критического радиуса поры R^* происходит необратимый разрыв мембраны.

увеличению радиуса дефекта (рис. 1) [31, 32]. В той же серии работ [29–32] было показано, что энергия гидрофильной поры, кромка которой полностью выстлана полярными головками липидов, должна иметь локальный минимум при некотором радиусе R_m , при котором оптимально взаимно компенсируются положительная меридиональная и отрицательная экваториальная кривизны поверхности кромки поры (рис. 1). Таким образом, линейное натяжение кромки поры должно зависеть от ее радиуса, и оно заведомо не является постоянным, как считалось в модели Дерягина—Гутопа. Величина линейного натяжения кромки поры в большой степени определяется энергией деформаций мембраны на кромке, которая, в свою очередь, возрастает при приложении к мембране латерального натяжения [32]. Таким образом, линейное натяжение кромки сквозной поры в липидной мембране зависит как от радиуса поры, так и от латерального натяжения мембраны. Гидрофильная пора оптимального радиуса R_m метастабильна: для уменьшения радиуса и закрытия поры через промежуточное состояние гидрофобного дефекта необходимо преодолеть некоторый энергетический барьер, причем вблизи вершины барьера происходит наиболее резкое изменение ориентации липидных молекул [31, 32]. Вершине барьера соответствует радиус гидрофобного дефекта $R_0 \approx 0.7$ нм (рис. 1), причем R_0 практически не зависит от липидного

состава мембраны (показано в работах [31–33] для диолеилфосфатидилхолина (ДОФХ), пальмитоил-олеилфосфатидилхолина, стеарилолеилфосфатидилхолина, димиристоилфосфатидилхолина) и приложенного трансмембранного электрического потенциала [32] и слабо зависит от латерального натяжения мембраны: при увеличении σ от 0 до 4 мН/м R_0 возрастает лишь приблизительно на 0.2 нм [32].

Для анализа механизма формирования сквозной поры в мембране БОВ или ГОВ, в наружном монослое которой имеется латеральное давление, а во внутреннем – латеральное натяжение, необходимо построить непрерывную траекторию процесса от интактного бислоя до гидрофильной поры и рассчитать энергию промежуточных состояний вдоль этой траектории. Однако, как только образуется гидрофильная пора, поверхность липидного монослоя становится непрерывной, т.е. на экваторе поры смыкаются поверхности наружного и внутреннего монослоев мембраны. При этом из-за разности латеральных натяжений должен начаться поток липида через пору из наружного монослоя во внутренний, который остановится лишь при выравнивании латеральных натяжений в этих монослоях. Таким образом, в мембране с асимметричным распределением латерального натяжения по монослоям гидрофильная пора является существенно неравновесной структурой, которая не описывается методами равновесной термодинамики. В таких мембранах имеет смысл рассматривать лишь гидрофобный дефект в диапазоне радиусов от 0 до $R_0 \approx 0.7$ нм, пока не происходит непрерывного объединения поверхностей наружного и внутреннего монослоев мембраны БОВ или ГОВ.

Количественные данные по адсорбции и порации мембран одиночных ГОВ были получены в работах [2, 3] для магаинина и амфипатического пептида PGLa из яды африканской лягушки *Xenopus laevis*. В них было показано, что при добавлении магаинина или PGLa снаружи от одиночной ГОВ, к которой приложено небольшое латеральное натяжение ~ 0.5 мН/м путем частичного всасывания в микропипетку, площадь везикулы монотонно увеличивается на $\sim 3\%$ в течение приблизительно 1 мин, причем изменение площади и время ее увеличения слабо зависят от объемной концентрации АМП. Затем рост площади мембраны останавливается на некоторое время, и потом площадь вновь возрастает приблизительно на ту же величину ($\sim 3\%$). Далее система либо остается в этом состоянии долгое время, либо происходит разрушение мембраны ГОВ, и она полностью втягивается в микропипетку. Полученные результаты позволяют выявить несколько особенностей взаимодействия АМП с замкнутой мембраной ГОВ. На первом этапе остановка роста площади мембра-

ны после увеличения площади на $\sim 3\%$ и независимость этой величины от объемной концентрации пептида подразумевает, что: 1) пептидные молекулы встраиваются в наружный монослой мембраны ГОВ; именно это встраивание и приводит к росту площади мембраны ГОВ; 2) по-видимому, встраивание является антикооперативным процессом, в том смысле, что встраивание пептидов затрудняет встраивание последующих молекул АМП, поскольку через некоторое время рост площади мембраны ГОВ останавливается. Последующее удвоение роста площади мембраны ГОВ авторы работ [2, 3] интерпретируют как образование небольших пор в мембране и переход через них молекул АМП на внутренний монослой мембраны ГОВ. Таким образом, латеральное давление в наружном монослое и латеральное натяжение – во внутреннем, возникающие при общем увеличении площади мембраны ГОВ на $\sim 3\%$, оказываются недостаточными для интенсивного образования пор, через которые могут проходить встроены в мембрану молекулы АМП. Это же латеральное давление в наружном монослое полностью блокирует встраивание в мембрану молекул АМП из водного раствора.

Ранее были разработаны модели, позволяющие рассчитывать энергию деформаций в мембранах с различной толщиной и спонтанной кривизной монослоев [34, 35]. В настоящей работе мы разработали теоретическую модель, позволяющую рассчитать энергию гидрофобного дефекта в мембране с произвольным распределением латеральных натяжений/давлений по монослоям. Из результатов расчетов следует, что при антисимметричном распределении латерального натяжения (латеральное давление в наружном монослое, равное ему по величине латеральное натяжение во внутреннем монослое) в везикулах, сформированных из ДОФХ, для величин латерального натяжения/давления, при которых в мембранах ГОВ образуются сквозные поры, действительно понижается энергия гидрофобного дефекта. Однако это понижение энергии оказывается недостаточным, чтобы объяснить наблюдаемое экспериментально среднее время ожидания порации мембраны [2, 3]. Таким образом, хотя латеральное натяжение/давление, появляющиеся в мембране как следствие нелокального действия АМП, несколько облегчает образование гидрофобных дефектов, по-видимому, гидрофобные дефекты образуются преимущественно в наиболее деформационно напряженной области мембраны в непосредственной близости от частично встроенных в наружный монослой мембраны амфипатических пептидов. Иными словами, амфипатические пептиды образуют поры в мембранах преимущественно по локальному механизму, непосредственно участвуя в формировании кромки поры, в то время как нелокальные эффекты взаимо-

действия АМП с замкнутой мембраной лишь способствуют порации в непосредственной близости от встроенных молекул АМП. Этот вывод также качественно подтверждается тем, что в плоских бислоях также наблюдаются процессы АМП-стимулированной порации, при этом ввиду наличия липидного резервуара нелокальный эффект изменения натяжения/давления отсутствует.

ПОСТАНОВКА И РЕШЕНИЕ ЗАДАЧИ

Гидрофобный дефект в горизонтальном липидном бислое представляет собой гидрофобный цилиндр радиуса R и высоты L_0 , который сопрягается с деформированным липидным бислоем. Мы фиксировали радиус гидрофобного дефекта и оптимизировали энергию системы, включающую упругий и гидрофобный вклады.

Энергия гидрофобной цилиндрической полости, заполненной водой, согласно теории Марчелли, записывается в следующем виде [31, 32, 36]:

$$W_{hyd} = \sigma_0 (2\pi RL_0) \frac{I_1\left(\frac{R}{\xi_h}\right)}{I_0\left(\frac{R}{\xi_h}\right)}, \quad (1)$$

где $\sigma_0 \approx 50$ мН/м – поверхностное натяжение макроскопической плоской границы раздела вода–масло; $(2\pi RL_0)$ – площадь боковой поверхности гидрофобного цилиндра; $\xi_h \approx 1$ нм – характерная длина гидрофобных взаимодействий; I_1, I_0 – модифицированные функции Бесселя первого и нулевого порядков соответственно.

Для расчета упругой части энергии системы использовался функционал Хамма–Козлова [37], обобщенный для учета дополнительных деформационных мод [38, 39]. Средняя ориентация липидных молекул описывалась векторным полем единичных векторов \mathbf{n} , называемых директорами. Это поле задавалось на так называемой нейтральной поверхности липидного монослоя, проходящей в окрестности сопряжения полярных головок и гидрофобных цепей липидов [40]. Форма нейтральной поверхности описывается векторным полем ее единичных нормалей \mathbf{N} , направленных внутрь мембраны. Все деформации считались малыми, и энергия вычислялась во втором порядке по ним. Упругая энергия липидного монослоя рассчитывалась с учетом следующих деформаций: 1) поперечный изгиб, характеризующийся дивергенцией директора вдоль нейтральной поверхности; 2) наклон, характеризующийся вектором наклона $\mathbf{t} = \mathbf{n} - \mathbf{N}$; 3) латеральное растяжение, характеризующееся относительным изменением площади элемента нейтральной поверхности α ; 4) латеральное натяжение или давление. В силу вращательной симметрии системы относительно оси цилиндра гидрофобного дефекта, в упругую энергию не дает вклада де-

формация кручения, характеризующаяся $\mathbf{rot}(\mathbf{n})$. Следуя формализму, разработанному в работах [31, 32], мы не учитываем гауссову кривизну нейтральных поверхностей. Введем полярную систему координат $Or\varphi z$, ось Oz которой совпадает с осью цилиндра гидрофобного дефекта; ось Or лежит в плоскости межмонослойной поверхности мембраны. Форму нейтральной поверхности монослоя будем описывать функцией z -координат ее точек, $H(r)$. Форму межмонослойной поверхности будем описывать функцией z -координат ее точек, $M(r)$. Поверхностная плотность упругой энергии липидного монослоя может быть записана в виде:

$$w = \frac{K_c}{2} [\text{div}(\mathbf{n}) + J_0]^2 - \frac{K_c}{2} J_0^2 + \frac{K_t}{2} \mathbf{t}^2 + \frac{K_a}{2} \alpha^2 + \frac{\sigma}{2} [\text{grad}(H)]^2, \quad (2)$$

где K_c, K_t, K_a – модули поперечного изгиба, наклона и латерального растяжения соответственно; J_0 – спонтанная кривизна монослоя; σ – латеральное натяжение ($\sigma > 0$) или давление ($\sigma < 0$). В силу вращательной симметрии относительно оси Oz , все деформации зависят только от координаты r , т.е. система является эффективно одномерной. В этом случае все векторные величины в (2) можно заменить их радиальными проекциями. Поверхностная плотность упругой энергии липидного монослоя (2) может быть переписана как:

$$w = \frac{K_c}{2} \left[n' + \frac{n}{r} + J_0 \right]^2 - \frac{K_c}{2} J_0^2 + \frac{K_t}{2} (n - H')^2 + \frac{K_a}{2} \alpha^2 + \frac{\sigma}{2} (H')^2, \quad (3)$$

где n – проекция директора на ось Or ; штрих обозначает производную по координате r , и учтено, что с требуемой точностью радиальная проекция единичной нормали равна H' .

Ниже величины, относящиеся к верхнему монослою, будем снабжать индексом “ u ”, к нижнему монослою – индексом “ l ”. С высокой точностью липидный монослой может считаться локально объемно несжимаемым, поскольку модуль объемного сжатия липидов чрезвычайно велик и составляет $\sim 10^{10}$ Дж/м³ [41]. Условия локальной объемной несжимаемости для верхнего и нижнего монослоев записываются в виде:

$$\begin{aligned} H_u - M &= h - \frac{h^2}{2} \left(n'_u + \frac{n_u}{r} \right) - h\alpha_u, \\ M - H_l &= h - \frac{h^2}{2} \left(n'_l + \frac{n_l}{r} \right) - h\alpha_l, \end{aligned} \quad (4)$$

где h – толщина гидрофобной части липидного монослоя, ниже для простоты называемая просто толщиной монослоя. Из этих условий возможно выра-

зитель относительное изменение площади нейтральной поверхности верхнего и нижнего монослоев:

$$\begin{aligned}\alpha_u &= \frac{1}{h}(M - H_u) + 1 - \frac{h}{2}\left(n_u' + \frac{n_u}{r}\right), \\ \alpha_l &= \frac{1}{h}(H_l - M) + 1 - \frac{h}{2}\left(n_l' + \frac{n_l}{r}\right).\end{aligned}\quad (5)$$

Таким образом, полная упругая энергия мембраны может быть записана в виде:

$$\begin{aligned}W_{el} &= \int dS_u \left\{ \frac{K_c}{2} \left[n_u' + \frac{n_u}{r} + J_0 \right]^2 - \frac{K_c}{2} J_0^2 + \frac{K_l}{2} (n_u - H_u')^2 + \right. \\ &+ \left. \frac{K_a}{2} \left(\frac{1}{h}(M - H_u) + 1 - \frac{h}{2} \left(n_u' + \frac{n_u}{r} \right) \right)^2 + \frac{\sigma_u}{2} (H_u')^2 \right\} + \\ &+ \int dS_l \left\{ \frac{K_c}{2} \left[n_l' + \frac{n_l}{r} + J_0 \right]^2 - \frac{K_c}{2} J_0^2 + \frac{K_l}{2} (n_l + H_l')^2 + \right. \\ &+ \left. \frac{K_a}{2} \left(\frac{1}{h}(H_l - M) + 1 - \frac{h}{2} \left(n_l' + \frac{n_l}{r} \right) \right)^2 + \frac{\sigma_l}{2} (H_l')^2 \right\} - \\ &- \pi R^2 (\sigma_u + \sigma_l),\end{aligned}\quad (6)$$

где интегрирование ведется по нейтральной поверхности соответствующего монослоя; последнее слагаемое учитывает работу внешних сил (латерального натяжения/давления) в процессе изменения радиуса гидрофобного дефекта от нуля до R . Вариация этого функционала по функциям $n_u(r)$, $n_l(r)$, $H_u(r)$, $H_l(r)$, $M(r)$ приводит к пяти уравнениям Эйлера–Лагранжа:

$$\begin{cases} \left(l^2 + \frac{A}{4} h^2 \right) \left(n_u'' + \frac{n_u'}{r} \right) - \left(r^2 + l^2 + \frac{A}{4} h^2 \right) \frac{n_u}{r^2} + \\ + \left(1 + \frac{A}{2} \right) H_u' - \frac{A}{2} M' = 0, \\ \left(l^2 + \frac{A}{4} h^2 \right) \left(n_l'' + \frac{n_l'}{r} \right) - \left(r^2 + l^2 + \frac{A}{4} h^2 \right) \frac{n_l}{r^2} - \\ - \left(1 + \frac{A}{2} \right) H_l' + \frac{A}{2} M' = 0, \\ \left(1 + \frac{A}{2} \right) \left(n_u' + \frac{n_u}{r} \right) - (2s_u + 1) \left(H_u'' + \frac{H_u'}{r} \right) + \\ + \frac{A}{h^2} (H_u - M - h) = 0, \\ \left(1 + \frac{A}{2} \right) \left(n_l' + \frac{n_l}{r} \right) + (2s_l + 1) \left(H_l'' + \frac{H_l'}{r} \right) + \\ - \frac{A}{h^2} (H_l - M + h) = 0, \\ n_u' + \frac{n_u}{r} - n_l' - \frac{n_l}{r} + \frac{2}{h^2} (H_u + H_l - 2M) = 0, \end{cases}\quad (7)$$

где $l^2 = K_c/K_l$, $A = K_a/K_l$, $s_u = \sigma_u/K_l$, $s_l = \sigma_l/K_l$. Все уравнения системы (7) – линейные однородные дифференциальные уравнения с переменными коэффициентами. Из последнего уравнения системы (7) можно выразить $M(r)$ через $n_u(r)$, $n_l(r)$, $H_u(r)$ и $H_l(r)$ и подставить в остальные уравнения. Далее, получающиеся четыре уравнения стандартными преобразованиями могут быть сведены к одному линейному уравнению с переменными коэффициентами восьмого порядка на функцию $d(r) = (n_u(r) + n_l(r))/2$. После подстановки в это уравнение частного решения в виде $d_0(r) = C_1 J_1(\lambda r) + C_2 Y_1(\lambda r)$ (где C_1, C_2 – некоторые постоянные коэффициенты; J_1, Y_1 – соответствующие функции Бесселя первого порядка; λ – обратная характерная длина деформаций) получается характеристическое уравнение относительно λ вида:

$$\lambda^2 (a_6 \lambda^6 + a_4 \lambda^4 + a_2 \lambda^2 + a_0) = 0, \quad (8)$$

где a_0, a_2, a_4, a_6 – постоянные коэффициенты, зависящие от упругих параметров мембраны:

$$\begin{aligned}a_6 &= h^2 l^2 (2s_l + 1)(2s_u + 1)(Ah^2 + 4l^2), \\ a_4 &= h^2 (s_l + s_u + 4s_l s_u)(Ah^2 + 8l^2) + \\ &+ 4l^2 A (l^2 - h^2)(s_l + s_u + 1), \\ a_2 &= Al^2 + 4h^2 s_l s_u + A(2l^2 - h^2)(s_l + s_u), \\ a_0 &= 4A(s_l + s_u).\end{aligned}\quad (9)$$

Характеристическое уравнение (8) относительно λ^2 имеет три нетривиальных корня p_1, p_2, p_3 , два из которых комплексно сопряженные, а один – действительный и отрицательный при типичных величинах упругих параметров мембраны, приведенных ниже в разделе “Результаты и обсуждение”. Корни находятся аналитически, однако они очень громоздкие, и здесь не приводятся. Для функции $d(r)$ получается общее решение в следующем виде:

$$\begin{aligned}d(r) &= \frac{c_1}{r} + c_2 J_1(\sqrt{p_1} r) + c_3 J_1(\sqrt{p_2} r) + c_4 J_1(\sqrt{p_3} r) + \\ &+ c_5 Y_1(\sqrt{p_1} r) + c_6 Y_1(\sqrt{p_2} r) + c_7 Y_1(\sqrt{p_3} r),\end{aligned}\quad (10)$$

где c_1, \dots, c_7 – постоянные комплексные коэффициенты, которые необходимо определить из граничных условий. Семь комплексных коэффициентов эквивалентны четырнадцати действительным; однако условие вещественности $d(r)$ при любом вещественном r сокращает число независимых действительных коэффициентов до семи. Далее аналитически возможно найти решения для функций $n_u(r)$, $n_l(r)$, $H_u(r)$, $H_l(r)$, $M(r)$; после их подстановки и интегрирования в (6) также аналитически находится упругая часть энергии мембраны, однако получающиеся выражения чрезвычайно громоздки и поэтому здесь не приводятся.

В качестве граничных условий требовалась ограниченность деформаций. Кроме того, вдали от гидрофобного дефекта мембрана не деформирована, поэтому налагались следующие условия: $n_u(\infty) = 0$, $n_l(\infty) = 0$, $H_u(\infty) = h$, $H_l(\infty) = -h$, $M(\infty) = 0$. На границе гидрофобного цилиндра, т.е. при $r = R$, ставились условия:

$$\begin{aligned} H_u(R) - H_l(R) &= L_u + L_l, \\ n_u(R) &= \frac{h - L_u}{\sqrt{L_u^2 + (h - L_u)^2}}, \\ n_l(R) &= \frac{h - L_l}{\sqrt{L_l^2 + (h - L_l)^2}}, \end{aligned} \quad (11)$$

где L_u, L_l – части гидрофобного цилиндра, расположенные в верхнем и нижнем монослоях соответственно. Указанные граничные условия позволяют выразить все неизвестные коэффициенты через L_u и L_l . По этим параметрам затем была проведена численная минимизация полной энергии гидрофобного дефекта $W = W_{hyd} + W_{el}$ при различных фиксированных значениях радиуса дефекта R , что позволило найти зависимость $W(R)$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для получения количественных результатов и их графической иллюстрации использовались величины упругих параметров мембраны, характерные для ДОФХ (в расчете на один монослой): модуль изгиба $K_c = 10 k_B T (k_B T \approx 4.14 \times 10^{-21} \text{ Дж})$ [16]; модуль наклона $K_t = 40 \text{ мН/м} \approx 10 k_B T/\text{нм}^2$ [37]; модуль латерального растяжения $K_a = 133 \text{ мН/м} \approx 32 k_B T/\text{нм}^2$ [16]; спонтанная кривизна $J_0 = -0.091 \text{ нм}^{-1}$ [42]; толщина гидрофобной части монослоя $h = 1.45 \text{ нм}$ [31]. При вычислении энергии гидрофобного цилиндра согласно выражению (1) считалось, что $\sigma_0 = 50 \text{ мН/м} \approx 12.5 k_B T/\text{нм}^2$; $\xi_h = 1 \text{ нм}$ [31, 32].

В работах [2, 3] было показано, что встраивание в наружный монослой мембраны ГОВ маггаина и PGLa из водного раствора прекращается, когда относительное увеличение площади мембраны достигает $\delta = 3\%$; после этого в мембране через некоторое время образуются поры, через которые адсорбированные молекулы АМП переходят на внутренний монослой мембраны. ГОВ формировались из смеси 60 : 40 ДОФХ : диолеилфосфатидилглицерина. Предполагая, что модуль латерального растяжения монослоя такой мембраны приблизительно совпадает с модулем латерального растяжения монослоя ДОФХ, получим, что при увеличении площади мембраны ГОВ на 3% во внутреннем монослое возникает латеральное натяжение $\sigma_l = K_a \delta = 133 \times 0.030 = 4.0 \text{ мН/м} \approx 1.0 k_B T/\text{нм}^2$; в наружном монослое при этом возникает равное по абсолютной величине латераль-

ное давление $\sigma_u = -4.0 \text{ мН/м} \approx -1.0 k_B T/\text{нм}^2$. Однако функционал упругой энергии (6) стабилен (является положительно определенной квадратичной формой малых деформаций) лишь при условии $\sigma_u + \sigma_l \geq 0$. Поэтому при расчетах мы полагали, что мембрана в целом находится под небольшим эффективным латеральным натяжением $2\sigma_e = 0.02 \text{ мН/м}$ (т.е. $\sigma_u + \sigma_l = 2\sigma_e = 0.02 \text{ мН/м}$); от конкретной величины этого эффективного латерального натяжения результаты расчетов практически не зависят.

На рис. 2а показана рассчитанная форма мембраны с гидрофобным дефектом радиуса $R = 0.7 \text{ нм}$ для случаев одинакового небольшого латерального натяжения $\sigma_u = \sigma_l = \sigma_e = 0.01 \text{ мН/м}$ в наружном и внутреннем монослоях (вверху), а также большого латерального давления в наружном монослое и большого латерального натяжения во внутреннем монослое мембраны, $\sigma_u = \sigma_e - 4 \text{ мН/м}$, $\sigma_l = \sigma_e + 4 \text{ мН/м}$ (внизу). Из рис. 2а видно, что при одинаковом латеральном натяжении монослоев $\sigma_u = \sigma_l = \sigma_e = 0.01 \text{ мН/м}$ форма мембраны зеркально симметрична относительно плоской межмонослойной поверхности (показана штриховой линией на рис. 2а); равновесная длина гидрофобного цилиндра составляет $L = L_u + L_l = 2.2 \text{ нм}$. При $\sigma_u = \sigma_e - 4 \text{ мН/м}$, $\sigma_l = \sigma_e + 4 \text{ мН/м}$ мембрана выгибается внутрь ГОВ, в сторону внутреннего монослоя, к которому приложено латеральное натяжение. Равновесная длина гидрофобного цилиндра при этом составляет $L = L_u + L_l = 2.0 \text{ нм}$, т.е. уменьшается приблизительно на 10% по сравнению со случаем одинакового латерального натяжения в монослоях. Зависимость энергии гидрофобного дефекта от радиуса приведена на рис. 2б для случаев $\sigma_u = \sigma_l = \sigma_e$ (пунктирная красная кривая) и $\sigma_u = \sigma_e - 4 \text{ мН/м}$, $\sigma_l = \sigma_e + 4 \text{ мН/м}$ (сплошная зеленая кривая). Из графика видно, что кривые различаются слабо. На вставке показана разность зависимостей энергии гидрофобного дефекта от радиуса для случаев $\sigma_u = \sigma_l = \sigma_e$ и $\sigma_u = \sigma_e - 4 \text{ мН/м}$, $\sigma_l = \sigma_e + 4 \text{ мН/м}$; разность не превышает $0.9 k_B T$ при $R = 0.7 \text{ нм}$. При этом абсолютная величина энергии гидрофобного дефекта при $R = 0.7 \text{ нм}$ в случае $\sigma_u = \sigma_l = \sigma_e$ составляет $33.7 k_B T$. В мембране из ДОФХ без приложенного латерального натяжения поры самопроизвольно не образуются, т.е. энергетический барьер в $33.7 k_B T$ не может быть преодолен за типичное время эксперимента (например, порядка десятков минут) за счет энергии тепловых флуктуаций мембраны. Кинетика образования пор в мембране описывается уравнением, по форме аналогичным уравнению диффузии в потенциале $E(R)$ [43]. В условиях, когда высота энергетического барьера образования поры ΔE намного превышает $1 k_B T$ ($\Delta E \gg 1 k_B T$), что завсегда выполняется в нашей системе, диффузия

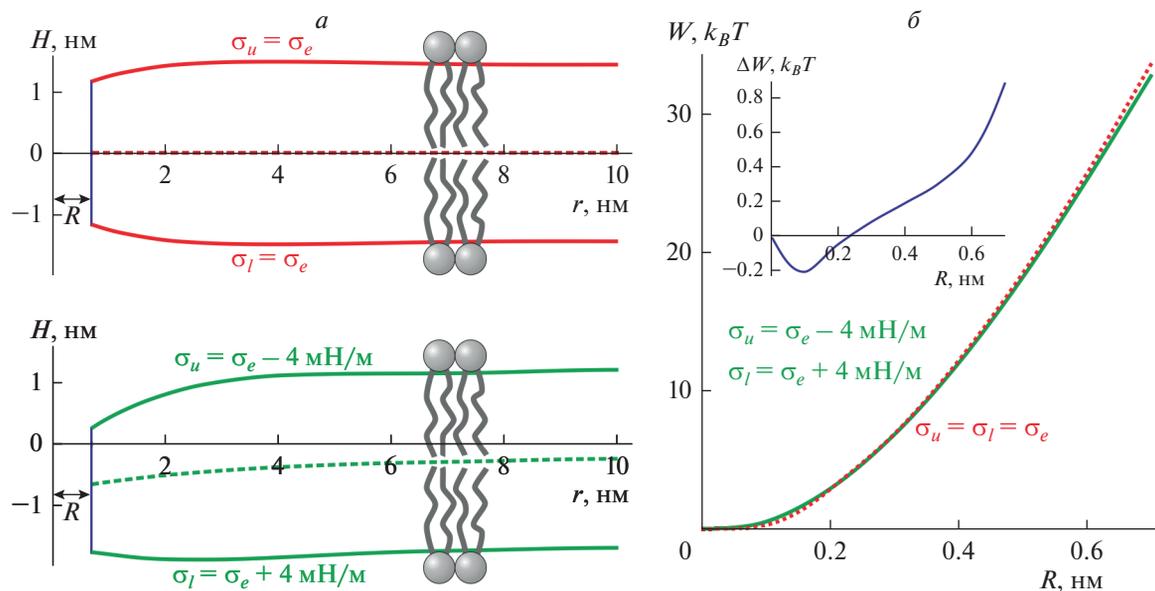


Рис. 2. *a* – Форма мембраны вблизи гидрофобного дефекта радиуса $R = 0.7$ нм, рассчитанная для случаев одинакового малого латерального натяжения наружного и внутреннего монослоев, $\sigma_u = \sigma_l = \sigma_e = 0.01$ мН/м (вверху), а также большого латерального давления в наружном монослое и большого латерального натяжения во внутреннем монослое мембраны, $\sigma_u = \sigma_e - 4$ мН/м, $\sigma_l = \sigma_e + 4$ мН/м (внизу). *б* – Зависимость энергии гидрофобного дефекта от его радиуса в мембранах с одинаковым малым латеральным натяжением наружного и внутреннего монослоев, $\sigma_u = \sigma_l = \sigma_e = 0.01$ мН/м (пунктирная красная кривая), а также с большим латеральным давлением в наружном монослое и большим латеральным натяжением во внутреннем монослое, $\sigma_u = \sigma_e - 4$ мН/м, $\sigma_l = \sigma_e + 4$ мН/м (сплошная зеленая кривая). На вставке показана разность зависимостей энергии гидрофобного дефекта от его радиуса для случаев $\sigma_u = \sigma_l = \sigma_e = 0.01$ мН/м и $\sigma_u = \sigma_e - 4$ мН/м, $\sigma_l = \sigma_e + 4$ мН/м.

мембранных дефектов в пространстве радиусов может считаться стационарной. В приближении стационарной диффузии среднее время ожидания порации (или первого перехода мембранного дефекта через энергетический барьер, т.е. превышения критического радиуса) находится аналитически и имеет аррениусовский вид: $\tau = \frac{1}{\nu} e^{\frac{\Delta E}{k_B T}}$, где ν – характерная частота возникновения дефектов [43]. Данная кинетическая теория была разработана для описания экспериментов по электрическому пробою мембран сотрудниками лаборатории биоэлектрохимии ИЭЛАН под руководством Ю.А. Чизмадзева [43]. Таким образом, понижение энергетического барьера на $0.9 k_B T$ при приложении латерального натяжения и давления $\sigma_u = \sigma_e - 4$ мН/м, $\sigma_l = \sigma_e + 4$ мН/м должно сокращать среднее время ожидания перехода системы через энергетический барьер в $e^{0.9} \approx 2.5$ раза. При этом в работах [2, 3] интенсивное образование пор, сопровождающееся переходом пептидных молекул на внутренний монослой ГОВ, начиналось в пределах нескольких минут после достижения латерального натяжения/давления $\sigma_l = -\sigma_u = 4$ мН/м. Таким образом, нелокальная модель формирования пор АМП противоречит результатам экспериментов работ [2, 3].

На рис. 3 показана зависимость энергии гидрофобного дефекта радиуса $R = 0.7$ нм от величины латерального давления, приложенного к наружному монослою замкнутой мембраны и равного ему по абсолютной величине латерального натяжения, приложенного к внутреннему монослою. Из графика видно, что при $|\sigma_u|, |\sigma_l| > 4$ мН/м энергия дефекта резко падает: при $\sigma_u = \sigma_e - 4.5$ мН/м, $\sigma_l = \sigma_e + 4.5$ мН/м понижение энергии дефекта составляет $\sim 1.7 k_B T$, а при $\sigma_u = \sigma_e - 5$ мН/м, $\sigma_l = \sigma_e + 5$ мН/м – приблизительно $4 k_B T$ по сравнению со случаем $\sigma_u = \sigma_l = \sigma_e$. При этом в нашей оценке латерального натяжения/давления, возникающего при адсорбции PGLa на наружный монослой мембраны ГОВ ($\sigma_l = -\sigma_u = K_a \delta$), используются относительное увеличение площади мембраны δ и модуль латерального растяжения K_a . Обе эти величины экспериментально определяются с погрешностью $\pm 7\%$: $\delta = 0.029 \pm 0.002$ [3], $2K_a = 265 \pm 18$ мН/м [16]. С учетом этой погрешности величина латерального натяжения/давления, возникающего при адсорбции АМП, в принципе, может попасть на быстро падающий участок кривой $W(R = 0.7$ нм) (рис. 3), что обеспечит наблюдаемое экспериментально среднее время ожидания порации мембран ГОВ [2, 3], хотя достижение такой величины латерального натяже-

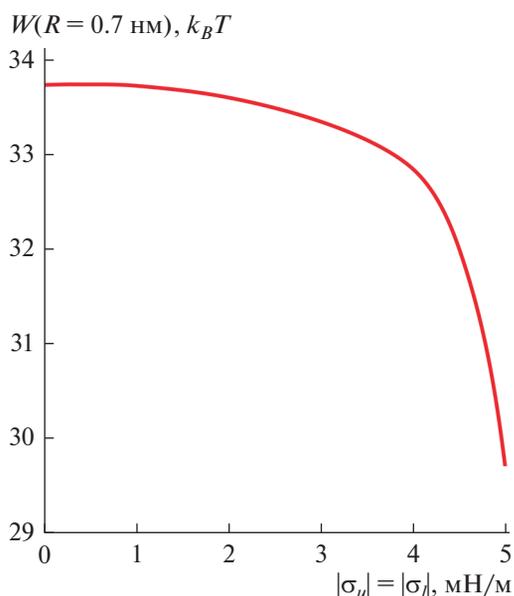


Рис. 3. Зависимость энергии гидрофобного дефекта радиуса $R = 0.7$ нм от величины латерального давления наружного монослоя замкнутой мембраны и равного ему по абсолютной величине латерального натяжения внутреннего монослоя.

ния/давления и крайне маловероятно. В среднем, понижение энергии гидрофобного дефекта вследствие изменения интегральных характеристик замкнутой мембраны при ее взаимодействии с АМП (т.е. латерального натяжения/давления) оказывается значительно меньшим, чем необходимо для количественного описания экспериментальных данных [2, 3]. Таким образом, можно заключить, что АМП лишь в некоторой степени облегчают образование пор по нелокальному механизму, т.е. повсеместно во всей мембране. Однако преимущественно поры должны образовываться в соответствии с гипотезой о локальном действии АМП в непосредственной близости от одиночных молекул АМП или их агрегатов, в наиболее деформированных участках мембраны. Нелокальное действие АМП понижает высоту энергетического барьера формирования гидрофобного дефекта во всей мембране, однако вблизи встроенной в наружный монослой мембраны ГОВ молекулы АМП это понижение должно быть еще большим. Таким образом, по-видимому, амфипатические пептиды образуют поры в мембранах преимущественно по локальному механизму, непосредственно участвуя в формировании кромки поры, хотя при этом нелокальные эффекты взаимодействия АМП с замкнутой мембраной несколько облегчают порацию мембраны в целом. В рамках модели Дерягина–Гутопа [28] высота энергетического барьера образования поры (энергия $E = 2\pi R\gamma - \pi R^2\sigma$ при $R = R^* = \gamma/\sigma$) равна $\Delta E = \pi\gamma^2/\sigma$. Она может

быть понижена либо за счет повышения латерального натяжения, либо за счет уменьшения линейного натяжения кромки поры. Нелокальное действие АМП приводит к изменению латерального натяжения, в то время как линейное натяжение может изменяться только по локальному механизму действия АМП. Результаты нашей работы показывают, что изменение латерального натяжения при встраивании молекул АМП в один из монослоев замкнутой мембраны оказывается недостаточным для эффективного образования пор, и необходимо непосредственно понижать линейное натяжение кромки поры.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Источники финансирования. Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 22-24-00834).

Соответствие принципам этики. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Pérez-Peinado C., Dias S.A., Domingues M.M., Benfield A.H., Freire J.M., Rádis-Baptista G., Gaspar D., Castanho M.A.R.B., Craik D.J., Henriques S.T., Veiga A.S., Andreu D. 2018. Mechanisms of bacterial membrane permeabilization by crotalidicin (Ctn) and its fragment Ctn (15–34), antimicrobial peptides from rattlesnake venom. *J. Biol. Chem.* **293**, 1536–1549.
2. Hasan M., Karal M.A.S., Levadnyy V., Yamazaki M. 2018. Mechanism of initial stage of pore formation induced by antimicrobial peptide magainin 2. *Langmuir* **34**, 3349–3362.
3. Parvez F., Alam J.M., Dohra H., Yamazaki M. 2018. Elementary processes of antimicrobial peptide PGLa-induced pore formation in lipid bilayers. *Biochim. Biophys. Acta.* **1860**, 2262–2271.
4. Park S.C., Kim J.Y., Shin S.O., Jeong C.Y., Kim M.H., Shin S.Y., Cheong G.-W., Park Y., Hahm K.S. 2006. Investigation of toroidal pore and oligomerization by melittin using transmission electron microscopy. *Biochim. Biophys. Res. Comm.* **343**, 222–228.
5. Tamba Y., Ariyama H., Levadny V., Yamazaki M. 2010. Kinetic pathway of antimicrobial peptide magainin 2-induced pore formation in lipid membranes. *J. Phys. Chem. B.* **114**, 12018–12026.
6. Huang H.W. 2006. Molecular mechanism of antimicrobial peptides: The origin of cooperativity. *Biochim. Biophys. Acta.* **1758**, 1292–1302.
7. Pan J., Tieleman D.P., Nagle J.F., Kučerka N., Tristram-Nagle S. 2009. Alamethicin in lipid bilayers: Combined use of X-ray scattering and MD simulations. *Biochim. Biophys. Acta.* **1788**, 1387–1397.

8. Chen F.Y., Lee M.T., Huang H.W. 2003. Evidence for membrane thinning effect as the mechanism for peptide-induced pore formation. *Biophys. J.* **84**, 3751–3758.
9. Zemel A., Ben-Shaul A., May S. 2005. Perturbation of a lipid membrane by amphipathic peptides and its role in pore formation. *Eur. Biophys. J.* **34**, 230–242.
10. Santo K.P., Berkowitz M.L. 2012. Difference between magainin-2 and melittin assemblies in phosphatidylcholine bilayers: results from coarse-grained simulations. *J. Phys. Chem. B.* **116**, 3021–3030.
11. Campelo F., McMahon H.T., Kozlov M.M. 2008. The hydrophobic insertion mechanism of membrane curvature generation by proteins. *Biophys. J.* **95**, 2325–2339.
12. Huang H.W. 2000. Action of antimicrobial peptides: Two-state model. *Biochemistry.* **39**, 8347–8352.
13. Huang H.W., Chen F.Y., Lee M.T. 2004. Molecular mechanism of peptide-induced pores in membranes. *Phys. Rev. Lett.* **92**, 198304.
14. Manzini M.C., Perez K.R., Riske K.A., Bozelli Jr.J.C., Santos T.L., da Silva M.A., Saraiva G.K.V., Politi M.J., Valente A.P., Almeida F.C.L., Chaimovich H., Rodrigues M.A., Bemquerer M.P., Schreier S., Cuccovia I.M. 2014. Peptide: Lipid ratio and membrane surface charge determine the mechanism of action of the antimicrobial peptide BP100. Conformational and functional studies. *Biochim. Biophys. Acta.* **1838**, 1985–1999.
15. Evans E., Rawicz W. 1990. Entropy-driven tension and bending elasticity in condensed-fluid membranes. *Phys. Rev. Lett.* **64**, 2094.
16. Rawicz W., Olbrich K.C., McIntosh T., Needham D., Evans E. 2000. Effect of chain length and unsaturation on elasticity of lipid bilayers. *Biophys. J.* **79**, 328–339.
17. Mueller P., Rudin D.O., Tien H.T., Wescott W.C. 1963. Methods for the formation of single bimolecular lipid membranes in aqueous solution. *J. Phys. Chem.* **67**, 534–535.
18. Montal M., Mueller P. 1972. Formation of bimolecular membranes from lipid monolayers and a study of their electrical properties. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **69**, 3561–3566.
19. Saitov A., Akimov S.A., Galimzyanov T.R., Glasnov T., Pohl P. 2020. Ordered lipid domains assemble via concerted recruitment of constituents from both membrane leaflets. *Phys. Rev. Lett.* **124**, 108102.
20. Bashkurov P.V., Kuzmin P.I., Chekashkina K., Arrasate P., Vera Lillo J., Shnyrova A.V., Frolov V.A. 2020. Reconstitution and real-time quantification of membrane remodeling by single proteins and protein complexes. *Nat. Protocols.* **15**, 2443–2469.
21. Galimzyanov T.R., Bashkurov P.V., Blank P.S., Zimmerberg J., Batishchev O.V., Akimov S.A. 2020. Monolayerwise application of linear elasticity theory well describes strongly deformed lipid membranes and the effect of solvent. *Soft Matter.* **16**, 1179–1189.
22. Karal M.A.S., Alam J.M., Takahashi T., Levadny V., Yamazaki M. 2015. Stretch-activated pore of the antimicrobial peptide, magainin 2. *Langmuir.* **31**, 3391–3401.
23. Kabelka I., Vácha R. 2015. Optimal conditions for opening of membrane pore by amphiphilic peptides. *J. Chem. Phys.* **143**, 243115.
24. Qian S., Wang W., Yang L., Huang H.W. 2008. Structure of transmembrane pore induced by Bax-derived peptide: evidence for lipidic pores. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **105**, 17379–17383.
25. Yang L., Harroun T.A., Weiss T.M., Ding L., Huang H.W. 2001. Barrel-stave model or toroidal model? A case study on melittin pores. *Biophys. J.* **81**, 1475–1485.
26. Chen F.Y., Lee M.T., Huang H.W. 2003. Evidence for membrane thinning effect as the mechanism for peptide-induced pore formation. *Biophys. J.* **84**, 3751–3758.
27. Zhdanov V.P. 2014. Interaction of amphipathic α -helical peptides with a lipid membrane: Adsorption and pore formation. *Physica A.* **401**, 45–51.
28. Дерягин Б.В., Гутоп Ю.В. 1962. Теория разрушения (прорыва) свободных пленок. *Коллоидн. журн.* **24**, 431–437.
29. Abidor I.G., Arakelyan V.B., Chernomordik L.V., Chizmadzhev Y.A., Pastushenko V.F., Tarasevich M.P. 1979. Electric breakdown of bilayer lipid membranes: I. The main experimental facts and their qualitative discussion. *J. Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem.* **104**, 37–52.
30. Weaver J.C., Chizmadzhev Y.A. 1996. Theory of electroporation: A review. *Bioelectrochem. Bioenerg.* **41**, 135–160.
31. Akimov S.A., Volynsky P.E., Galimzyanov T.R., Kuzmin P.I., Pavlov K.V., Batishchev O.V. 2017. Pore formation in lipid membrane I: Continuous reversible trajectory from intact bilayer through hydrophobic defect to transversal pore. *Sci. Rep.* **7**, 12152.
32. Akimov S.A., Volynsky P.E., Galimzyanov T.R., Kuzmin P.I., Pavlov K.V., Batishchev O.V. 2017. Pore formation in lipid membrane II: Energy landscape under external stress. *Sci. Rep.* **7**, 12509.
33. Акимов С.А., Александрова В.В., Галимзянов Т.Р., Башкиров П.В., Батищев О.В. 2017. Механизм формирования пор в мембранах из стеарилолеоилфосфатидилхолина под действием латерального натяжения. *Биол. мембраны.* **34**, 270–283.
34. Галимзянов Т.Р., Молотковский Р.Ю., Кузьмин П.И., Акимов С.А. 2011. Стабилизация бислойной структуры рафтов за счет упругих деформаций мембраны. *Биол. мембраны.* **28**, 307–314.
35. Galimzyanov T.R., Molotkovsky R.J., Cohen F.S., Pohl P., Akimov S.A. 2016. “Galimzyanov et al. Reply”. *Phys. Rev. Lett.* **116**, 079802.
36. Marcelja S. 1977. Structural contribution to solute-solute interaction. *Croat. Chem. Acta* **49**, 347–357.
37. Hamm M., Kozlov M.M. 2000. Elastic energy of tilt and bending of fluid membranes. *Eur. Phys. J. E.* **3**, 323–335.
38. Kondrashov O.V., Galimzyanov T.R., Pavlov K.V., Kotova E.A., Antonenko Y.N., Akimov S.A. 2018. Membrane elastic deformations modulate gramicidin A transbilayer dimerization and lateral clustering. *Bio-phys. J.* **115**, 478–493.
39. Kondrashov O.V., Galimzyanov T.R., Jiménez-Mun-
guía I., Batishchev O.V., Akimov S.A. 2019. Mem-
brane-mediated interaction of amphipathic peptides can be described by a one-dimensional approach. *Phys. Rev. E.* **99**, 022401.

40. Leikin S., Kozlov M.M., Fuller N.L., Rand R.P. 1996. Measured effects of diacylglycerol on structural and elastic properties of phospholipid membranes. *Biophys. J.* **71**, 2623–2632.
41. Nagle J.F., Wilkinson D.A. 1978. Lecithin bilayers. Density measurement and molecular interactions. *Biophys. J.* **23**, 159–175.
42. Kollmitzer B., Heftberger P., Rappolt M., Pabst G. 2013. Monolayer spontaneous curvature of raft-forming membrane lipids. *Soft Matter*. **9**, 10877–10884.
43. Pastushenko V.F., Chizmadzhev Y.A., Arakelyan V.B. 1979. Electric breakdown of bilayer lipid membranes: II. Calculation of the membrane lifetime in the steady-state diffusion approximation. *J. Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem.* **104**, 53–62.

Pore Formation by Amphipathic Peptides in Closed Membranes

O. V. Kondrashov¹, P. I. Kuzmin¹, S. A. Akimov¹, *

¹*Frumkin Institute of Physical Chemistry and Electrochemistry,
Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia*

*e-mail: akimov_sergey@mail.ru

Various amphipathic antimicrobial peptides (AMPs) kill bacteria by forming through pores in plasma membranes. Previously, at least two alternative types of hypotheses about the mechanisms of AMP membrane poration were put forward. The so-called “non-local” models suggest that AMPs, when interacting with a membrane, modify its integral elastic characteristics, in particular, lateral tension, which leads to a decrease in the deformation energy during pore formation. In this case, AMP molecules can be located far from the formed pore. In “local” models, it is assumed that pores are formed in the immediate vicinity of single AMP molecules or their aggregates; while the peptides partially or completely line the edge of the pore. In both types of models, it is assumed that the process of pore formation passes via an intermediate structure, the so-called hydrophobic defect. In this work, we calculated the energy of formation of the hydrophobic defect in the membrane with adsorbed AMP molecules under the assumption of the non-local poration mechanism. It was found that AMPs actually lower the energy of the hydrophobic defect. However, this decrease in energy is insufficient to explain the experimentally observed average waiting time for membrane poration. Thus, it can be concluded that amphipathic peptides form pores in membranes predominantly by the local mechanism, directly participating in the formation of the pore edge, although nonlocal effects of AMP–membrane interaction somewhat facilitate poration of the membrane as a whole.

Keywords: antimicrobial peptide, theory of elasticity, pore, lateral tension, hydrophobic defect

УДК 577.352

ВОЗМОЖНОСТЬ ФОРМИРОВАНИЯ ПОР В ЛИПИДНЫХ МЕМБРАНАХ НЕСКОЛЬКИМИ МОЛЕКУЛАМИ АМФИПАТИЧЕСКИХ ПЕПТИДОВ

© 2022 г. О. В. Кондрашов^а, С. А. Акимов^а, *^аИнститут физической химии и электрохимии
им. А. Н. Фрумкина РАН, Москва, 119071 Россия

*e-mail: akimov_sergey@mail.ru

Поступила в редакцию 04.05.2022 г.

После доработки 02.06.2022 г.

Принята к публикации 03.06.2022 г.

Антимикробная активность некоторых амфипатических пептидов связана с образованием сквозных пор в бактериальных мембранах. Антимикробные пептиды (АМП) специфически связываются с плазматической мембраной, встраивая в наружный липидный монослой свои гидрофобные участки. Мембрана при этом неизбежно деформируется. Многие АМП формируют так называемые тороидальные поры, кромка которых частично выстлана пептидными молекулами. Кромка поры характеризуется значительными деформациями. В настоящей работе мы рассчитали энергию кромки поры, на экваторе которой расположены амфипатические пептиды, а также энергию деформаций, индуцируемых АМП в плоском липидном бислое. Было показано, что при определенных физико-химических и геометрических характеристиках молекулы АМП энергия поры, на экваторе которой расположены две и более пептидные молекулы, может быть ниже, чем энергия деформаций плоского бислоя, индуцированных тем же количеством пептидных молекул. Таким образом, две молекулы АМП, в принципе, могут образовать сквозную пору в мембране, хотя это возможно лишь в достаточно узком диапазоне физико-химических и геометрических характеристик пептидов.

Ключевые слова: антимикробный пептид, теория упругости, пора, линейное натяжение, амфипатический пептид

DOI: 10.31857/S0233475522050085

ВВЕДЕНИЕ

Липидные бислои являются структурной основой плазматических мембран клеток. Липидные молекулы амфифильны, что обуславливает чрезвычайно низкую проницаемость мембран [1] и позволяет мембранам выполнять их основную — барьерную — функцию в клетках. За счет барьерной функции мембран поддерживаются значительные перепады химических и электрических потенциалов, а также концентраций различных веществ, необходимые для нормального функционирования клеток, которые являются открытыми неравновесными системами. Даже кратковременное и локальное нарушение барьерной функции мембран вследствие образования в них сквозных пор, как правило, приводит к гибели клетки, на чем основывается действие перспективных антимикробных препаратов пептидной природы [2–4]. Антимикробные пептиды (АМП) содержат в своем составе как гидрофильные, так и гидрофобные аминокислоты, т.е. являются амфипатическими, и при взаимодействии с мембраной частично встраиваются в нее, погружая внутрь свои гидрофобные участки [2–7]. Встраивание неизбежно сопровож-

дается деформациями мембраны [8–11]. Затем по не вполне понятному механизму в мембране образуется сквозная пора, что приводит к гибели патогенной клетки [2–4, 6, 11, 12]. Интенсивная порация происходит при превышении некоторой пороговой поверхностной концентрации молекул АМП, связанных с мембраной, что может указывать на то, что образование поры требует участия нескольких пептидных молекул [2, 4, 12–14]. Предполагается, что латеральное взаимодействие молекул АМП, необходимое для обеспечения их кооперативного действия в процессе порации, может быть опосредовано упругими деформациями мембраны [10, 15, 16]. Когда деформирующие мембрану частично встроенные в нее пептиды расположены далеко друг от друга, деформации независимы, и их энергия аддитивна. При сближении деформации перекрываются, что приводит к эффективному латеральному взаимодействию пептидов [15–17]. При неглубоком встраивании твердой амфипатической молекулы в липидный монослой полярные головки липидов раздвигаются в разные стороны, и монослой локально становится выпуклым, т.е. его поверхность приобрета-

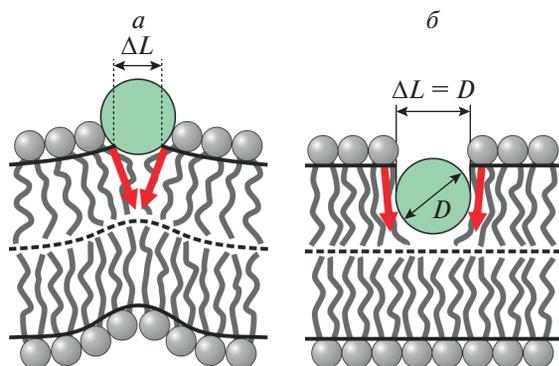


Рис. 1. Деформации мембраны, индуцированные частично встроенным в липидный монослой амфипатическим пептидом. Пептид показан зеленым кругом, граничные директоры — красными стрелками, нейтральные поверхности монослоев — сплошными черными кривыми, межмонослойная поверхность — штриховыми кривыми. *a* — Неглубокое встраивание пептида. Ширина встроенной области ΔL на нейтральной поверхности меньше диаметра пептида D . Индуцируется значительный скачок граничного директора (большой угол между красными стрелками); поверхность мембраны становится выпуклой. *б* — Глубокое встраивание пептида. Ширина встроенной области ΔL на нейтральной поверхности равна диаметру пептида D . Индуцируется небольшой скачок граничного директора (красные стрелки почти параллельны друг другу); поверхность мембраны остается практически плоской.

ет положительную кривизну (рис. 1*a*). Такую же кривизну индуцируют лизоформы липидов [18], которые способствуют образованию в мембранах сквозных пор [19].

Кромка поры характеризуется значительными деформациями мембраны [19–21]. Как правило, их энергия настолько велика, что в немодифицированной мембране, липидный состав которой близок к составу плазматических мембран бактериальных или эукариотических клеток, поры спонтанно (без внешнего воздействия) не образуются. Для качественного анализа особенностей процесса порации используется модель разрыва тонких пленок, разработанная Дерягиным и Гутопом [22]. В этой модели предполагается, что к тонкой бесструктурной пленке приложено некоторое внешнее латеральное натяжение σ . Кромка поры характеризуется избыточной энергией материала пленки по сравнению с энергией вдали от кромки. Эта избыточная энергия, отнесенная к периметру поры, называется линейным натяжением γ . В таких обозначениях, энергия создания круглой поры радиуса R может быть записана в виде: $E(R) = 2\pi R\gamma - \pi R^2\sigma$ [22]. Первое слагаемое описывает изменение внутренней энергии пленки, а второе слагаемое учитывает работу внешних сил в процессе порации. Зависимость энергии поры от радиуса имеет максимум при критическом радиусе $R^* = \gamma/\sigma$. Поры,

радиус которых меньше критического, самопроизвольно закрываются. Закритические поры ($R > R^*$) неограниченно растут, что приводит к необратимому разрыву пленки. Для образования закритической поры необходимо преодолеть энергетический барьер высотой $\Delta E = E(R^*) = \pi\gamma^2/\sigma$. Высота барьера может быть понижена за счет увеличения латерального натяжения либо за счет уменьшения линейного натяжения. Применительно к мембранам, для образования пор, как правило, прикладывается непосредственно латеральное натяжение [23–25] либо подается трансмембранная разность электрических потенциалов, что также приводит к увеличению латерального натяжения [26–29]. Однако натяжения, возникающие при связывании и частичном встраивании в замкнутые мембраны молекул АМП, оказываются недостаточными для эффективной порации. Кроме того, АМП эффективно образуют поры в модельных мембранах Мюллера–Рудина или Монтала, которые принципиально связаны с липидным резервуаром [30]. В этих мембранах латеральное натяжение определяется резервуаром и практически не меняется при адсорбции пептидов. Из качественной модели Дерягина–Гутопа, таким образом, следует, что для образования пор АМП должны понижать линейное натяжение. В серии работ было экспериментально показано, что АМП формируют два основных типа пор: 1) “бочкообразные” поры, в которых кромка полностью образована пептидными молекулами; 2) “тороидальные” поры, в которых кромка частично выстлана АМП [11–13, 31–33]. Исходя из того, что АМП индуцируют положительную кривизну поверхности монослоев, схожую со спонтанной кривизной лизоформ липидов, способствующих образованию пор, можно заключить, что АМП могут снижать линейное натяжение за счет релаксации упругих напряжений на кромке поры. Отметим, что значительная положительная кривизна индуцируется только при неглубоком встраивании пептидной молекулы в липидный монослой (рис. 1*a*). Если же при встраивании помимо липидных головок расходятся в стороны также и углеводородные цепи липидных молекул, то мембрана остается практически плоской, т.е. ее поверхность имеет приблизительно нулевую кривизну (рис. 1*б*). Кроме того, пептидные молекулы, по-видимому, значительно тверже углеводородных цепей липидов, и при деформации мембраны сами пептидные молекулы практически не деформируются. В этом случае АМП могут снижать линейное натяжение просто за счет частичного или полного замещения сильно деформированного липидного материала на кромке поры на твердую недеформируемую среду (пептид). Для такого механизма уменьшения линейного натяжения не важно, насколько глубоко встроена в мембрану молекула АМП.

Молекулярные механизмы кооперативного формирования пор в мембранах молекулами АМП в настоящее время не выяснены. Однако известно, что образованию поры предшествует адсорбция и частичное встраивание молекул АМП в липидный монослой [2, 4–6]. В конце концов, формируется сквозная пора, кромка которой частично выстлана молекулами АМП [31–33], либо кромка находится в поле деформаций, индуцированных молекулами АМП [34]. Таким образом, известны начальное и конечное состояния процесса порации. Для спонтанного протекания этого процесса необходимо (хотя и не достаточно), чтобы энергия конечного состояния по крайней мере не превышала значительно энергию начального состояния. В настоящей работе мы рассчитали энергию деформаций мембраны, индуцированных встроенными в липидный монослой молекулами АМП. Рассмотрены α -спиральные амфипатические пептиды, у которых одна боковая поверхность спирали гидрофильна, а противоположная боковая сторона спирали гидрофобна. Далее была рассчитана энергия кромки поры, на экваторе которой расположены молекулы АМП. Расчеты проделаны для случаев неглубокого и глубокого встраивания пептидов в липидный монослой. Глубина встраивания определяется соотношением гидрофобной и гидрофильной площадей боковой поверхности спирали: более гидрофобные спиральные пептиды должны глубже встраиваться в липидный монослой. Получено, что лишь в случае неглубокого встраивания пептидов энергии начального и конечного состояний процесса образования пор могут быть близки. При глубоком встраивании пептидов уменьшение линейного натяжения кромки оказывается недостаточным для эффективной порации.

ПОСТАНОВКА И РЕШЕНИЕ ЗАДАЧИ

Функционал упругой энергии. Для расчета энергии и пространственного распределения деформаций мембраны использовался функционал упругой энергии, полученный Хаммом и Козловым [35]. Этот функционал учитывает деформации поперечного изгиба, седлового изгиба и наклона. Кроме того, мы дополнительно учли приложенное к мембране латеральное натяжение, а также деформацию латерального растяжения–сжатия [15, 17, 19, 34, 36]. Все деформации считались малыми, и энергия вычислялась в квадратичном порядке по ним. Для формального описания изгибовых деформаций вводится векторное поле единичных векторов \mathbf{n} , называемых директорами. Это поле характеризует среднюю ориентацию липидных молекул. Поле директоров задается на так называемой нейтральной поверхности, проходящей внутри ли-

пидного монослоя в области сочленения полярных головок и углеводородных цепей липидов [37]. На нейтральной поверхности деформации поперечного изгиба и латерального растяжения–сжатия энергетически независимы в том смысле, что в функционале упругой энергии отсутствует слагаемое, перекрестное по этим деформациям [35, 37]. Форма нейтральной поверхности характеризуется векторным полем ее единичных нормалей \mathbf{N} . Деформация поперечного изгиба описывается дивергенцией директора вдоль нейтральной поверхности, $\text{div}(\mathbf{n})$. Деформация наклона характеризуется вектором наклона \mathbf{t} ; для малых деформаций $\mathbf{t} = \mathbf{n} - \mathbf{N}$ [35]. Седловой изгиб равен произведению слагаемых, входящих в дивергенцию директора. В частности, если нейтральная поверхность лежит в плоскости Oxy некоторой декартовой системы координат, то

седловой изгиб $K = \frac{\partial n_x}{\partial x} \frac{\partial n_y}{\partial y} - \frac{\partial n_x}{\partial y} \frac{\partial n_y}{\partial x}$, где n_x, n_y –

соответствующие проекции директора [17]. Латеральное растяжение–сжатие описывается относительным изменением площади нейтральной поверхности $\alpha = (a - a_0)/a_0$, где a и a_0 – текущая и начальная площади нейтральной поверхности соответственно, приходящиеся на липидную молекулу. Энергия, связанная с латеральным натяжением, пропорциональна изменению (увеличению) площади исходно плоской нейтральной поверхности в результате деформации. Это увеличение площади происходит не вследствие растяжения нейтральной поверхности, а за счет вытягивания дополнительной площади из липидного резервуара. Формально латеральное натяжение может быть приложено к латерально нерастяжимой поверхности. В введенных обозначениях энергия деформированного участка монослоя записывается в следующем виде [17, 34, 35]:

$$W = \int dS \left(\frac{K_c}{2} (\text{div}(\mathbf{n}) + J_0)^2 - \frac{K_c}{2} J_0^2 + \frac{K_t}{2} \mathbf{t}^2 + \frac{K_a}{2} \alpha^2 + K_G K \right) + \int \sigma_0 dS - \sigma_0 A_0, \quad (1)$$

где интегрирование ведется по нейтральной поверхности; J_0 – спонтанная кривизна монослоя; A_0 – площадь нейтральной поверхности в исходном недеформированном состоянии; K_c, K_t, K_a, K_G – модули поперечного изгиба, наклона, латерального растяжения–сжатия и седлового изгиба соответственно; σ_0 – латеральное натяжение. Дифференциальные уравнения, получающиеся при вариации (минимизации) функционала упругой энергии (1) по полям деформаций, вообще говоря, являются уравнениями в частных производных и, как правило, не могут быть решены аналитически. Решение может быть получено лишь в случае достаточно высокой симметрии рассматриваемой

системы, например, трансляционной или вращательной. В этих случаях вариационные уравнения становятся обыкновенными линейными дифференциальными уравнениями и могут быть решены аналитически.

Энергия деформаций мембраны, индуцированных одиночным пептидом. Для расчета энергии деформаций, индуцированных частично встроенным в мембрану одиночным пептидом, рассмотрим горизонтальный липидный бислой, в верхний монослой которого встроена молекула АМП. Для определенности будем считать, что амфипатический пептид имеет α -спиральную вторичную структуру и ось спирали параллельна плоскости мембраны. Введем декартову систему координат $Oxyz$, ось Oy которой параллельна оси спирали, ось Ox перпендикулярна оси спирали, ось Oz перпендикулярна плоскости мембраны и проходит через ось спирали. Ранее мы показали, что энергия и пространственное распределение деформаций, индуцированных частично встроенным в липидный монослой амфипатическим пептидом, достаточно точно описываются в одномерном приближении, в предположении о трансляционной симметрии системы вдоль направления продольной оси α -спирали [15], т.е. оси Oy в введенной декартовой системе координат. В этом случае вычисляется погонная упругая энергия, т.е. отнесенная к единице длины вдоль направления трансляционной симметрии. Для получения абсолютной величины энергии деформаций, индуцируемых пептидом конечной длины, погонную энергию необходимо умножить на эффективную “деформационную” длину пептида, которая приблизительно на 1 нм превосходит фактическую длину α -спирали [15]. При трансляционной симметрии формально оказывается равным нулю седловой изгиб. Однако по теореме Гаусса–Боне интеграл по поверхности от седлового изгиба дает константу, зависящую только от связности области интегрирования. Таким образом, энергия, связанная с седловым изгибом, может быть вычислена напрямую, без предположения о трансляционной симметрии системы, и соответствующая величина может быть добавлена к упругой энергии, вычисленной в рамках этого предположения.

В предположении о трансляционной симметрии все поля деформаций зависят только от координаты x , и все векторные величины в (1) могут быть заменены их проекциями на ось Ox : $\mathbf{n} \rightarrow n_x = n$, $\mathbf{N} \rightarrow N_x = N$, $\mathbf{t} \rightarrow t_x = t$. Форму нейтральной поверхности будем описывать z -координатами ее точек, функцией $H(x)$; форму межмонослойной поверхности – функцией $M(x)$. Ниже все величины, относящиеся к верхнему монослою, будем обозначать индексом “ u ”, к нижнему монослою – индексом “ l ”. С требуемой точностью

$N_u = dH_u(x)/dx$; $N_l = -dH_l(x)/dx$; $\text{div}(\mathbf{n}_u) = dn_u(x)/dx$; $\text{div}(\mathbf{n}_l) = dn_l(x)/dx$; изменение площади нейтральной поверхности (единичной ширины вдоль оси Oy) вследствие отклонения ее от плоскости $\int dS - A_0 \rightarrow \int \left(\sqrt{1 + [\text{grad}(H)]^2} - 1 \right) dx \approx \int \frac{1}{2} (dH/dx)^2 dx$. Модуль объемного сжатия мембран очень велик, $\sim 10^{10}$ Дж/м³ [38], и с высокой точностью гидрофобная часть липидного монослоя может считаться локально объемно несжимаемой. В рамках линейной теории условие локальной объемной несжимаемости для верхнего и нижнего монослоев, соответственно, записывается в виде [15, 35]:

$$\begin{aligned} H_u - M &= h - \frac{h^2}{2} \frac{dn_u}{dx} - h\alpha_u, \\ M - H_l &= h - \frac{h^2}{2} \frac{dn_l}{dx} - h\alpha_l, \end{aligned} \quad (2)$$

где h – толщина гидрофобной части липидного монослоя, ниже для простоты называемая просто толщиной монослоя. Из условий (2) выражаются формы нейтральных поверхностей монослоев H_u , H_l , через которые выражаются проекции N_u , N_l единичных нормалей на ось Ox , входящие в проекции вектора наклона $t_u = n_u - N_u$, $t_l = n_l - N_l$. Таким образом, функционал упругой энергии участка деформированного бислоя (единичной ширины в направлении оси Oy) в предположении о трансляционной симметрии и малости всех деформаций может быть записан в следующем виде:

$$\begin{aligned} W &= \frac{K_t}{2} \int \left\{ l^2 \left(n_u' + J_0 \right)^2 - l^2 J_0^2 + \right. \\ &+ \left(n_u - M' + \frac{h^2}{2} n_u'' + h\alpha_u' \right)^2 + \\ &+ A\alpha_u^2 + \sigma \left(M' - \frac{h^2}{2} n_u'' - h\alpha_u' \right)^2 \left. \right\} dx + \\ &+ \frac{K_t}{2} \int \left\{ l^2 \left(n_l' + J_0 \right)^2 - l^2 J_0^2 + \right. \\ &+ \left(n_l + M' + \frac{h^2}{2} n_l'' + h\alpha_l' \right)^2 + \\ &+ A\alpha_l^2 + \sigma \left(M' + \frac{h^2}{2} n_l'' - h\alpha_l' \right)^2 \left. \right\} dx, \end{aligned} \quad (3)$$

где $l^2 = K_c/K_t$, $A = K_a/K_t$, $\sigma = \sigma_0/K_t$; штрих обозначает производную по координате x . Вариация функционала (3) по функциям $n_u(x)$, $n_l(x)$, $\alpha_u(x)$, $\alpha_l(x)$, $M(x)$ приводит к пяти уравнениям Эйлера–Лагранжа:

$$\begin{cases} \frac{h^4}{4}(1+\sigma)n_u^{(4)} + (h^2 - l^2)n_u'' + n_u - \frac{h^2}{2}(1+\sigma)M'''' - M' + \frac{h^3}{2}(1+\sigma)\alpha_u + h\alpha_u' = 0, \\ \frac{h^4}{4}(1+\sigma)n_l^{(4)} + (h^2 - l^2)n_l'' + n_l + \frac{h^2}{2}(1+\sigma)M'''' - M' + \frac{h^3}{2}(1+\sigma)\alpha_l + h\alpha_l' = 0, \\ \frac{h^2}{2}(1+\sigma)(n_u''' - n_l''') + n_u' - n_l' - 2(1+\sigma)M'' + h(1+\sigma)(\alpha_u'' - \alpha_l'') = 0, \\ \frac{h^2}{2}(1+\sigma)n_u''' + n_u' - (1+\sigma)M'' + h(1+\sigma)\alpha_u'' - \frac{A}{h}\alpha_u = 0, \\ \frac{h^2}{2}(1+\sigma)n_l''' + n_l' + (1+\sigma)M'' + h(1+\sigma)\alpha_l'' - \frac{A}{h}\alpha_l = 0. \end{cases} \quad (4)$$

Общее решение линейной системы уравнений (4) для проекций директора и формы межмонослойной поверхности имеет вид:

$$\begin{aligned} n_u(x) &= c_1 e^{-p_1 x} + c_2 e^{p_1 x} + c_3 e^{-p_2 x} + c_4 e^{p_2 x} + c_5 e^{\frac{\sqrt{\sigma} x}{1+\sigma l}} + c_6 e^{-\frac{\sqrt{\sigma} x}{1+\sigma l}} + c_7, \\ n_l(x) &= c_1 e^{-p_1 x} + c_2 e^{p_1 x} + c_3 e^{-p_2 x} + c_4 e^{p_2 x} - c_5 e^{\frac{\sqrt{\sigma} x}{1+\sigma l}} - c_6 e^{-\frac{\sqrt{\sigma} x}{1+\sigma l}} - c_7, \\ M(x) &= c_5 \frac{2l^2 + h^2 \sigma}{2l\sqrt{\sigma(1+\sigma)}} e^{\frac{\sqrt{\sigma} x}{1+\sigma l}} - c_6 \frac{2l^2 + h^2 \sigma}{2l\sqrt{\sigma(1+\sigma)}} e^{-\frac{\sqrt{\sigma} x}{1+\sigma l}} + c_7 x + c_8, \end{aligned} \quad (5)$$

где c_0, c_1, \dots, c_8 — комплексные постоянные коэффициенты, которые следует определить из граничных условий,

$$p_{1,2} = \sqrt{\frac{2h^2\sigma - 2A(h^2 - l^2) \pm 2\sqrt{h^4\sigma^2 - 2Ah^2(\sigma(h^2 + l^2) + 2l^2) - A^2(\sigma h^2(h^2 + 2l^2) - l^4)}}{h^2(1+\sigma)(Ah^2 + 4l^2)}}. \quad (6)$$

Относительное изменение площади нейтральной поверхности записывается в виде:

$$\alpha_u(x) = \alpha_l(x) = D_1 c_1 e^{-p_1 x} + D_2 c_2 e^{p_1 x} + D_3 c_3 e^{-p_2 x} + D_4 c_4 e^{p_2 x}, \quad (7)$$

где D_1, D_2, D_3, D_4 — известные комбинации параметров системы, которые очень громоздки и здесь не приводятся. Из условий локальной объемной несжимаемости (2) находятся формы нейтральных поверхностей монослоев $H_u(x), H_l(x)$. Полученные выражения для проекций директора, формы межмонослойной поверхности и относительного изменения площади нейтральной поверхности подставляются в функционал упругой энергии (3), и в результате интегрирования по нейтральным поверхностям монослоев получается энергия деформаций мембраны, отнесенная к единице длины вдоль оси Oy .

В области встроенного в липидный монослой пептида не существует нейтральной поверхности. Таким образом, состояние противоположного липидного монослоя непосредственно под встроенным пептидом отличается от состояния липидного монослоя в составе бислоя. Обозначим величины, относящиеся к этому монослойному участку, индексом “ m ”. Для этого участка моно-

слоя функционал упругой энергии может быть записан в следующем виде:

$$\begin{aligned} W_m &= \frac{K_t}{2} \int \left\{ l^2 (n_m' + J_0)^2 - l^2 J_0^2 + \right. \\ &+ \left(n_m + M' + \frac{h^2}{2} n_m'' + h\alpha_m' \right)^2 + \\ &+ A\alpha_m^2 + \sigma \left(M' + \frac{h^2}{2} n_m'' - h\alpha_m' \right)^2 \left. \right\} dx. \end{aligned} \quad (8)$$

Вариация функционала (8) по функциям $n_m(x), M(x), \alpha_m(x)$ приводит к трем линейным дифференциальным уравнениям Эйлера—Лагранжа, общее решение которых может быть записано в виде:

$$\begin{aligned} \alpha_m(x) &= 0, \\ n_m(x) &= f_1 + f_2 e^{\frac{\sqrt{\sigma} x}{1+\sigma l}} + f_3 e^{-\frac{\sqrt{\sigma} x}{1+\sigma l}}, \\ M(x) &= f_0 - f_1 x - f_2 \frac{2l^2 + h^2 \sigma}{2l\sqrt{\sigma(1+\sigma)}} e^{\frac{\sqrt{\sigma} x}{1+\sigma l}} + \\ &+ f_3 \frac{2l^2 + h^2 \sigma}{2l\sqrt{\sigma(1+\sigma)}} e^{-\frac{\sqrt{\sigma} x}{1+\sigma l}}, \end{aligned} \quad (9)$$

где f_0, f_1, f_2, f_3 – вещественные коэффициенты, которые следует определить из граничных условий. Форма нейтральной поверхности монослоя находится из условия локальной объемной несжимаемости (2):

$$H_l = M - h + \frac{h^2}{2} n'_m + h\alpha_m. \quad (10)$$

Неопределенные коэффициенты, входящие в общие решения уравнений Эйлера–Лагранжа, находились из следующих условий: 1) все функции, описывающие деформации, должны быть вещественными при любом вещественном значении x ; 2) эти функции должны быть всюду ограничены; 3) вдали от пептида мембрана не деформирована; 4) проекция директора, межмонослойная и нейтральная поверхности каждого монослоя должны быть всюду непрерывны, за исключением границы пептида. Кроме того, в случае неглубоко встроенного пептида, исходя из геометрического смысла директора, на значения проекции директора на правой и левой границах пептида ставилось следующее условие:

$$\begin{aligned} n_u(\Delta L/2) - n_u(-\Delta L/2) &\equiv \Delta n_0 = \\ &= -\frac{\Delta L}{\sqrt{\left(\frac{\Delta L}{2}\right)^2 + \left(h - \frac{\Delta L}{2}\right)^2}}, \end{aligned} \quad (11)$$

где ΔL – ширина встроенной части пептида на нейтральной поверхности верхнего монослоя. В случае глубоко встроенного пептида на проекции директора ставилось условие:

$$n_u(D/2) - n_u(-D/2) = \Delta n, \quad (12)$$

где D – диаметр пептида, Δn – величина скачка проекции директора, зависящая от глубины встраивания пептида и изменяющаяся от 0 (глубокое встраивание) до Δn_0 (неглубокое встраивание). Встраивание на глубину меньше половины диаметра пептида считалось неглубоким, больше половины диаметра – глубоким. Коэффициенты, оставшиеся неопределенными после наложения указанных граничных условий, находились путем минимизации по ним полной упругой энергии.

К упругой энергии мембраны, рассчитываемой в рамках предположения о трансляционной симметрии системы, необходимо добавить энергию, связанную с седловым изгибом. Этот вклад может быть рассчитан, например, для круглого пептида с заданной величиной радиальной проекции директора на границе пептида, равной $\Delta n_0/2$ или $\Delta n/2$. По теореме Гаусса–Боне интеграл от гауссовой кривизны по замкнутой поверхности является топологическим инвариантом, поэтому вклад седлового изгиба зависит лишь от величин директора на границе пептида и на бесконечном удале-

нии от пептида. Для круглого пептида энергия седлового изгиба может быть записана в виде:

$$\begin{aligned} W_G &= K_G \int 2\pi r \frac{dn_r}{dr} \frac{n_r}{r} dr = \\ &= \pi K_G \left(n_r^2(\infty) - n_r^2(R_p) \right) = -\pi K_G n_r^2(R_p), \end{aligned} \quad (13)$$

где n_r – радиальная проекция директора; R_p – радиус границы пептида; здесь учтено, что $n_r(\infty) = 0$. Таким образом, вклад седлового изгиба равен $W_{G0} = -\pi K_G (\Delta n_0/2)^2$ для случая неглубоко встроенного пептида и $W_G = -\pi K_G (\Delta n/2)^2$, если пептид глубоко встроен в липидный монослой. Этот вклад не зависит явно от геометрических характеристик пептида и зависит только от граничного директора в предположении того, что на всей границе пептида директор нормален к поверхности границы и его проекция, нормальная к границе пептида и лежащая в плоскости мембраны, постоянна по абсолютной величине.

Энергия кромки поры. Рассмотрим круглую сквозную пору в горизонтальной мембране. Радиус нейтральной поверхности липидного монослоя на кромке поры в самом узком месте (“экваторе”) обозначим через R_0 . Система обладает вращательной симметрией относительно оси, проходящей через центр окружности кромки поры перпендикулярно плоскости мембраны. Введем цилиндрическую систему координат Orz с началом O , расположенным на оси вращательной симметрии в плоскости межмонослойной поверхности; ось Oz совпадает с осью вращательной симметрии; ось Or лежит в плоскости межмонослойной поверхности. Все поля деформаций зависят только от координаты r . В этом случае можно все векторные величины заменить их проекциями на ось Or : $\mathbf{n} \rightarrow n_r = n$, $\mathbf{N} \rightarrow N_r = N$, $\mathbf{t} \rightarrow t_r = t$. Кроме того, с требуемой точностью $\text{div}(\mathbf{n}) = n' + n/r$; $N_u = dH_u(r)/dr$, $N_l = -dH_l(r)/dr$. Условия локальной объемной несжимаемости (2) переписываются для вращательно симметричной системы следующим образом:

$$\begin{aligned} H_u - M &= h - \frac{h^2}{2} \left(\frac{dn_u}{dr} + \frac{n_u}{r} \right) - h\alpha_u, \\ M - H_l &= h - \frac{h^2}{2} \left(\frac{dn_l}{dr} + \frac{n_l}{r} \right) - h\alpha_l. \end{aligned} \quad (14)$$

Учтем, что мембрана как с чисто липидной порой, так и порой, на экваторе которой расположен амфипатический пептид, обладает зеркальной симметрией относительно плоской межмонослойной поверхности. Это означает, что $M(r) = 0$, $M'(r) = 0$; кроме того, можно все вычисления проделать для одного монослоя, для определенности верхнего, а затем полученное значение энергии умножить на два. Из условий (14) выражается функция $H_u(r)$, через которую выражается радиальная проекция нормали N_u , и проекция вектора наклона $t_u = n_u - N_u$. Функ-

ционал упругой энергии (2) радиально симметричного бислоя записывается следующим образом:

$$W = 2 \frac{K_l}{2} \int_{R_m}^{\infty} 2\pi r \left\{ l^2 \left(n_u' + \frac{n_u}{r} + J_0 \right)^2 - l^2 J_0^2 + \left(n_u + \frac{h^2}{2} \left(n_u'' + \frac{n_u'}{r} - \frac{n_u}{r^2} \right) + h\alpha_u' \right)^2 + \sigma \left(\frac{h^2}{2} \left(n_u'' + \frac{n_u'}{r} - \frac{n_u}{r^2} \right) + h\alpha_u' \right) + A\alpha_u^2 \right\} dr - \pi K_G n_u^2(R_m), \quad (15)$$

где множитель “2” в правой части учитывает энергию второго (нижнего) монослоя; R_m – радиус границы горизонтального бислоя, определяемый ниже; последнее слагаемое учитывает вклад седлового изгиба при условии $n_u(\infty) = 0$. Далее,

обозначим $n_u = n$, $\alpha_u = \alpha$, $2\sigma + 1 = s$. Вариация функционала (15) по $n(r)$, $\alpha(r)$ приводит к следующим уравнениям Эйлера–Лагранжа:

$$\begin{aligned} & \frac{h^4}{4} n^{(4)} + \frac{h^4}{2r} n''' + \left(\frac{h^2 - l^2}{s} - \frac{3h^4}{4r^2} \right) n'' + \\ & + \left(\frac{h^2 - l^2}{s} + \frac{3h^4}{4r^2} \right) \frac{n'}{r} + \left(\frac{r^2 - (h^2 - l^2)}{sr^2} - \frac{3h^4}{4r^4} \right) n + \\ & + \frac{h^3}{2} \alpha''' + \frac{h^3}{2r} \alpha'' + \left(\frac{h}{s} - \frac{h^3}{2r^2} \right) \alpha' = 0, \quad (16) \\ & h^3 n''' + \frac{2h^3}{r} n'' + \left(\frac{2h}{s} - \frac{h^3}{r^2} \right) n' + \left(\frac{2h}{s} + \frac{h^3}{r^2} \right) \frac{n}{r} + \\ & + 2h^2 \alpha'' + \frac{2h^2}{r} \alpha' - \frac{2A}{s} \alpha = 0. \end{aligned}$$

Общее решение этих уравнений записывается в виде:

$$\begin{aligned} n(r) &= b_1 J_1(q_1 r) + b_2 J_1(q_2 r) + b_3 Y_1(q_1 r) + b_4 Y_1(q_2 r), \\ \alpha(r) &= \frac{q_1 \left(2Al^2 - h^2 A + \frac{1}{2} q_2^2 h^2 (h^2 A + 4l^2) \right)}{hA(2+A)} (b_1 J_0(q_1 r) + b_3 Y_0(q_1 r)) + \\ & + \frac{q_2 \left(2Al^2 - h^2 A + \frac{1}{2} q_1^2 h^2 (h^2 A + 4l^2) \right)}{hA(2+A)} (b_2 J_0(q_2 r) + b_4 Y_0(q_2 r)), \quad (17) \end{aligned}$$

где J_0, Y_0, J_1, Y_1 – модифицированные функции Бесселя нулевого и первого порядков соответственно; b_1, b_2, b_3, b_4 – комплексные постоянные коэффициенты, которые следует определить из граничных условий;

$$q_{1,2} = \sqrt{\frac{A(h^2 - l^2) - 2h^2\sigma \pm \sqrt{(l^4 - 2h^4\sigma - 2h^2l^2)A^2 - 4h^2(l^2 + \sigma(h^2 + l^2))A + 4h^4\sigma}}{h^2(2\sigma + 1)(h^2 A + 4l^2)}}. \quad (18)$$

Полученные решения подставляются в функционал упругой энергии (15), и после интегрирования по нейтральной поверхности получается выражение для энергии деформированного участка горизонтального бислоя. Это выражение аналитическое, однако очень громоздкое и поэтому здесь не приводится.

Выражение (15) для упругой энергии участка горизонтального бислоя применимо только в случае малых деформаций. В частности, необходимо, чтобы $|n| \ll 1$, $|hn'| \ll 1$, $|h^2 n''| \ll 1$. Первое условие означает, что в среднем оси липидных молекул в горизонтальном бислое должны слабо отклоняться от вертикали. В то же время на экваторе чисто липидной поры липидные молекулы расположены горизонтально, т.е. $n(R_0) = 1$, и функционал (15) вблизи экватора поры, вообще говоря, неприменим. Вблизи экватора нейтральная поверхность монослоя слабо отклоняется не от горизонтальной плоскости, а от вертикальной цилиндриче-

ской поверхности, соосной с порой. Таким образом, для расчета энергии кромки в рамках линейной теории упругости мы разбиваем мембрану на две области: 1) практически горизонтальный бислой, в котором нормаль к нейтральной поверхности и директоры слабо отклоняются от вертикали; 2) практически цилиндрический монослой, соосный с порой, в котором нормаль к нейтральной поверхности и директоры слабо отклоняются от горизонтальной плоскости.

Форму нейтральной поверхности вертикального монослоя будем описывать r -координатами ее точек, функцией $R(z)$, в введенной цилиндрической системе координат Orz . Проекцию директора на ось Oz обозначим $v(z)$. С требуемой точностью $\text{div}(\mathbf{n}) = v'(z) + 1/R(z)$. Будем предполагать, что нейтральная поверхность, описываемая функцией $R(z)$, слабо отклоняется от цилиндрической поверхности, радиус которой обозначим R_0 , а межмонослойная поверхность, описываемая функ-

цией $M(z)$, слабо отклоняется от цилиндрической поверхности радиуса M_v т.е.: $R(z) = R_v + u(z)$, $M(z) = M_v + m(z)$, где $|u(z)| \ll R_v$, $|m(z)| \ll M_v$. Условие локальной объемной несжимаемости для вертикального монослоя записывается в виде:

$$M(z) - R(z) = h - \frac{h^2}{2} \left(v' + \frac{1}{R(z)} \right) - h\beta(z), \quad (19)$$

где $\beta(z)$ обозначает относительное латеральное растяжение-сжатие. Нейтральная и межмонослойная поверхности цилиндрического монослоя, отклонения от которого мы считаем малыми в области вертикального монослоя на кромке поры, также должны удовлетворять условию локальной объемной несжимаемости, которое записывается в следующем виде:

$$M_v - R_v = h - \frac{h^2}{2R_v^2}. \quad (20)$$

С учетом (20) из уравнения (19) можно выразить отклонение радиуса нейтральной поверхности $u(z)$ в первом (линейном) порядке по малым деформациям:

$$u(z) = \frac{R_v^2}{2R_v^2 + h^2} (2m(z) + 2h\beta(z) + h^2v'(z)). \quad (21)$$

С требуемой точностью проекция нормали на ось Oz записывается как $N_z = -u'(z)$. Функционал упругой энергии (1) для вертикального монослоя записывается в виде:

$$W_m = \frac{K_t}{2} \int_{-Z_m}^{Z_m} 2\pi R \sqrt{1 + (R')^2} \left\{ l^2 \left(v' + \frac{1}{R} + J_0 \right)^2 - l^2 J_0^2 + (v - N_z)^2 + A\beta^2 + \sigma \right\} dz - 2\sigma_0\pi (R_m^2 - R_0^2) + 2\pi K_G (v(Z_m) - v(-Z_m)), \quad (22)$$

где $\{R_m, Z_m\}$ – координаты границы (“сшивки”) вертикального монослоя и горизонтального бислоя; последнее слагаемое учитывает вклад седлового изгиба. В функционал (22) подставляется выражение $N_z = -u'(z)$, затем подставляется $u(z)$ из (21), и функционал разлагается до второго порядка по малым величинам $v(z)$, $m(z)$, $b(z)$ и их производным. Вариация получающегося функционала по $v(z)$, $m(z)$, $b(z)$ приводит к трем линейным дифференциальным уравнениям Эйлера–Лагранжа. Общее решение этих уравнений записывается в следующем виде:

$$\begin{aligned} \beta(z) &= 0, \\ v(z) &= d_1 e^{-\alpha_1 z} + d_2 e^{\alpha_1 z} + d_3 e^{-\alpha_2 z} + d_4 e^{\alpha_2 z}, \\ m(z) &= \frac{(2R_v^2 + h^2)(l^2 - 2\sigma R_v^2)}{4R_v l^2} + \\ &+ D_1 d_1 e^{-\alpha_1 z} + D_2 d_2 e^{\alpha_1 z} + D_3 d_3 e^{-\alpha_2 z} + D_4 d_4 e^{\alpha_2 z}, \end{aligned} \quad (23)$$

где d_1, d_2, d_3, d_4 – комплексные постоянные коэффициенты, которые следует определить из граничных условий; D_1, D_2, D_3, D_4 – известные, но очень громоздкие комбинации упругих параметров мембраны;

$$\begin{aligned} \alpha_{1,2} &= 2(l^2 + 2l^2 J_0 R_v + 2\sigma R_v^2 + 2R_v^2)^{-\frac{1}{2}} \times \\ &\times \left[2\sigma R_v^4 + 6l^2 J_0 R_v^3 - 2l^4 J_0^2 R_v^2 + l^2 R_v^2 + 2l^4 \pm \right. \\ &\pm (2\sigma R_v^4 - 2l^4 + 5l^2 R_v^2 + 6l^2 J_0 R_v^3 - 4l^4 J_0 R_v^2 - \\ &- 2l^4 J_0^2 R_v^2)^{\frac{1}{2}} \times (2\sigma R_v^4 - 2l^4 - 3l^2 R_v^2 + \\ &\left. + 6l^2 J_0 R_v^3 + 4l^4 J_0 R_v^2 - 2l^4 J_0^2 R_v^2)^{\frac{1}{2}} \right]^{\frac{1}{2}}. \end{aligned} \quad (24)$$

Решение (23) затем подставляется в функционал (22), и после интегрирования получается выражение для упругой энергии вертикального монослоя.

Распределения деформаций, получаемые для вертикального монослоя и горизонтального бислоя, сопрягаются на их общей границе $\{R_m, Z_m\}$, исходя из непрерывности директора и нейтральной поверхности монослоя, с учетом малости деформаций [19]:

$$\begin{aligned} H(R_m) &= Z_m, \quad R(Z_m) = R_m, \\ n(R_m) - v(Z_m) &= 1. \end{aligned} \quad (25)$$

Кроме того, считалось, что вдали от поры мембрана не деформирована, и налагались следующие условия:

$$n(\infty) = 0, \quad H(\infty) = h. \quad (26)$$

Для чисто липидной поры на экваторе ставилось условие $v(0) = 0$, $R(0) = R_0$. В случае, если на экваторе поры расположен амфипатический пептид, то на вертикальном монослойном участке кромки поры налагались следующие условия:

$$\begin{aligned} v(\Delta L/2) &= \frac{\Delta n_0}{2} = -\frac{\Delta L}{2\sqrt{\left(\frac{\Delta L}{2}\right)^2 + \left(h - \frac{\Delta L}{2}\right)^2}}, \\ R(\Delta L/2) &= R_0, \end{aligned} \quad (27)$$

для случая неглубокого встраивания пептида и

$$v(D/2) = \frac{\Delta n}{2}, \quad R(D/2) = R_0, \quad (28)$$

в случае глубоко встроенного пептида. Суммарная упругая энергия вертикального монослоя и горизонтального бислоя затем численно минимизировалась по координатам сшивки этих участков $\{R_m, Z_m\}$ методом спуска по градиенту.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для получения количественных результатов и их графической иллюстрации использовались величины упругих параметров мембраны, характерные для диолеилфосфатадилхолина (ДОФХ), типичного липида плазматических мембран бактериальных клеток. В расчете на один монослой: модуль изгиба $K_c = 10 k_B T$ ($k_B T \approx 4.14 \times 10^{-21}$ Дж) [39]; модуль наклона $K_t = 40$ мН/м $\approx 10 k_B T/\text{нм}^2$ [35]; модуль латерального растяжения–сжатия $K_a = 133$ мН/м $\approx 32 k_B T/\text{нм}^2$ [39]; модуль седлового изгиба $K_G = -K_c/2 = -5 k_B T$ [40]; латеральное натяжение $\sigma_0 = 0.01$ мН/м; спонтанная кривизна $J_0 = -0.091$ нм⁻¹ [41]; толщина гидрофобной части монослоя $h = 1.45$ нм [19, 39]. Предполагалось, что диаметр пептида $D = 1.3$ нм; длина пептида $L_p = 5$ нм; $R_v = R_0 + h/4$. Если на экваторе кромки поры расположена одна пептидная молекула, то радиус поры равен $R_1 = L_p/(2\pi) = 0.8$ нм; две пептидные молекулы – $R_2 = 2L_p/(2\pi) = 1.6$ нм; три пептидные молекулы – $R_3 = 3L_p/(2\pi) = 2.4$ нм. В случае неглубокого встраивания пептида количественные результаты были получены для ширины встроенной области $\Delta L = 0, 0.3, 0.5, 0.7, 1.0, 1.2, 1.3$ нм, что согласно условию (11) соответствует значениям скачка директора на границе пептида $|\Delta n_0| = 0, 0.23, 0.41, 0.61, 0.93, 1.15, 1.26$. Для случая глубокого встраивания пептида ширина встроенной области считалась равной диаметру пептида $D = 1.3$ нм, а граничный директор Δn последовательно устанавливался равным выписанным выше значениям Δn_0 . Величины энергии деформаций мембраны, индуцированных одиночной молекулой пептида, приведены в табл. 1.

При некоторых значениях граничного скачка директора $\Delta n_0, \Delta n$ (при неглубоком и глубоком встраивании пептида, соответственно) энергия деформаций, индуцированных одиночной пептидной молекулой, оказывается отрицательной. Это связано с тем, что спонтанная кривизна монослоя ДОФХ отрицательная, и встраивание пептида, индуцирующего положительную кривизну, энергетически выгодно, поскольку при этом уменьшается разница между спонтанной (отрицательной) и геометрической (практически нулевой) кривизнами поверхности монослоя. Формально в квадратичном по деформациям функционале (1) отрицательный вклад, связанный со спонтанной кривизной J_0 , обеспечивается линейным по спонтанной кривизне слагаемым:

$$\begin{aligned} & \frac{K_c}{2} (\text{div}(\mathbf{n}) + J_0)^2 - \frac{K_c}{2} J_0^2 = \\ & = \frac{K_c}{2} \{ [\text{div}(\mathbf{n})]^2 + 2J_0 \text{div}(\mathbf{n}) \}. \end{aligned} \quad (27)$$

Таблица 1. Величины энергии деформаций, индуцированных одиночной пептидной молекулой, в случае неглубокого и глубокого встраивания

ΔL , нм	$\Delta n_0, \Delta n$	$W, k_B T$	
		встраивание	
		неглубокое	глубокое
0	0	0	0
0.3	0.23	-0.53	-0.58
0.5	0.41	-0.27	-0.39
0.7	0.61	0.66	0.49
1.0	0.93	3.59	3.36
1.2	1.15	6.53	6.37
1.3	1.26	8.21	8.21

Из табл. 1 видно, что энергия деформаций, индуцированных встроенной в липидный монослой молекулой АМП, определяется граничным директором $\Delta n_0, \Delta n$: энергия практически не отличается в случаях глубокого и неглубокого встраивания, т.е. она слабо зависит от ширины встроенной области (ΔL при неглубоком встраивании по сравнению с D – при глубоком).

На рис. 2 приведены рассчитанные формы мембраны вблизи кромки поры радиуса $R = 1.5$ нм с неглубоко (рис. 2а) и глубоко (рис. 2б) встроенным пептидом, индуцирующим скачок граничного директора $\Delta n_0 = \Delta n = 0.23$ ($\Delta L = 0.3$ нм). В этих условиях оптимизированные координаты сопряжения вертикального монослойного и горизонтального бислойного участков кромки поры составляют $R_m = 1.86$ нм, $Z_m = 1.35$ нм и $R_m = 1.64$ нм, $Z_m = 1.35$ нм для случаев неглубоко и глубоко встроенного пептида соответственно. На рис. 2в приведена рассчитанная форма мембраны вблизи кромки поры радиуса $R = 1.5$ нм с пептидом шириной $\Delta L = D = 1.3$ нм, индуцирующим скачок граничного директора $\Delta n = \Delta n_0 = 1.26$. В этом случае координаты сопряжения вертикального монослойного и горизонтального бислойного участков кромки поры равны $R_m = 2.02$ нм, $Z_m = 1.38$ нм. Из рисунков видно, что формы мембраны различаются для одинаковых скачков граничных директоров при разной ширине встроенной части пептида (ср. рис. 2а и 2б), а также при одинаковой ширине встроенной части пептида, но различных скачках граничных директоров (ср. рис. 2б и 2в).

На рис. 3а приведены зависимости линейного натяжения кромки поры от радиуса для случаев неглубоко (сплошные кривые) и глубоко (штриховые кривые) встроенных пептидов, расположенных на экваторе поры. Из рисунка видно, что в рассматриваемом диапазоне радиусов $0.7 \text{ нм} < R < 5 \text{ нм}$ линейное натяжение сильно зависит от радиуса по-

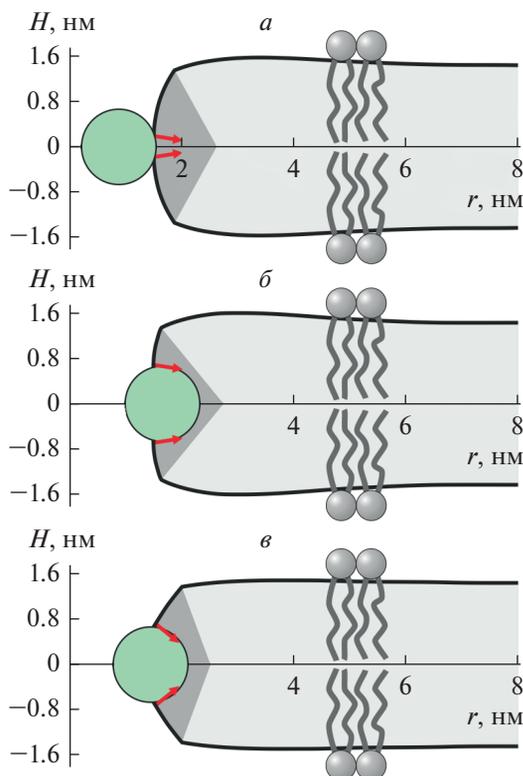


Рис. 2. Форма мембраны вблизи кромки поры радиуса $R = 1.5$ нм с амфипатическими пептидами, расположенными на ее экваторе. *a* – Неглубоко встроенные пептиды с шириной встроенной области $\Delta L = 0.3$ нм (скачок граничного директора $\Delta n_0 = 0.23$); *b* – глубоко встроенные пептиды, индуцирующие скачок директора $\Delta n = 0.23$; *v* – пептиды встроенные на глубину радиуса α -спирали, индуцирующие скачок директора $\Delta n = \Delta n_0 = 1.26$. Пептид показан зеленым кругом; граничные директора показаны красными стрелками; область горизонтального бислоя показана светло-серым цветом, область вертикального бислоя – серым цветом. На панелях *a* и *b* угол между граничными директорами одинаков; на панелях *b* и *v* одинакова ширина встроенной в мембрану части пептида ($\Delta L = 1.3$ нм).

ры. В частности, в случае пептида, встроенного на глубину радиуса α -спирали ($\Delta L = D = 1.3$ нм) и индуцирующего скачок граничного директора $\Delta n = \Delta n_0 = 1.26$ (рис. 3а, нижняя кривая) линейное натяжение изменяется приблизительно в 3 раза: от 13.7 пН при $R = 0.7$ нм до 4.3 пН при $R = 5$ нм. В целом, пептидные молекулы на экваторе поры понижают линейное натяжение кромки, причем неглубоко встроенные пептиды понижают линейное натяжение сильнее, чем глубоко встроенные АМП. Понижение линейного натяжения оказывается тем большим, чем больший скачок граничного директора индуцируют пептиды (рис. 3а). Согласно качественной модели Дерягина–Гутопа, при фиксированном латеральном натяжении понижение линейного натяжения кромки поры способствует образованию закритических

пор, поскольку при этом понижается энергетический барьер порации $\Delta E = \pi\gamma^2/\sigma$.

Зависимость энергии поры от радиуса приведена на рис. 3б для случаев неглубоко (сплошные кривые) и глубоко (штриховые кривые) встроенных пептидов, расположенных на экваторе поры. Из зависимостей видно, что энергия кромки понижается при последовательном увеличении скачка директора Δn_0 , Δn на границе пептида. При малых радиусах энергия кромки поры с глубоко встроенным пептидом несколько ниже, чем с неглубоко встроенным пептидом; однако при радиусах поры $R > 1.5$ нм энергия кромки поры с неглубоко встроенным пептидом оказывается ниже для всех рассмотренных величин скачка граничного директора. На рис. 3б точками показаны энергии деформаций, индуцируемых одиночными пептидами, встроенными в плоский бислой. Радиусу поры $R = 0.8$ нм соответствует один одиночный пептид длиной $L_p = 5$ нм, радиусу поры $R = 1.6$ нм – два пептида, радиусу поры $R = 2.4$ нм – три пептида и т.д. При ширине встроенной части пептида $\Delta L = D = 1.3$ нм и скачке граничного директора $\Delta n = \Delta n_0 = 1.26$ энергия деформаций, индуцированных двумя пептидами в плоском бислое, оказывается выше, чем энергия кромки поры с двумя такими же пептидами, расположенными на ее экваторе. Отсюда можно заключить, что двух пептидных молекул, встроенных в липидный монослой приблизительно на глубину радиуса α -спирали, достаточно для образования сквозной поры. В принципе, состояния двух пептидов, встроенных в плоский бислой, и поры с пептидами на экваторе могут быть разделены энергетическим барьером неизвестной высоты. Однако энергетический барьер определяет характерное время перехода из одного состояния в другое; при этом разница энергий состояний определяет их относительную вероятность возникновения. Когда энергии двух состояний сопоставимы, вероятности реализации этих состояний также сопоставимы при условии, что время ожидания достаточно для установления равновесия.

Вклад конфигураций поры с пептидами на ее экваторе в общую статистическую сумму системы значительно ниже, чем вклад свободных АМП и изолированной чисто липидной поры [34]. Это связано с тем, что площадь кромки поры, доступная для АМП, существенно меньше, чем площадь бислоя по крайней мере для малых концентраций АМП, когда взаимодействием пептидов друг с другом можно пренебречь. Таким образом, при малых концентрациях АМП порация мембраны будет редко наблюдаемым событием, хотя и формально возможным. В случае, когда поверхностная концентрация АМП достаточно велика (площадь, затронутая индуцированными АМП деформациями, сравнима с полной площадью мембраны), статистический вес АМП, распо-

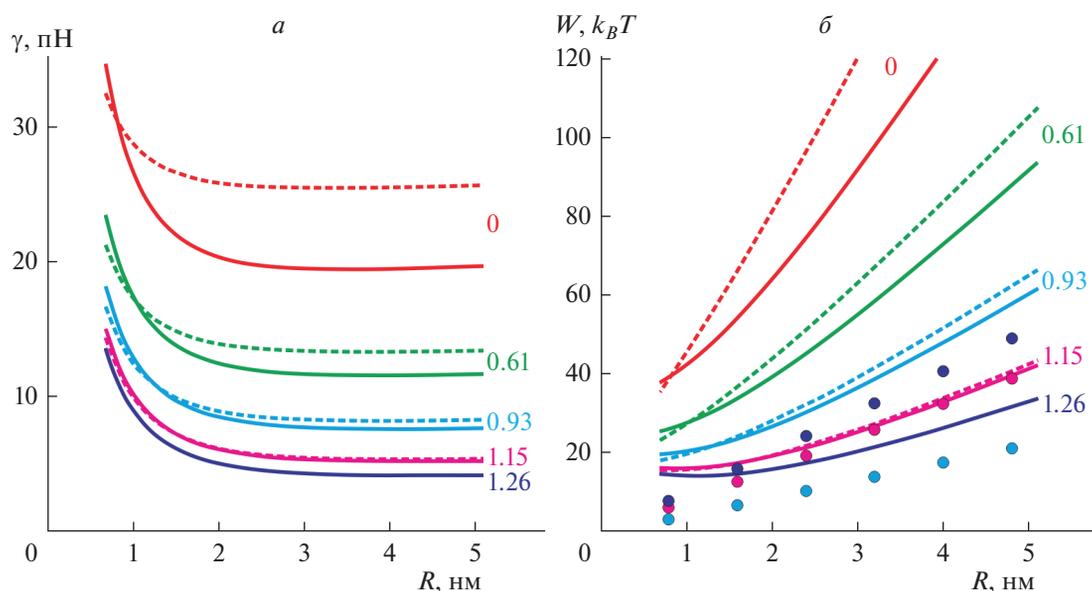


Рис. 3. Влияние амфипатических пептидов на энергию кромки поры. Сплошные кривые соответствуют случаю неглубоко встроенных пептидов, штриховые кривые — случаю глубоко встроенных пептидов. *a* — Зависимость линейного натяжения кромки поры с пептидами, расположенными на ее экваторе, от радиуса. Пары кривых (сплошная + штриховая), сверху вниз: $\Delta n = \Delta n_0 = 0$, $\Delta L = 0$ (красные кривые); $\Delta n = \Delta n_0 = 0.61$, $\Delta L = 0.7$ нм (зеленые кривые); $\Delta n = \Delta n_0 = 0.93$, $\Delta L = 1.0$ нм (синие кривые); $\Delta n = \Delta n_0 = 1.15$, $\Delta L = 1.2$ нм (фиолетовые кривые); нижняя (темно-синяя) кривая — $\Delta n = \Delta n_0 = 1.26$, $\Delta L = 1.3$ нм. *б* — Зависимость энергии кромки поры от радиуса. Цвета пар кривых аналогичны их цветам на панели *a*. Точками показана энергия деформаций плоского бислоя, индуцированных неглубоко встроенными пептидами. Цвет точек соответствует цвету кривых. При радиусе поры $R = 0.8$ нм на экваторе размещается одна пептидная молекула, при $R = 1.6$ нм — две молекулы, при $R = 2.4$ нм — три молекулы и т.д. Значения скачка директора указаны у каждой пары кривых.

женных на кромке поры, будет сравним с вкладом АМП, расположенных вдали от поры. Это связано с тем, что при увеличении концентрации молекул АМП и учете их взаимодействия друг с другом доступная площадь для каждой пептидной молекулы будет существенно меньше площади бислоя, — аналогично тому, как изменяется доступное для частицы число конфигураций при переходе из газовой фазы в жидкую. При измеряемой в экспериментах пороговой поверхностной концентрации АМП практически вся мембрана покрыта деформациями, индуцированными пептидными молекулами [15]; именно при этой поверхностной концентрации в мембране начинают интенсивно образовываться поры.

Отметим также, что для большего числа пептидов, встроенных в мембрану на глубину радиуса α -спирали ($\Delta L = D = 1.3$ нм, $\Delta n = \Delta n_0 = 1.26$), энергия кромки поры с пептидами на ее экваторе оказывается значительно ниже, чем энергия деформаций, индуцированных пептидами в плоском бислое (рис. 3б, темно-синяя кривая и темно-синие точки). Соответственно, в этом случае оказывается энергетически выгоден рост радиуса поры за счет встраивания в ее кромку дополнительных пептидов из плоской части бислоя. Для пептидов со скачком граничного ди-

ректора $\Delta n = \Delta n_0 = 1.15$ ($\Delta L = 1.2$ нм) энергия кромки с пептидами на ее экваторе практически совпадает с энергией деформаций, индуцируемых пептидами в плоском бислое, при числе пептидов $N \geq 4$ (рис. 3б фиолетовая кривая и фиолетовые точки). При меньшем скачке граничного директора (например, $\Delta n = \Delta n_0 = 0.93$, рис. 3б, синяя кривая и синие точки) энергия кромки поры с пептидами на экваторе значительно выше, чем энергия деформаций плоского бислоя, и образование поры оказывается заведомо энергетически невыгодным независимо от высот энергетических барьеров между состояниями поры с пептидами на экваторе и пептидами, встроенными в плоский бислой.

Таким образом, формирование сквозной поры амфипатическими пептидами возможно лишь в узком диапазоне физико-химических и геометрических характеристик пептидов. Молекулы АМП должны относительно глубоко встраиваться в липидный монослой, чтобы обеспечить достаточную ширину встроенной части, ΔL . Этому же должны способствовать более объемные аминокислоты в составе пептида. В то же время встраивание не должно быть слишком глубоким, чтобы обеспечить максимальный скачок граничного директора Δn_0 . Это означает, что площади гидрофильной и

гидрофобной частей боковой поверхности α -спирали пептидной молекулы должны быть приблизительно одинаковыми. Помимо ширины встроеной области пептида, скачок граничного директора зависит от толщины гидрофобной части монослоя, согласно (10), (25); т.е. один и тот же АМП будет индуцировать разный скачок директора в монослоях различной толщины, и, соответственно, эффективность порации мембран также будет различной. Эта особенность может быть использована для повышения избирательности действия АМП. Бактериальные мембраны содержат большое количество ненасыщенных липидов (ДОФХ, диолеилфосфатидилглицерин, диолеилфосфатидилэтанолламин и т.д.) и не содержат стеролы. В составе плазматических мембран эукариотических клеток значительную долю липидов составляют насыщенные липиды и холестерин [42]. Холестерин конденсирует насыщенные углеводородные цепи липидов, что приводит к увеличению толщины монослоя [43]. Различные толщин липидных бислоев, обогащенного ненасыщенными липидами и обогащенного насыщенными липидами и холестерином, может достигать 1.5 нм [43]. Таким образом, в принципе, возможно подобрать структуру АМП так, чтобы он эффективно формировал поры в более тонких бактериальных мембранах и не образовывал поры в мембранах эукариотических клеток. Кроме того, холестерин повышает жесткость мембран, содержащих насыщенные липиды [44]. Это должно приводить к увеличению как энергии деформаций, индуцированных одиночными пептидами, так и энергии кромки поры. Равновесное распределение АМП между мембраной и водной фазой определяется, в том числе, и энергией деформаций, индуцированных пептидом в липидном бислое: чем выше эта энергия, тем меньшей будет равновесная поверхностная концентрация пептида на мембране. Возможно подобрать структуру и концентрацию АМП таким образом, чтобы на мембранах эукариотических клеток не достигалась пороговая поверхностная концентрация интенсивного порообразования. В работе [2] было показано, что при объемной концентрации АМП 1 мкМ поверхностная концентрация АМП на мембране, не содержащей холестерин, оказывается в 3 раза выше, чем на мембране, в составе которой присутствует 40 мол. % холестерина. Это различие поверхностной концентрации может быть достигнуто за счет разности энергии деформаций, индуцируемых в мембране одиночными молекулами АМП, всего в $1 k_B T$. При объемной концентрации АМП 1 мкМ в работе [2] наблюдалась интенсивная порация мембран липосом, не содержащих холестерин, в то время как в мембранах эритроцитов поры не образовывались.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Источники финансирования. Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 22-24-00834).

Соответствие принципам этики. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Rawicz W., Smith B.A., McIntosh T.J., Simon S.A., Evans E. 2008. Elasticity, strength, and water permeability of bilayers that contain raft microdomain-forming lipids. *Biophys. J.* **94**, 4725–4736.
2. Pérez-Peinado C., Dias S.A., Domingues M.M., Benfield A.H., Freire J.M., Rádis-Baptista G., Gaspar D., Castanho M.A.R.B., Craik D.J., Henriques S.T., Veiga A.S., Andreu D. 2018. Mechanisms of bacterial membrane permeabilization by crotalidin (Ctn) and its fragment Ctn (15–34), antimicrobial peptides from rattlesnake venom. *J. Biol. Chem.* **293**, 1536–1549.
3. Hasan M., Karal M.A.S., Levadny V., Yamazaki M. 2018. Mechanism of initial stage of pore formation induced by antimicrobial peptide magainin 2. *Langmuir* **34**, 3349–3362.
4. Parvez F., Alam J.M., Dohra H., Yamazaki M. 2018. Elementary processes of antimicrobial peptide PGLa-induced pore formation in lipid bilayers. *Biochim. Biophys. Acta.* **1860**, 2262–2271.
5. Pan J., Tieleman D.P., Nagle J.F., Kučerka N., Tristram-Nagle S. 2009. Alamethicin in lipid bilayers: Combined use of X-ray scattering and MD simulations. *Biochim. Biophys. Acta.* **1788**, 1387–1397.
6. Tamba Y., Ariyama H., Levadny V., Yamazaki M. 2010. Kinetic pathway of antimicrobial peptide magainin 2-induced pore formation in lipid membranes. *J. Phys. Chem. B.* **114**, 12018–12026.
7. Park S.C., Kim J.Y., Shin S.O., Jeong C.Y., Kim M.H., Shin S.Y., Cheong G.-W., Park Y., Hahm K.S. 2006. Investigation of toroidal pore and oligomerization by melittin using transmission electron microscopy. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **343**, 222–228.
8. Campelo F., McMahon H.T., Kozlov M.M. 2008. The hydrophobic insertion mechanism of membrane curvature generation by proteins. *Biophys. J.* **95**, 2325–2339.
9. Santo K.P., Berkowitz M.L. 2012. Difference between magainin-2 and melittin assemblies in phosphatidylcholine bilayers: results from coarse-grained simulations. *J. Phys. Chem. B.* **116**, 3021–3030.
10. Zemel A., Ben-Shaul A., May S. 2005. Perturbation of a lipid membrane by amphipathic peptides and its role in pore formation. *Eur. Biophys. J.* **34**, 230–242.
11. Huang H.W., Chen F.Y., Lee M.T. 2004. Molecular mechanism of peptide-induced pores in membranes. *Phys. Rev. Lett.* **92**, 198304.
12. Huang H.W. 2006. Molecular mechanism of antimicrobial peptides: The origin of cooperativity. *Biochim. Biophys. Acta.* **1758**, 1292–1302.

13. Huang H.W. 2000. Action of antimicrobial peptides: Two-state model. *Biochemistry*. **39**, 8347–8352.
14. Manzini M.C., Perez K.R., Riske K.A., Bozelli Jr.J.C., Santos T.L., da Silva M.A., Saraiva G.K.V., Politi M.J., Valente A.P., Almeida F.C.L., Chaimovich H., Rodrigues M.A., Bemquerer M.P., Schreier S., Cuccovia I.M. 2014. Peptide: Lipid ratio and membrane surface charge determine the mechanism of action of the antimicrobial peptide BP100. Conformational and functional studies. *Biochim. Biophys. Acta*. **1838**, 1985–1999.
15. Kondrashov O.V., Galimzyanov T.R., Jiménez-Munigua I., Batishchev O.V., Akimov S.A. 2019. Membrane-mediated interaction of amphipathic peptides can be described by a one-dimensional approach. *Phys. Rev. E*. **99**, 022401.
16. Kozlovsky Y., Zimmerberg J., Kozlov M.M. 2004. Orientation and interaction of oblique cylindrical inclusions embedded in a lipid monolayer: A theoretical model for viral fusion peptides. *Biophys. J.* **87**, 999–1012.
17. Kondrashov O.V., Galimzyanov T.R., Pavlov K.V., Kotova E.A., Antonenko Y.N., Akimov S.A. 2018. Membrane elastic deformations modulate gramicidin A transbilayer dimerization and lateral clustering. *Biophys. J.* **115**, 478–493.
18. Fuller N., Rand R.P. 2001. The influence of lysolipids on the spontaneous curvature and bending elasticity of phospholipid membranes. *Biophys. J.* **81**, 243–254.
19. Akimov S.A., Volynsky P.E., Galimzyanov T.R., Kuzmin P.I., Pavlov K.V., Batishchev O.V. 2017. Pore formation in lipid membrane I: Continuous reversible trajectory from intact bilayer through hydrophobic defect to transversal pore. *Sci. Rep.* **7**, 12152.
20. Awasthi N., Hub J.S. 2016. Simulations of pore formation in lipid membranes: Reaction coordinates, convergence, hysteresis, and finite-size effects. *J. Chem. Theor. Comput.* **12**, 3261–3269.
21. Wohlert J., den Otter W.K., Edholm O., Briels W.J. 2006. Free energy of a trans-membrane pore calculated from atomistic molecular dynamics simulations. *J. Chem. Phys.* **124**, 154905.
22. Дерягин Б.В., Гутоп Ю.В. 1962. Теория разрушения (прорыва) свободных пленок. *Коллоидн. журн.* **24**, 431–437.
23. Evans E., Heinrich V., Ludwig F., Rawicz W. 2003. Dynamic tension spectroscopy and strength of biomembranes. *Biophys. J.* **85**, 2342–2350.
24. Karal M.A.S., Levadnyy V., Yamazaki M. 2016. Analysis of constant tension-induced rupture of lipid membranes using activation energy. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **18**, 13487–13495.
25. Evans E., Smith B.A. 2011. Kinetics of hole nucleation in biomembrane rupture. *New J. Phys.* **13**, 095010.
26. Abidor I.G., Arakelyan V.B., Chernomordik L.V., Chizmadzhev Y.A., Pastushenko V.F., Tarasevich M.P. 1979. Electric breakdown of bilayer lipid membranes: I. The main experimental facts and their qualitative discussion. *J. Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem.* **104**, 37–52.
27. Weaver J.C., Chizmadzhev Y.A. 1996. Theory of electroporation: A review. *Bioelectrochem. Bioenerg.* **41**, 135–160.
28. Portet T., Dimova R. 2010. A new method for measuring edge tensions and stability of lipid bilayers: Effect of membrane composition. *Biophys. J.* **99**, 3264–3273.
29. Melikov K.C., Frolov V.A., Shcherbakov A., Samsonov A.V., Chizmadzhev Y.A., Chernomordik L.V. 2001. Voltage-induced nonconductive pre-pores and metastable single pores in unmodified planar lipid bilayer. *Biophys. J.* **80**, 1829–1836.
30. Basañez G., Shinnar A.E., Zimmerberg J. 2002. Interaction of hagfish cathelicidin antimicrobial peptides with model lipid membranes. *FEBS Lett.* **532**, 115–120.
31. Qian S., Wang W., Yang L., Huang H.W. 2008. Structure of transmembrane pore induced by Bax-derived peptide: Evidence for lipidic pores. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **105**, 17379–17383.
32. Yang L., Harroun T.A., Weiss T.M., Ding L., Huang H.W. 2001. Barrel-stave model or toroidal model? A case study on melittin pores. *Biophys. J.* **81**, 1475–1485.
33. Chen F.Y., Lee M.T., Huang H.W. 2003. Evidence for membrane thinning effect as the mechanism for peptide-induced pore formation. *Biophys. J.* **84**, 3751–3758.
34. Kondrashov O.V., Akimov S.A. 2022. Regulation of antimicrobial peptide activity via tuning deformation fields by membrane-deforming inclusions. *Int. J. Mol. Sci.* **23**, 326.
35. Hamm M., Kozlov M.M. 2000. Elastic energy of tilt and bending of fluid membranes. *Eur. Phys. J. E.* **3**, 323–335.
36. Galimzyanov T.R., Molotkovsky R.J., Cohen F.S., Pohl P., Akimov S.A. 2016. Galimzyanov et al. Reply. *Phys. Rev. Lett.* **116**, 079802.
37. Leikin S., Kozlov M.M., Fuller N.L., Rand R.P. 1996. Measured effects of diacylglycerol on structural and elastic properties of phospholipid membranes. *Biophys. J.* **71**, 2623–2632.
38. Nagle J.F., Wilkinson D.A. 1978. Lecithin bilayers. Density measurement and molecular interactions. *Biophys. J.* **23**, 159–175.
39. Rawicz W., Olbrich K.C., McIntosh T., Needham D., Evans E. 2000. Effect of chain length and unsaturation on elasticity of lipid bilayers. *Biophys. J.* **79**, 328–339.
40. Hu M., de Jong D.H., Marrink S.J., Deserno M. 2013. Gaussian curvature elasticity determined from global shape transformations and local stress distributions: a comparative study using the MARTINI model. *Faraday Discuss.* **161**, 365–382.
41. Kollmitzer B., Heftberger P., Rappolt M., Pabst G. 2013. Monolayer spontaneous curvature of raft-forming membrane lipids. *Soft Matter*. **9**, 10877–10884.
42. Ingólfsson H.I., Melo M.N., Van Eerden F.J., Arnarez C., Lopez C.A., Wassenaar T.A., Periole X., de Vries A.H., Tieleman D.P., Marrink S.J. 2014. Lipid organization of the plasma membrane. *J. Am. Chem. Soc.* **136**, 14554–14559.

43. García-Sáez A.J., Chiantia S., Schwille P. 2007. Effect of line tension on the lateral organization of lipid membranes. *J. Biol. Chem.* **282**, 33537–33544.
44. Evans E., Rawicz W. 1990. Entropy-driven tension and bending elasticity in condensed-fluid membranes. *Phys. Rev. Lett.* **64**, 2094.

The Possibility of Pore Formation in Lipid Membranes by Several Molecules of Amphipathic Peptides

O. V. Kondrashov¹, S. A. Akimov¹, *

¹*Frumkin Institute of Physical Chemistry and Electrochemistry,
Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia*

**e-mail: akimov_sergey@mail.ru*

Antimicrobial activity of some amphipathic peptides is associated with the formation of through pores in bacterial membranes. Antimicrobial peptides (AMPs) specifically bind to the plasma membrane by incorporating their hydrophobic regions into the outer lipid monolayer. The membrane is inevitably deformed. Many AMPs form so-called toroidal pores, the edge of which is partially lined with peptide molecules. The edge of the pore is characterized by significant deformations. In this work, we calculated the energy of the pore edge, with amphipathic peptides located on the pore equator, as well as the energy of deformations induced by AMP in a planar lipid bilayer. It was shown that for certain physicochemical and geometric characteristics of the AMP molecule the energy of the pore, on the equator of which two or more peptide molecules are located, can be lower than the energy of deformations induced in the planar bilayer by the same number of peptide molecules. Thus, two AMP molecules can, in principle, form a through pore in the membrane, although this is possible only in a fairly narrow range of physicochemical and geometric characteristics of the peptides.

Keywords: antimicrobial peptide, theory of elasticity, pore, line tension, amphipathic peptide

МОНИТОРИНГ АГОНИСТ-ИНДУЦИРОВАННОЙ АКТИВНОСТИ PI3-КИНАЗЫ В КЛЕТКАХ НЕК-293 С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ГЕНЕТИЧЕСКИ КОДИРУЕМОГО СЕНСОРА

© 2022 г. П. Д. Котова^а, *, О. А. Рогачевская^а, Н. В. Кабанова^а, С. С. Колесников^а

^аИнститут биофизики клетки РАН, ФИЦ ПНЦБИ РАН, Пущино, Московская обл., 142290 Россия

*e-mail: p.d.kotova@gmail.com

Поступила в редакцию 04.04.2022 г.

После доработки 23.05.2022 г.

Принята к публикации 24.05.2022 г.

PI3-зависимый выброс депонированного Ca^{2+} вносит ключевой вклад в агонист-индуцированную мобилизацию Ca^{2+} в невозбудимых клетках. Эффективность фосфоинозитидного каскада, сопрягающего поверхностные рецепторы с мобилизацией внутриклеточного Ca^{2+} , модулируется рядом киназ, включая фосфатидилинозитол-3-киназу (PI3K), которая, фосфорилируя PIP2, продуцирует фосфолипид PIP3. Ранее нами было показано, что ингибитор PI3K вортманнин не влияет на способность клеток НЕК-293 генерировать Ca^{2+} -ответы на ацетилхолин, тогда как ингибитор PI3K другой химической природы PI828 полностью подавляет эти ответы. Разная эффективность вортманнина и PI828 могла быть связана с тем, что в клетках НЕК-293 функционируют изоформы PI3K, существенно более чувствительные к PI828. Для внесения ясности в этот вопрос нами была получена моноклональная линия клеток НЕК-293, экспрессирующих два генетически кодируемых сенсора, а именно сенсор цитозольного Ca^{2+} (R-GECO1) и сенсор PIP3 PH(Akt)-Venus. Клетки этой линии позволяли одновременно регистрировать Ca^{2+} -сигналы и проводить мониторинг активности PI3K. Характерной особенностью R-GECO1 является увеличение интенсивности флуоресценции при повышении концентрации цитозольного Ca^{2+} , в то время как PH(Akt)-Venus при PI3K-зависимой генерации PIP3 в плазмалемме перераспределяется из цитозоля в мембрану клетки. Оказалось, что ацетилхолин инициировал кратковременное повышение внутриклеточного Ca^{2+} , но не влиял на распределение PIP3-сенсора в цитоплазме клеток. Последнее указывало на отсутствие ацетилхолин-зависимой активации PI3K. В то же время инсулин, стимулирующий PI3K при участии тирозин-киназных рецепторов, вызывал перераспределение молекул PH(Akt)-Venus из цитозоля в мембрану клеток, что демонстрировало инсулин-индуцированную активность PI3K. Этот феномен не наблюдался в присутствии вортманнина или PI828, что свидетельствовало об эффективном подавлении активности PI3K этими соединениями. Таким образом, стимулируя внутриклеточную Ca^{2+} -сигнализацию в клетках НЕК-293, ацетилхолин не инициировал активацию PI3K-пути, который, следовательно, не был вовлечен в холинергическую трансдукцию. Хотя полученные данные свидетельствуют об эффективном ингибировании активности PI3K вортманнином и PI828, последний подавлял ацетилхолин-индуцируемую Ca^{2+} -сигнализацию неспецифически, т.е. воздействуя не на PI3K, а на какую-то иную клеточную мишень.

Ключевые слова: мускариновые рецепторы, внутриклеточная Ca^{2+} -сигнализация, PI3-киназа, генетически кодируемый сенсор PIP3, ацетилхолин

DOI: 10.31857/S0233475522050097

ВВЕДЕНИЕ

Мобилизация внутриклеточного Ca^{2+} является одной из наиболее универсальных форм реакции клеток на внешние возмущения, включая стимуляцию первичными медиаторами, обеспечивающими аутокринную и паракринную регуляцию клеточных функций. Хотя в генерации Ca^{2+} -сигналов принимает участие множество внутриклеточных сигнальных и транспортных систем, ключевой вклад в агонист-индуцированную мобилизацию Ca^{2+} в невозбудимых клетках вносит PI3-зависимый выброс депонированного Ca^{2+} [1, 2].

Фосфоинозитидный каскад может сопрягать разнообразные поверхностные рецепторы, включая гептаспиральные трансмембранные рецепторы (G-protein coupled receptor, GPCR-рецепторы), с мобилизацией внутриклеточного Ca^{2+} . Его эффективность модулируется при участии различных сигнальных систем, включая каскад фосфатидилинозитол-3-киназы класса I (PI3K) – фермента, катализирующего образование сигнального/регуляторного фосфолипида PIP3 (фосфатидилинозитол-3,4,5-трисфосфата) [3–5]. Так, например, показано, что PI3K/Akt-путь является важным регулятором Ca^{2+} -сигнализации и сократитель-

ной активности кардиомиоцитов [6, 7]. Участие P13K/Akt-каскада в регуляции выброса Ca^{2+} из Ca^{2+} -депо было продемонстрировано для клеток MDCK [8], COS-7 [9] и RINm5F [10]. Его роль в Ca^{2+} -сигнализации может быть обусловлена P13K/Akt-зависимой регуляцией активности P3-рецепторов и/или фосфолипазы C [10–12].

Ранее при исследовании роли P13K в генерации Ca^{2+} -ответов на GPCR-агонисты, нами был использован ряд ингибиторов P13K, включая вортманнин и PI828, различающиеся по химической структуре. Было установлено, что вортманнин не влиял на способность клеток НЕК-293 генерировать Ca^{2+} -ответы на ацетилхолин, в то время как PI828 полностью подавлял эти ответы [13]. Причины столь разной эффективности PI828 и вортманнина оставались неясными. Одна из возможных причин состояла в том, что в сравнении с вортманнином PI828 существенно более эффективно блокировал изоформы P13K, функционирующие в клетках НЕК-293. В любом случае эти данные свидетельствовали о том, что механизм действия вортманнина и PI828, которые считаются ингибиторами P13K, в действительности не так очевиден. Следовательно, результаты, полученные при исследовании роли P13K в механизме генерации Ca^{2+} -сигналов с использованием данных соединений, нельзя интерпретировать однозначно, что делает целесообразным проведение одновременного мониторинга внутриклеточного Ca^{2+} и активности P13K. Данная работа посвящена отработке такой методологии и ее использованию для установления роли P13K в генерации Ca^{2+} -ответов клеток НЕК-293 на ацетилхолин.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Культура клеток. Клетки линии НЕК-293 (Российская коллекция клеточных культур позвоночных) и модифицированные клетки НЕК-293/R-GECO1/PH(Akt)-Venus культивировали в среде DMEM с высоким содержанием глюкозы (Invitrogen) с добавлением 10% эмбриональной бычьей сыворотки (HyClone), 100 мг/мл гентамицина (Sigma-Aldrich), 2 мМ глутамин (Sigma-Aldrich) (ростовая среда) во влажной атмосфере с 5% содержанием CO_2 в воздухе при 37°C. Для культивирования моноклональных линий в ростовую среду добавляли 300 мкг/мл селективного антибиотика геницитина G418 (Invitrogen).

Трансфекция клеток. Клетки НЕК-293 трансфицировали плазмидными векторами CMV-R-GECO1 (Addgene plasmid #32444) и PH(Akt)-Venus (Addgene plasmid #85223) одновременно, используя набор для трансфекции FuGENE 6 (Promega) по протоколу, оптимизированному согласно рекомендациям производителя. Накануне трансфекции клетки рассеивали из расчета $(2-4) \times 10^5$ клеток в 1 лунку 12-луночного планшета в 1 мл ростовой

среды. Для трансфекции в лунку к среде с растущими клеткам добавляли трансфекционную смесь, содержащую 100 мкл среды OptiMEM (Gibco), 4 мкл FuGENE 6 (Promega), 0.5 мкг CMV-R-GECO1 и 0.5 мкг PH(Akt)-Venus. Через 24 ч среду заменяли на свежую ростовую.

Получение моноклональных линий НЕК-293/R-GECO1/PH(Akt)-Venus. Популяцию трансфицированных клеток селектировали в ростовой среде с добавлением 700 мкг/мл G-418 (Invitrogen) в течение 2–3 недель. Из полученной после селекции популяции с помощью клеточного сортера FACSaria SORP (Beckton Dickinson) отбирали клетки, обладающие флуоресценцией, соответствующей экспрессии обоих белков интереса: флуоресценцию R-GECO1 возбуждали при длине волны 561 нм, эмиссию регистрировали в области 610 ± 10 нм, флуоресценцию PH(Akt)-Venus возбуждали при длине волны 488 нм, эмиссию регистрировали в области 515 ± 10 нм. Клетки, обладающие наиболее яркой флуоресценцией обоих сенсоров, помещали по одной в лунку 96-луночного планшета, содержащую 150 мкл ростовой среды с повышенным до 15% содержанием сыворотки, и культивировали, наращивая таким образом моноклональные линии. Клетки каждой полученной моноклональной линии тестировали физиологически, а именно, работоспособность полученных клеток оценивали по ответам сенсоров R-GECO1 и PH(Akt)-Venus на стимуляцию ацетилхолином и инсулином соответственно. В результате проведенного тестирования была отобрана лучшая моноклональная линия клеток НЕК-293/R-GECO1/PH(Akt)-Venus.

Мониторинг внутриклеточных Ca^{2+} и PIP3. Перед экспериментом клетки НЕК-293/R-GECO1/PH(Akt)-Venus культивировали в фотометрических камерах в течение 24 ч в ростовой среде в CO_2 -инкубаторе. В процессе эксперимента клетки находились во внеклеточном растворе, содержащем (мМ): 130 NaCl, 5 KCl, 2 $CaCl_2$, 1 $MgCl_2$, 10 HEPES, pH 7.4, 10 глюкозы (все соли и буфер произведены Sigma-Aldrich). Фотометрические эксперименты проводили с использованием инвертированного флуоресцентного микроскопа Axiovert 200 (Zeiss), оборудованного объективом Plan NeoFluar 20x/0.75, цифровой sCMOS камерой Zyla 4.2P (Andor Technology), металлогалогенным источником света АМН-200-F6S (Andor Technology) и спиннинг-диск для конфокальной микроскопии Revolution DSD2 (Andor Technology). Флуоресценцию R-GECO1 и PH(Akt)-Venus возбуждали поочередно при длинах волн 560 ± 20 и 500 ± 10 нм соответственно, эмиссию регистрировали в областях 630 ± 37 и 535 ± 15 нм соответственно. Количественный фотометрический анализ изображений осуществляли с использованием программы NIS Elements (Nikon).

Аппликацию всех соединений, использовавшихся в описанных ниже экспериментах, проводили путем полной замены раствора в фотомет-

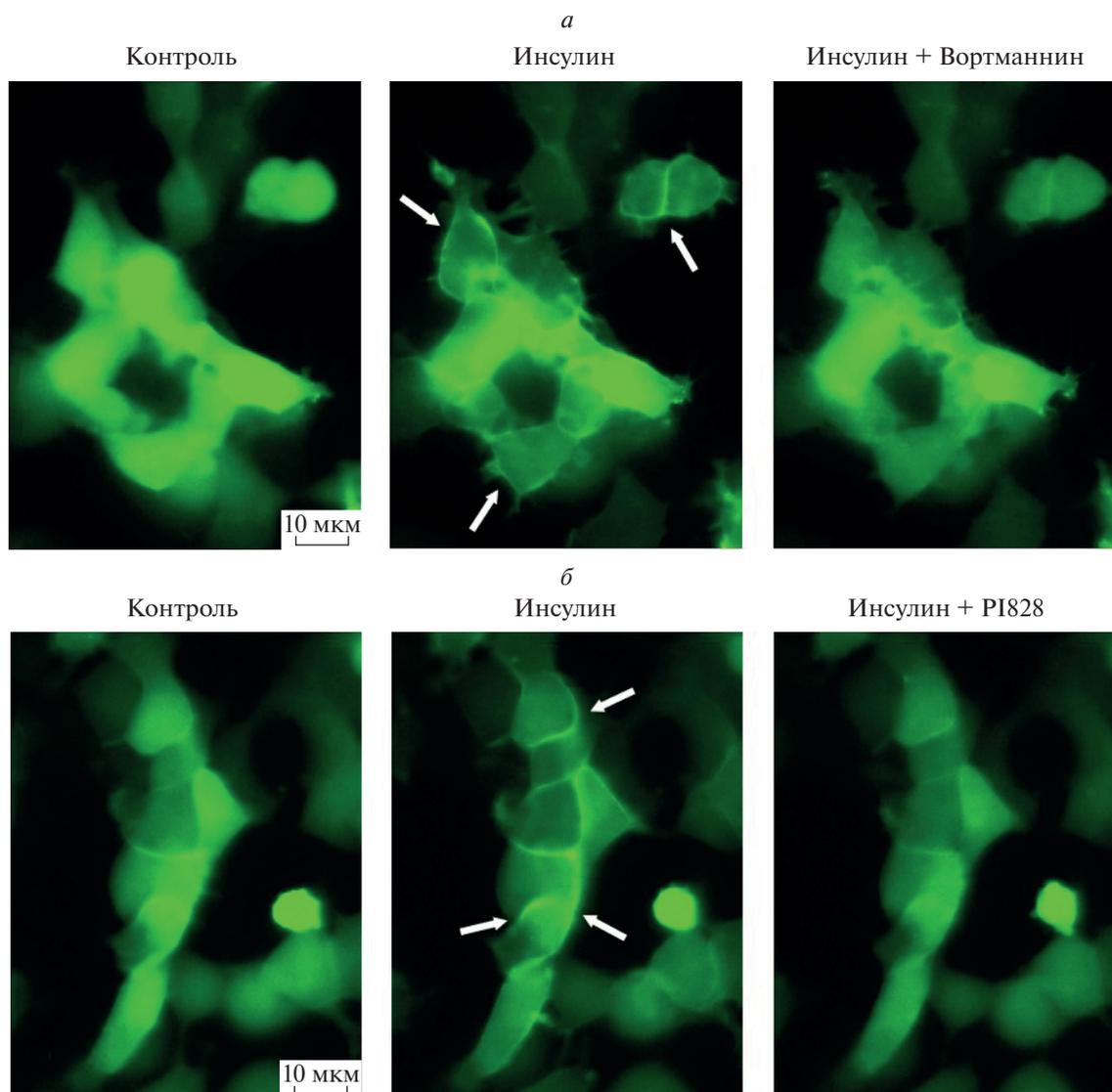


Рис. 1. Мониторинг инсулин-индуцированной активности PI3K с помощью сенсора PH(Akt)-Venus. *a, б* – Репрезентативные последовательные изображения клеток HEK-293/R-GECO1/PH(Akt)-Venus, полученные непосредственно перед (левые панели) и через 5 мин после (средние панели) начала стимуляции 100 нМ инсулина. Падение флуоресценции тела клетки и появление различных полосообразных флуоресцентных зон (указаны стрелками на средних панелях) свидетельствовали об индуцированном инсулином перераспределении сенсора PH(Akt)-Venus из цитозоля к мембране клеток. На правых панелях представлены изображения клеток, полученные в присутствии 10 мкМ вортманнина (*a*) и 30 мкМ PI828 (*б*), которые были добавлены в раствор через 5 мин после инсулина. Локализованный у мембраны после стимуляции инсулином сенсор PH(Akt)-Venus в присутствии ингибиторов PI3K возвращался в цитозоль. Флуоресцентные изображения клеток (*a, б*) получены с помощью SDCM-микроскопии.

рической камере с помощью системы перфузии. В работе использовали ацетилхолин, инсулин, вортманнин и PI828 производства Tocris Bioscience.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Мониторинг активности PI3K проводили в клетках моноклональной линии HEK-293/R-GECO1/PH(Akt)-Venus, экспрессирующих сенсор цитозольного Ca^{2+} R-GECO1 и сенсор PI3K PH(Akt)-Venus, принципы функционирования ко-

торых различаются. Характерной особенностью сенсора R-GECO1 является градуальное увеличение интенсивности флуоресценции при повышении концентрации цитозольного Ca^{2+} [14]. В покое, когда уровень PI3K в плазмалемме низок, сенсор PH(Akt)-Venus локализован преимущественно в цитозоле, но при PI3K-зависимой генерации PI3K он перераспределяется из цитозоля к мембране клетки [15]. Этот феномен можно наблюдать при регистрации флуоресценции PH(Akt)-Venus на оптическом срезе клетки, в связи с этим

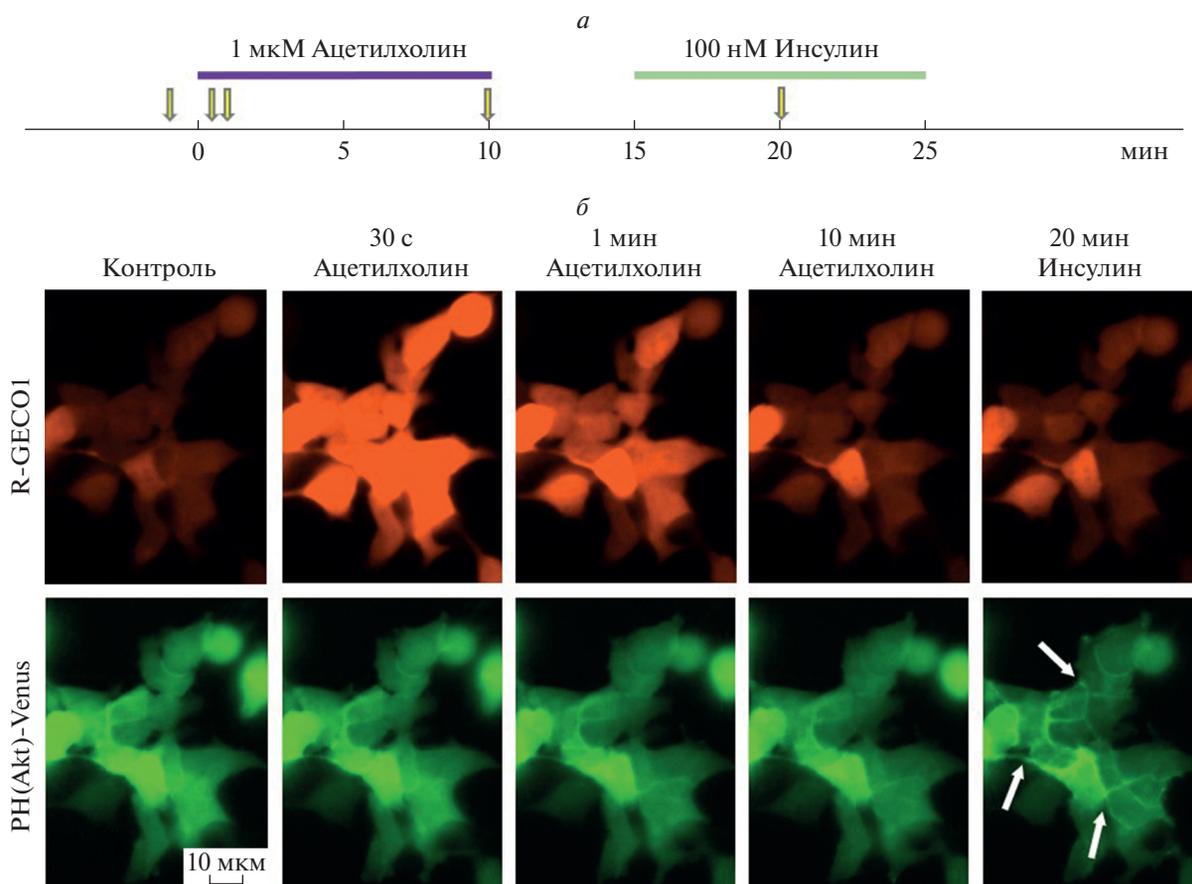


Рис. 2. P13К не вовлечена в сигнальные процессы, стимулируемые ацетилхолином. *a* – Схема протокола эксперимента; моменты и продолжительность аппликаций веществ обозначены горизонтальными линиями выше экспериментальной кривой; моменты получения изображений указаны стрелками; *b* – репрезентативные последовательные изображения клеток НЕК-293/R-GECO1/PH(Akt)-Venus, полученные в контроле (за 30 с до стимуляции ацетилхолином) и после их стимуляции 1 мкМ ацетилхолина и 100 нМ инсулина. На верхней и нижней панелях представлены сигналы от Ca²⁺-сенсора R-GECO1 и PIP3-сенсора PH(Akt)-Venus соответственно. Как видно, аппликация ацетилхолина (1 мкМ) инициировала кратковременное увеличение интенсивности флуоресценции R-GECO1, что свидетельствовало о повышении концентрации цитозольного Ca²⁺. При этом пространственное распределение флуоресценции PH(Akt)-Venus не менялось, что указывает на отсутствие ацетилхолин-зависимой активации P13К. Стимуляция инсулином (100 нМ) не влияла на флуоресценцию R-GECO1, т.е. не затрагивала внутриклеточный Ca²⁺, но приводила к аккумуляции PH(Akt)-Venus у плазмалеммы клеток (указано стрелками), свидетельствуя об активации P13К.

в данной работе использовали SDCM-микроскопию (spinning disk confocal microscopy).

Оказалось, что при стимуляции клеток НЕК-293/R-GECO1/PH(Akt)-Venus инсулином, запускающим P13К-сигнализацию посредством активации тирозин-киназных рецепторов [16], регулярно наблюдалось перераспределение флуоресценции сенсора PH(Akt)-Venus из цитозоля к плазматической мембране клетки, причем этот эффект отменялся в присутствии вортманнина или PI828 (рис. 1). Эти данные свидетельствовали о том, что инсулин действительно стимулировал активность P13К в исследовавшихся клетках, а вортманнин и PI828 эффективно ингибировали

P13К. Для выявления роли P13К в генерации агонист-индуцированных Ca²⁺-сигналов клетки НЕК-293/R-GECO1/PH(Akt)-Venus последовательно стимулировали ацетилхолином и инсулином (схема эксперимента представлена на рис. 2*a*). Хотя для стимуляции Ca²⁺-сигнализации было достаточно аппликации ацетилхолина длительностью 1 мин, P13К-сигнализация является более медленным процессом [17], и поэтому клетки инкубировали в присутствии ацетилхолина в течение 10 мин. При таком протоколе клетки массово генерировали кратковременные Ca²⁺-ответы в течение первой минуты после начала стимуляции, хотя затем некоторые клетки могли генерировать

повторные Ca^{2+} -сигналы (рис. 2б, R-GECO1). При этом изменений в пространственном распределении флуоресценции сенсора PIP3 PH(Akt)-Venus, которое в контроле было равномерным, в присутствии ацетилхолина зарегистрировано не было (рис. 2б, PH(Akt)-Venus). В то же время при последующей стимуляции клеток инсулином наблюдалась иная реакция. Оказалось, что инсулин не вызывал детектируемого изменения уровня внутриклеточного Ca^{2+} по отношению к покою, но инициировал аккумуляцию PH(Akt)-Venus у плазматической мембраны клеток, свидетельствуя о PI3K-зависимой генерации PIP3 (рис. 2б).

Таким образом, полученные данные наглядно демонстрируют, что, стимулируя Ca^{2+} -сигнализацию, ацетилхолин не инициирует существенную активацию PI3K-пути в клетках НЕК-293. Поэтому PI3K не может быть вовлечена в трансдукцию ацетилхолина в клетках НЕК-293. Как следствие, хотя результаты работы свидетельствуют об эффективном ингибировании PI3K вортманнином и PI828, последний не мог подавлять Ca^{2+} -ответы на ацетилхолин, воздействуя на PI3K, но действовал на какую-то иную клеточную мишень. Ее идентификация представляет собой задачу для последующих исследований.

Авторы благодарят Д.М. Поташникову за помощь в проведении работ по сортировке клеток на клеточном сортере FACSAria SORP в рамках Программы развития МГУ.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Источники финансирования. Работа выполнена при поддержке гранта РФФ № 19-75-10068.

Соответствие принципам этики. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Clapham D. 2007. Calcium signaling. *Cell*. **131**, 1047–1058.
- Berridge M.J. 2016. The inositol trisphosphate/calcium signaling pathway in health and disease. *Physiol. Rev.* **96**, 1261–1296.
- Vanhaesebroeck B., Guillermet-Guibert J., Graupera M., Bilanges B. 2010. The emerging mechanisms of isoform-specific PI3K signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **11**, 329–341.
- Jean S., Kiger A.A. 2014. Classes of phosphoinositide 3-kinases at a glance. *J. Cell Sci.* **127**, 923–928.
- Parys J.B., Vervliet T. 2020. New insights in the IP3 receptor and its regulation. *Adv. Exp. Med. Biol.* **1131**, 243–270.
- Graves B.M., Simerly T., Li C., Williams D.L., Wondergem R. 2012. Phosphoinositide-3-kinase/akt – dependent signaling is required for maintenance of $[\text{Ca}^{2+}]_i$, I_{Ca} , and Ca^{2+} transients in HL-1 cardiomyocytes. *J. Biomed. Sci.* **19**, 59.
- Ghigo A., Laffargue M., Li M., Hirsch E. 2017. PI3K and calcium signaling in cardiovascular disease. *Circ. Res.* **121**, 282–292.
- Santoso N.G., Cebotaru L., Guggino W.B. 2011. Polycystin-1, 2, and STIM1 interact with IP3R to modulate ER Ca^{2+} release through the PI3K/Akt pathway. *Cell. Physiol. Biochem.* **27**, 715–726.
- Marchi S., Marinello M., Bononi A., Bonora M., Giorgi C., Rimessi A., Pinton P. 2012. Selective modulation of subtype III IP3R by Akt regulates ER Ca^{2+} release and apoptosis. *Cell Death Dis.* **3**, e304.
- Fregeau M.O., Rergimbald-Dumas Y., Guillemette G. 2011. Positive regulation of inositol 1,4,5-trisphosphate-induced Ca^{2+} release by mammalian target of rapamycin (mTOR) in RINm5F cells. *J. Cell. Biochem.* **112**, 723–733.
- Szabo T., Vanderheyden V., Parys J.B., De Smedt H., Rietdorf K., Kotelevets L., Chastre E., Khan F., Landegren U., Söderberg O., Bootman M.D., Roderick H.L. 2008. Phosphorylation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors by protein kinase B/Akt inhibits Ca^{2+} release and apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **105**, 2427–2432.
- Zhang Y., Kwon S.H., Vogel W.K., Filtz T.M. 2009. PI(3,4,5)P3 potentiates phospholipase C- β activity. *J. Recept. Signal Transduct. Res.* **29**, 52–62.
- Дымова Е.А., Рогачевская О.А., Воронова Е.А., Котова П.Д. 2021. PI828 подавляет Ca^{2+} -сигнализацию, инициируемую аминергическими агонистами, по механизму, независимому от ингибирования PI3-киназы. *Биол. мембраны.* **38** (5), 388–392.
- Zhao Y., Araki S., Wu J., Teramoto T., Chang Y.-F., Nakano M., Abdelfattah A.S., Fujiwara M., Ishihara T., Nagai T., Campbell R.E. 2011. An expanded palette of genetically encoded Ca^{2+} indicators. *Science.* **333** (6051), 1888–1891.
- O'Neill P.R., Gautam N. 2014. Subcellular optogenetic inhibition of G proteins generates signaling gradients and cell migration. *Mol. Biol. Cell.* **25** (15), 2305–2314.
- Hopkins B.D., Goncalves M.D., Cantley L.C. 2020. Insulin-PI3K signalling: An evolutionarily insulated metabolic driver of cancer. *Nat. Rev. Endocrinol.* **16** (5), 276–283.
- Backer J.M., Schroeder G.G., Kahn C.R., Myers M.G. Jr., Wilden P.A., Cahill D.A., White M.F. 1992. Insulin stimulation of phosphatidylinositol 3-kinase activity maps to insulin receptor regions required for endogenous substrate phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **267** (2), 1367–1374.

Monitoring Agonist-Induced Activity of PI3-Kinase in HEK-293 with a Genetically Encoded Sensor

P. D. Kotova¹, *, O. A. Rogachevskaja¹, N. V. Kabanova¹, S. S. Kolesnikov¹

¹*Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Sciences,
FRC PSCBR RAS, Pushchino, Moscow oblast, 142290 Russia*

**e-mail: p.d.kotova@gmail.com*

In non-excitabile cells, IP₃-driven Ca²⁺ release plays a pivotal role in agonist-induced Ca²⁺ signaling. The efficiency of the phosphoinositide cascade, which couples diverse cell surface receptors to Ca²⁺ mobilization, is modulated by a number of kinases, including phosphoinositide 3-kinase (PI3K) that phosphorylates PIP₂ to generate the phospholipid PIP₃. We have previously shown that the PI3K inhibitor wortmannin does not affect acetylcholine-induced Ca²⁺ signaling in HEK-293 cells, while PI828, a PI3K inhibitor of distinct chemical nature, completely suppressed cellular responses to the agonist. As a possible reason for the different effectivity of wortmannin and PI828, PI3K isoforms functioning in HEK-293 could be much more sensitive to PI828. To clarify this issue, we generated a monoclonal line of HEK-293 cell, which expresses two genetically encoded sensors, namely, the cytosolic Ca²⁺ sensor R-GECO1 and the PIP₃ sensor PH(Akt)-Venus. The cells of this line allowed for simultaneous monitoring of Ca²⁺ signals and PI3K activity. While R-GECO1 fluorescence is directly stimulated by Ca²⁺ binding, generation of PIP₃ by PI3K initiates the translocation of PH(Akt)-Venus from the cytosol to the plasmalemma. It turned out that acetylcholine initiated a transient increase in the intracellular Ca²⁺ but did not affect the distribution of the PIP₃ sensor in the cell cytosol. This indicated that acetylcholine did not stimulate PI3K activity. At the same time, insulin, which stimulates PI3K through tyrosine kinase receptors, caused the cytosol/plasmalemma translocation of PH(Akt)-Venus, thus demonstrating insulin-induced PI3K activity. This insulin-evoked translocation of PH(Akt)-Venus was canceled by wortmannin and PI828, suggesting that the inhibition of PI3K activity by these compounds was rather effective. Thus, being capable of stimulating intracellular Ca²⁺ signaling in HEK-293 cells, acetylcholine did not stimulate the PI3K pathway, which, therefore, was not involved in cholinergic transduction. Although the inhibition of PI3K by wortmannin and PI828 was undoubtable, the results of the present work suggest that PI828 suppressed acetylcholine-induced Ca²⁺ signaling nonspecifically, that is, not involving PI3K, but acting on some other cellular target.

Keywords: muscarinic receptors, intracellular Ca²⁺ signaling, PI3-kinase, genetically encoded PIP₃ sensor, acetylcholine

УДК 577.352

СЛИЯНИЕ МЕМБРАН ПЕРОКСИСОМЫ И ЛИПИДНОЙ КАПЛИ: РАСШИРЕНИЕ π -ОБРАЗНОЙ СТРУКТУРЫ

© 2022 г. Р. Ю. Молотковский^а, *, П. И. Кузьмин^а^аИнститут физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина РАН, Москва, 119071 Россия

*e-mail: rodion.molotkovskiy@gmail.com

Поступила в редакцию 26.04.2022 г.

После доработки 14.05.2022 г.

Принята к публикации 17.05.2022 г.

Классическая теория слияния рассматривает слияние бислойных мембран как объединение материала самих мембран и окруженных ими водных объемов. Было показано, что слияние мембран сопровождается значительной деформацией липидных монослоев. Оптимальная траектория процесса проходит через несколько промежуточных структур, характеризующихся локальными минимумами свободной энергии системы; минимумы разделены энергетическими барьерами. Ключевыми интермедиатами слияния являются стелк, в котором контактирующие монослои мембран уже слились, а дистальные монослои — еще нет, и диафрагма полуслияния — структура с протяженным липидным бислоем, образованным двумя дистальными монослоями сливающихся мембран, располагающимся в центре между радиально сместившимися слившимися контактными монослоями. В настоящей работе с позиций классической теории изучалось слияние бислойной мембраны и липидного монослоя, находящегося на границе раздела вода—триолеин. Была рассмотрена промежуточная π -образная структура, образующаяся в результате слияния монослоя липидной капли и бислоя пероксисомы, и проанализирована зависимость ее энергии от геометрических параметров и упругих характеристик системы. В частности, было показано, что π -образная структура схожа с диафрагмой полуслияния классической теории слияния бислойных мембран — увеличение радиальных размеров обеих структур становится более энергетически выгодным при уменьшении спонтанной кривизны монослоев мембраны. Этот результат согласуется с имеющимися экспериментальными данными по слиянию липидных капель с пероксисомами.

Ключевые слова: липидная мембрана, теория упругости, слияние мембран, липидная капля, пероксисома, спонтанная кривизна

DOI: 10.31857/S0233475522050103

ВВЕДЕНИЕ

Клетки являются открытыми неравновесными системами. Для нормальной жизнедеятельности им необходимо поддерживать градиенты химических и электрохимических потенциалов различных веществ между цитоплазмой и внеклеточной средой, а также на мембранах различных внутриклеточных органелл. В процессе клеточной жизнедеятельности органеллы, а значит и ограничивающие их липидные мембраны, постоянно сливаются и делятся. Слияние мембран также играет важнейшую роль во многих биологических процессах, таких как экзоцитоз, оплодотворение, секреция, синаптическая передача и т.д. [1]. Под слиянием понимается объединение материала самих мембран и окруженных ими водных объемов; барьерная функция мембраны при этом не должна быть нарушена. Экспериментальные данные, накопленные к началу 1980-х годов, также говорили о том, что слияние мембран не может быть

осуществлено просто путем разрыва липидных бислоев и последующего замыкания их в новой топологии [2]. Так, при сближении мембран на небольшое расстояние порядка 1–2 нм между ними наблюдалось сильное отталкивание, препятствовавшее плотному контакту на больших площадях [3, 4]. Кроме того, имевшиеся данные указывали на локальную дестабилизацию мембран в процессе их слияния [5, 6]. Обобщение экспериментальных данных позволило группе ученых из ИЭЛАН под руководством Ю.А. Чизмаджева сформулировать концепцию, согласно которой слияние происходит в несколько этапов через локальные нестационарные контакты между взаимодействующими мембранами и приводит к их структурной реорганизации, осуществляемой путем деформации мембран [7–10].

Согласно разработанной концепции, локальный контакт между мембранами приводил к образованию стелка — структуры в форме песочных

часов, в которой контактирующие монослои мембран уже слились, а дистальные монослои — еще нет. Считалось, что именно образование stalka является стадией, лимитирующей скорость процесса слияния мембран, поэтому к этой стадии было привлечено повышенное внимание. В ранних исследованиях stalk был гипотетическим интермедиатом, однако в дальнейшем были получены многочисленные экспериментальные и молекулярно-динамические свидетельства в пользу его существования [11–14]. Расширение stalka приводило к образованию диафрагмы полуслияния — структуры с протяженным бислоем, образованным дистальными монослоями мембран, расположенным в центре между радиально разошедшимися слившимися контактными монослоями [15]. В дальнейшем в диафрагме полуслияния образовывалась сквозная пора, в результате чего диафрагма разрушалась, и слияние завершалось образованием поры слияния [16]. Теоретические представления о структурах слияния развивались и уточнялись. Так, при участии Ю.А. Чизмадзе была разработана теория, учитывающая деформационные моды, связанные с внутренней структурой мембран [17, 18]. Это позволило уточнить структуру интермедиатов слияния, в частности stalka, и более корректно вычислить энергию, необходимую для их образования [15, 18]. Выяснилось, что вероятность слияния сильно зависит от так называемой спонтанной кривизны, характеризующей равновесную форму свободного монослоя, сформированного из липидов данного сорта [10]. Было показано, что в случае положительной спонтанной кривизны контактных монослоев и/или отрицательной спонтанной кривизны дистальных монослоев слияние ингибируется, в то время как в случае отрицательной спонтанной кривизны контактных монослоев и/или положительной спонтанной кривизны дистальных монослоев процесс слияния ускоряется.

Прогресс, достигнутый в моделировании слияния модельных мембран, позволил обобщить имеющуюся теорию на более сложные процессы, в частности, на белок-опосредованное слияние мембран оболочечных вирусов с клеточными мембранами [19–21]. Экспериментальные и теоретические исследования, проводившиеся группой Ю.А. Чизмадзе, получили свое развитие в многочисленных работах сотрудников лаборатории биолетрохимии ИЭЛАН и позднее ИФХЭ РАН, которые ведутся и в настоящее время [22–26].

В природе существуют уникальные органеллы, имеющие монослойную, а не бислоюную липидную оболочку — так называемые липидные капли, используемые для запасаения нейтральных жиров, таких как триолеин. Фосфолипиды монослойной оболочки выступают в роли поверхностно-активных веществ и предотвращают коалесценцию (слияние) в эмульсии жировых капель. Иссле-

дования, проведенные в последнее десятилетие, показали, что липидные капли активно взаимодействуют с другими органеллами в клетке [27, 28]. В некоторых случаях плотный контакт липидной капли и органеллы может приводить к слиянию монослоя липидной капли с бислоюной мембраной органеллы по механизму, аналогичному классической stalkерной модели [29]. В частности, этот механизм реализуется при взаимодействии липидной капли с пероксисомой — органеллой, отвечающей за окисление длинных жирных кислот [30]. На настоящий момент данный процесс изучен достаточно слабо, однако результаты работы [31] позволяют сделать некоторые выводы о структуре интермедиатов слияния. Данные этой работы показывают, что слияние приводит к образованию π -образной структуры, в которой монослой липидной капли и внешний монослой пероксисомы слились, а внутренний монослой пероксисомы находится в просвете образовавшейся структуры, отделяя жирнокислотное внутреннее содержимое липидной капли от водного содержимого пероксисомы. Описанные π -образные структуры имеют размер порядка 200 нм, что позволяет регистрировать их методом атомно-силовой микроскопии. Согласно предложенной в работе гипотезе, они являются результатом расширения “stalkообразной” структуры, образующейся в начале процесса слияния. Экспериментальные данные не оставляют сомнений в существовании подобных π -образных структур; помимо цитированной работы имеется ряд других исследований, прямо или косвенно подтверждающих наличие прямого контакта мембран пероксисомы и липидной капли в клетках дрожжей и некоторых растительных клетках [32–34]. В то же время механизм возникновения и динамика расширения таких структур до сих пор практически не изучены. В частности, до сих пор неизвестно, опосредуется ли образование π -образных структур белками, или этот процесс может происходить в их отсутствие. Кроме того, не исследован вопрос о влиянии липидного состава липидной капли на вероятность возникновения данных структур. Следует отметить, что состав оболочки липидной капли является чрезвычайно важным параметром. Оболочка состоит в основном из двух видов липидов — фосфатидилхолинов (PC) и фосфатидилэтаноламинов (PE) [35]. Соотношение PC/PE влияет на эффективность слияния липидных капель [36]; мы полагаем, что это обусловлено спонтанной кривизной липидной смеси.

В настоящей работе теоретически рассматривается процесс слияния липидной капли с пероксисомой, начиная со стадии после начального объединения контактных монослоев. Мы рассчитали энергию π -образной структуры в зависимости от упругих характеристик мембраны и размеров липидной капли, что позволило исследовать влия-

ние этих параметров на изучаемый процесс, и в частности, ответить на вопрос будет ли структура самопроизвольно расширяться в радиальном направлении. Для расчетов использовалась теория упругости жидких кристаллов, адаптированная к липидным мембранам. Данный метод, разработанный сотрудниками лаборатории под руководством Ю.А. Чизмаджева, был ранее успешно применен для описания множества важнейших процессов, связанных с липидными мембранами, таких как липид-опосредованное взаимодействие белков [37–40], образование и латеральное взаимодействие доменов жидкой упорядоченной фазы [41–45], формирование сквозных пор [46–50] и деление мембран в процессе эндоцитоза [51–54]. Суть метода состоит в минимизации функционала упругой энергии липидной системы, что позволяет получить равновесную форму мембраны при вариации ее упругих и геометрических характеристик и построить зависимость энергетического параметра от характеризующего ее параметра. Сотрудниками лаборатории метод был улучшен и адаптирован для решения все более усложняющихся задач. Так, нами был использован метод спуска энергии по градиенту, позволяющий проводить численную минимизацию энергии с учетом ее нелинейной функциональной зависимости от параметров [46, 47]. Эффективным также оказалось разбиение сильно деформированной мембраны на несколько частей, в каждой из которых деформации можно считать малыми [48]. Сам функционал также был изменен для обеспечения минимизации энергии несимметричной мембраны [55], а также для рассмотрения деформаций мембраны на малых масштабах, сравнимых с толщиной мембраны [56]. Более подробно эволюция моделей слияния мембран, а также их применение в экспериментах и взаимосвязь с данными молекулярно-динамического моделирования описаны в различных обзорах, например, в работе [57].

ПОСТАНОВКА И РЕШЕНИЕ ЗАДАЧИ

π -образная структура. В данной работе изучается энергетика расширения π -образной структуры без рассмотрения деталей ее изначального образования. Монослой будем рассматривать, как сплошную упругую среду, подверженную деформациям поперечного изгиба и наклона. Размер области слияния мал по сравнению с размерами органелл, т.е. последние можно рассматривать как резервуар, с которым система находится в равновесии и который задает латеральное натяжение монослоев σ . Энергия системы полностью определяется деформациями монослоев и их натяжением. Энергию деформаций мембраны будем рассчитывать в рамках теории Хамма–Козлова [17]. Состояние деформированного участка липидного

монослоя определяется векторным полем единичных векторов \mathbf{n} , называемых директорами, которые характеризуют среднюю ориентацию липидных молекул. Поле директоров задается на специфической поверхности, называемой нейтральной, которая проходит внутри монослоя параллельно его границе с водой в области сочленения полярных головок с гидрофобными цепями липидов. На этой поверхности деформации поперечного изгиба и латерального растяжения/сжатия энергетически независимы [17, 58]. Форма нейтральной поверхности характеризуется векторным полем ее единичных нормалей \mathbf{N} . Деформации будем считать малыми и вычислять энергию в квадратичном приближении. Деформация поперечного изгиба характеризуется дивергенцией директора вдоль нейтральной поверхности, $\text{div}(\mathbf{n})$. Деформация наклона характеризуется вектором наклона, который для малых деформаций имеет вид: $\mathbf{t} = \mathbf{n} - \mathbf{N}$ [17]. Энергия деформации W участка монослоя площади A может быть записана в виде [17, 43]:

$$W = \int_A \left\{ \frac{B}{2} (\text{div} \mathbf{n} + J_s)^2 - \frac{B}{2} J_s^2 + \frac{K}{2} \mathbf{t}^2 + \sigma \right\} dS - \sigma A_0, \quad (1)$$

где B и K – упругие модули изгиба и наклона соответственно, J_s – спонтанная кривизна монослоя, dS – элемент площади поверхности, A_0 – площадь монослоя в недеформированном состоянии. Полная энергия системы W_{tot} является суммой энергий всех деформированных участков; она отсчитывается от энергии W_0 начального состояния, в котором мембраны еще не слились и представляют собой практически плоский бислой у пероксисомы и сферический монослой у липидной капли (рис. 1, красная мембрана).

Определим сначала энергию начального состояния W_0 . Для этого разобьем процесс образования π -образной структуры на две стадии: на первой стадии удаляются два участка монослоя в центре мембран пероксисомы и липидной капли (выделены красным на рис. 1); на второй стадии происходит вытягивание вертикального участка трубы и ее изгиб (выделена синим на рис. 1). Удобно рассмотреть промежуточное состояние (1), в котором участки мембраны, помеченные красным, уже удалены, а вертикальный участок еще не сформирован. Переход из состояния (1) в начальное состояние (0) связан с переносом липида из резервуара; энергия перехода (1) \rightarrow (0) $W_{1 \rightarrow 0}$ равна

$$W_{1 \rightarrow 0} = \sigma A_p + \sigma A_d, \quad (2)$$

где A_p и A_d – площади удаленных участков мембраны. Переход из состояния (1) в конечное состояние (2) связан с вытягиванием трубы, а затем с деформацией трубы и пероксисомальной

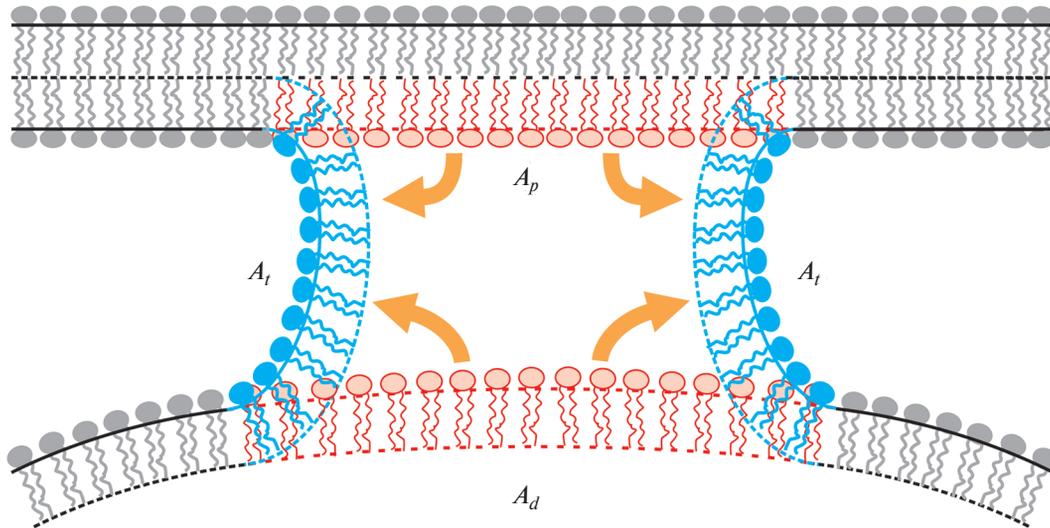


Рис. 1. Изменение состояния системы при переходе из начального в деформированное состояние. Красным показаны деформирующиеся участки мембраны в начальном состоянии, синим — участки в конечном состоянии. Внизу изображена мембрана липидной капли, наверху — мембрана пероксисомы.

мембраны. Соответствующая энергия обозначается как $W_{1 \rightarrow 2}$.

$$W_{1 \rightarrow 2} = \sigma A_t + W_{\text{elastic}}, \quad (3)$$

где W_{elastic} — полная энергия деформаций мембраны без учета натяжения, A_t — площадь вытянутой трубы. Здесь мы предполагаем, что пероксисомальная мембрана деформируется слабо, в силу чего ее площадь практически не меняется. Вычитая выражение (2) из выражения (3), получаем: $W_{\text{tot}} = W_{\text{elastic}} - W_0$, где

$$W_0 = \sigma(A_p + A_d - A_t). \quad (4)$$

Найдем теперь энергию деформаций W_{elastic} . Считаем, что рассматриваемая система обладает цилиндрической симметрией. Поскольку мембрана в целом сильно деформирована, а функционал свободной энергии записан в предположении малых деформаций, мы разбиваем мембрану на несколько частей, в каждой из которых по отдельности отклонение формы и деформаций от соответствующего состояния отсчета могут считаться малыми (рис. 2). Мы рассматриваем приблизительно вертикальный (цилиндрический) монослой, описывающий область контакта между пероксисомой и липидной каплей (выделен светло-серым на рис. 2), практически горизонтальный монослой пероксисомы, расположенный в просвете между монослоями вертикальных монослоев (выделен темно-серым на рис. 2), и почти горизонтальный бислой пероксисомы, описывающий остальную часть мембраны пероксисомы.

В каждой из областей мембрана описывается набором функций, определяющих ее состояние.

Функции, относящиеся к вертикальной части, мы обозначаем индексом v ; функции, относящиеся к горизонтальному монослою, индексом i ; функции, относящиеся к горизонтальному бислою, мы обозначаем индексом e . Мы вводим систему координат $\{O, z, r\}$ с осью Oz , направленной перпендикулярно мембране пероксисомы посередине между монослоями вертикальной части и осью Or , направленной перпендикулярно оси Oz так, что она касается нейтральной поверхности пероксисомы на бесконечности (рис. 2). В вертикальной части мембрана описывается проекцией директора на ось Oz $v(z)$, расстоянием $H_v(z)$ от оси Oz до нейтральной поверхности и поверхностью $m_v(z)$ от оси Oz до концов углеводородных хвостов липидов. В горизонтальной части бислойная мембрана описывается пятью функциями — проекциями директоров в верхнем и нижнем монослоях на ось Or ($a_e(r)$ и $b_e(r)$ соответственно), расстояниями от нейтральных поверхностей монослоев до плоскости $z = 0$ ($H_{ae}(r)$ и $H_{be}(r)$), а также разделяющей монослой поверхностью $m_e(r)$. В горизонтальной части монослоя вводится только три функции — проекция директора в верхнем монослое $a_i(r)$, расстояние $H_{ai}(r)$ и разделяющая поверхность $m_i(r)$. Для того чтобы связать между собой эти функции, мы используем условие локальной объемной несжимаемости. Это условие означает, что любой элемент монослоя сохраняет объем при любых деформациях. Данное предположение обосновывается большими значениями модулей объемного сжатия мембран [59] и по своей сути накладывает ограничение на возможные деформа-

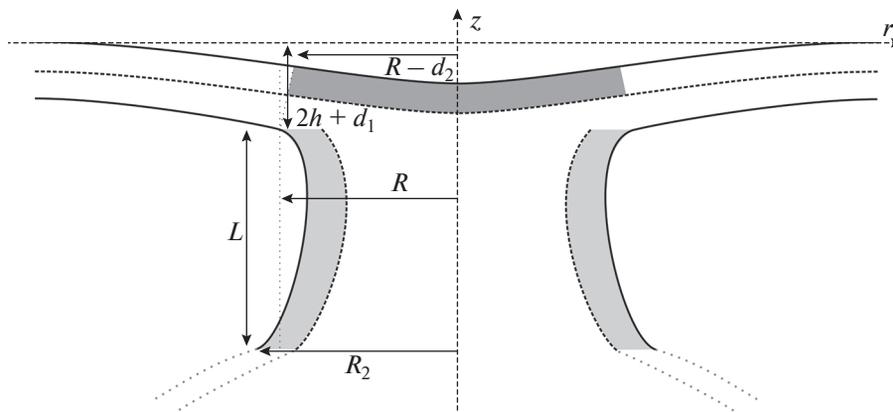


Рис. 2. Схематическое изображение модели π -образной структуры с разбиением на области интегрирования. Вертикальная часть длиной L выделена светло-серым; горизонтальный монослойный участок выделен темно-серым; горизонтальный слой пероксисомы вне монослойного участка не выделен. Радиус π -образной структуры равен R и отсчитывается до точки сшивки вертикальной и горизонтальной частей. Пунктирной линией внизу показана недеформированная часть мембраны липидной капли, аппроксимируемая сферой радиуса R_d . Радиус сшивки мембраны липидной капли с вертикальной частью равен R_2 . Предполагается цилиндрическая симметрия системы вокруг оси Oz .

ции. В предположении малости деформаций условие локальной несжимаемости имеет вид [17]:

$$h = h_0 - \frac{h_0^2}{2} \operatorname{div}(\mathbf{n}), \quad (5)$$

где h и h_0 – толщины гидрофобных частей монослоев в деформированном и недеформированном состоянии соответственно. При этом толщина h может быть выражена через введенные функции как $H - m$. Выражение (5) позволяет выразить вектор наклона \mathbf{t} только через директор \mathbf{n} и его производные. Для этого заметим, что вектор наклона $\mathbf{t} \approx \mathbf{n} - \mathbf{N}$ [17, 60], и аналогичное выражение верно и для его проекций: $t_e(r) = n_e(r) - N_e(r)$. Поэтому мы получим следующие формулы соответственно для верхнего и нижнего монослоев: $t_{ae} = a_e - H'_{ae}$, $t_{be} = b_e + H'_{be}$, где штрих означает производную по радиальной координате r . Выражая H'_{ae} и H'_{be} из уравнения (5), получаем для проекций вектора наклона следующие выражения:

$$\begin{aligned} t_{ae} &= a_e - m'_e + \frac{h_0^2}{2} \left(a_e'' + \frac{a_e'}{r} - \frac{a_e}{r^2} \right), \\ t_{be} &= b_e + m'_e + \frac{h_0^2}{2} \left(b_e'' + \frac{b_e'}{r} - \frac{b_e}{r^2} \right). \end{aligned} \quad (6)$$

Аналогичные выражения получаются и для вертикальной части [53].

Алгоритм расчета. Функционал энергии, общий вид которого представлен выражением (1), преобразуется для случаев горизонтальной и вертикальной части, затем в него подставляются выражения для проекции вектора наклона. После этого функционал энергии минимизируется, что позволяет найти энергию мембраны и ее равно-

весную форму, задаваемую функциями $H_{ae}(r)$, $H_{be}(r)$, $H_i(r)$ и $H_v(z)$. Данные функции содержат неопределенные коэффициенты, которые находятся из граничных условий, определяемых геометрией системы. Для этого вводятся геометрические параметры: радиус R , на котором происходит сшивка нейтральных поверхностей монослоев пероксисомы и трубы, длина трубы L , радиус сшивки R_2 трубы со сферой оболочки липидной капли, а также вспомогательные параметры d_1 и d_2 , описывающие место сшивки мембраны пероксисомы с трубой (рис. 2). Условия сшивки для горизонтальных частей имеют следующий вид:

$$\begin{aligned} a_i(R - d_2) &= a_e(R - d_2), \\ H_{ai}(R - d_2) &= H_{ae}(R - d_2), \\ H_{be}(R) &= -2h_0 - d_1. \end{aligned} \quad (7)$$

Для сшивки вертикальной части с монослоем пероксисомы мы используем уравнения, аналогичные приведенным ранее в работе [48]:

$$\begin{aligned} v(-2h_0 - d_1) - b_e(R) &= 1, \\ H_v(-2h_0 - d_1) &= R, \\ H_{be}(R) &= -2h_0 - d_1. \end{aligned} \quad (8)$$

Сшивка вертикальной части со сферой производится в предположении совпадения в точке сшивки направления директора сферы и ее нормали:

$$\begin{aligned} v(-2h_0 - d_1 - L) &= -\frac{\sqrt{R_d^2 - R_2^2}}{R_d}, \\ H(-2h_0 - d_1 - L) &= R_2, \end{aligned} \quad (9)$$

где R_d – радиус кривизны липидной капли. Условия сшивки (7–9) подставляются в функционал энергии, который затем минимизируется по оставшимся неопределенным коэффициентам и параметрам R_2 , L , d_1 и d_2 . Для минимизации мы используем

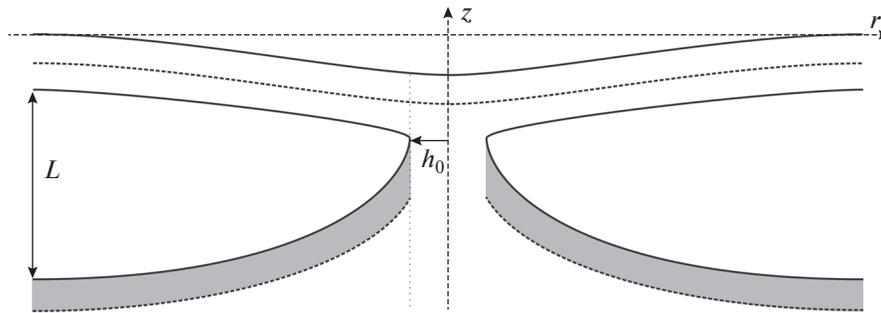


Рис. 3. Сталкообразная структура, моделирующая слияние монослоев липидной капли и пероксисомы. Расстояние между нейтральными поверхностями мембран устанавливается равным длине L вертикального участка π -образной структуры; радиус области контакта принимается равным толщине недеформированного монослоя h_0 . Светло-серым выделен деформированный монослой мембраны липидной капли.

численный метод спуска по градиенту, описанный нами ранее [46]. В итоге получаем зависимость энергии $W_{elastic}$ от радиуса π -образной структуры R . Значения площадей A_p , A_d и A_l определяются в процессе минимизации энергии и также зависят от радиуса R и от равновесных значений величин R_2 , L , d_1 и d_2 . В результате получаем зависимость энергии системы W_{tot} от R . Это позволяет оценить энергетический барьер E_B , который необходимо преодолеть для расширения π -образной структуры и то, как он будет меняться при варьировании липидного состава мембраны липидной капли, например, при добавлении диолеоилфосфатидилэтаноламина (DOPE). Изменение состава липидного монослоя моделируется как изменение спонтанной кривизны J_s в соответствии с формулой:

$$J_s = c_{DOPE} j_{DOPE} + (1 - c_{DOPE}) j_{DOPC}, \quad (10)$$

где c_{DOPE} — мольная доля DOPE в составе мембраны; j_{DOPC} и j_{DOPE} — спонтанные кривизны диолеоилфосфатидилхолина (DOPC) и DOPE соответственно.

Монослойная мембрана. Рассмотрим отдельно случай монослойной мембраны. В этом случае условие объемной несжимаемости позволяет только получить зависимость функции $m(r)$ от директора и толщины, никак не ограничивая возможные деформации. Это приводит к расщеплению деформаций изгиба и наклона, что видно из анализа функционала упругой энергии. Положим для определенности, что речь идет о верхнем монослое в горизонтальной области. Тогда функционал энергии можно записать в следующем виде:

$$w_i = 2\pi r \left(\frac{B}{2} \left(\frac{da_i}{dr} + \frac{a_i}{r} + J_s \right)^2 - \frac{B}{2} J_s^2 + \frac{K}{2} \left(a_i - \frac{dH_{ai}}{dr} \right)^2 + \sigma \left(\frac{dH_{ai}}{dr} \right)^2 \right). \quad (11)$$

Видно, что функционал (11) зависит от производной формы по радиусу H'_{ai} , а не от самой формы. Это позволяет проводить минимизацию именно по данной функции; в результате получаем функциональную зависимость между производной H'_{ai} и директором a_i : $H'_{ai} = \frac{Ka_i}{K + 2\sigma}$. Учтем, что в реальных системах натяжение мало ($\leq 1 k_B T / \text{нм}^2$, где $k_B T \approx 4 \times 10^{-21}$ Дж) по сравнению с модулем наклона ($\sim 10 k_B T / \text{нм}^2$), т.е. $\sigma \ll K$. Это означает, что

$H'_{ai} \approx a_i$, в силу чего вклад деформации наклона в энергию становится пренебрежимо малым. Таким образом, оказывается, что в монослойной мембране деформация наклона практически не реализуется.

Сталкообразная структура. В классической теории слияния показывается, что сталку соответствует локальный минимум энергии системы, а расширение сталка и его дальнейшая топологическая перестройка в предпору сопровождается увеличением энергии [18, 22, 61]. Поэтому для корректной оценки энергетического барьера E_B в нашей задаче необходимо рассмотреть сталкообразную структуру, в которой произошел контакт монослоя липидной капли с внешним монослоем мембраны пероксисомы (рис. 3).

Мы рассматриваем отдельно деформации в нижней (монослойной) и верхней (бислойной) мембранах. Нейтральная поверхность и проекция директора контактирующих монослоев на горизонтальную плоскость сшиваются в точке контакта. При этом мы допускаем разрыв поля директоров в точке сшивки, который может компенсироваться за счет проникновения свободных жиров в область монослойного контакта. Расстояние между мембранами на бесконечности считается равным равновесной длине вертикального участка L , соответствующей минимальному радиусу $R_{min} = 2$ нм π -образной структуры, полученной ранее. Радиус сталка,

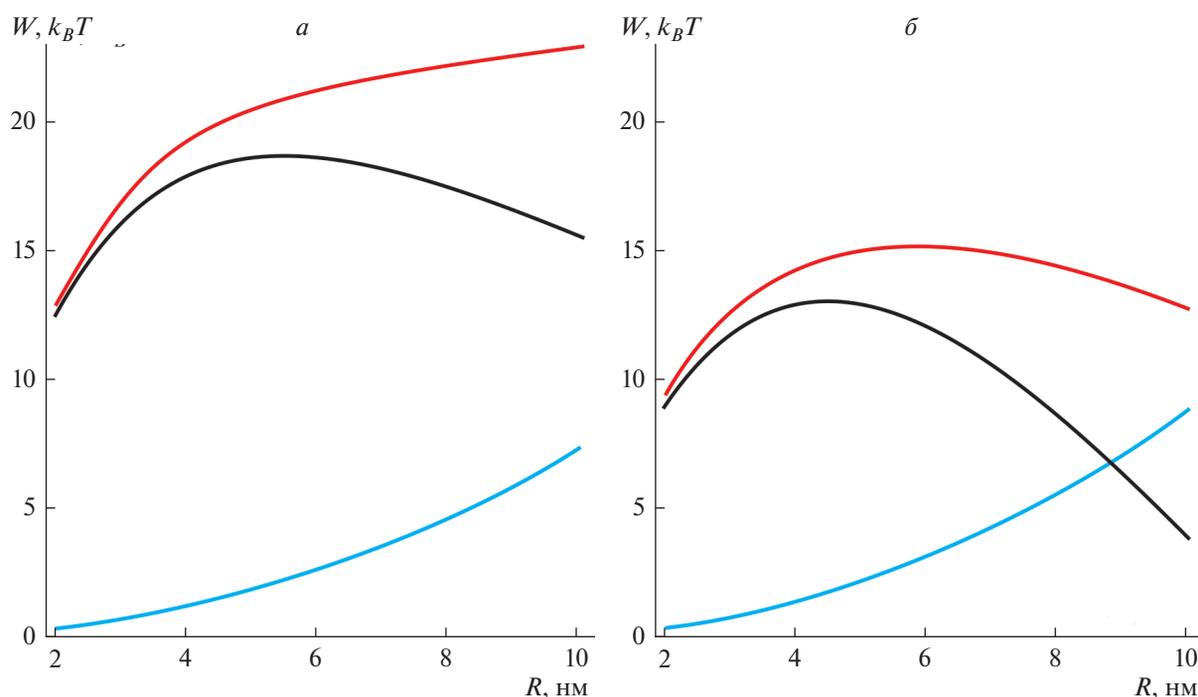


Рис. 4. Зависимость компонентов энергии π -образной структуры от ее радиуса R при разной спонтанной кривизне J_s монослоя: $a - J_s = 0$; $b - J_s = -0.05 \text{ nm}^{-1}$. Черным показаны зависимости полной энергии W_{tot} , красным – энергии деформаций W_{elastic} , синим – энергии W_0 .

т.е. радиальную координату точки контакта, считаем равным толщине невозмущенного монослоя h_0 . Спонтанную кривизну нижнего монослоя мы считаем равной спонтанной кривизне монослоя π -образной структуры, спонтанную кривизну монослоев верхней мембраны считаем равной спонтанной кривизне монослоя DOPC j_{DOPC} . Таким образом, получаем энергию системы, соответствующую радиусу $R = h_0$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Результаты расчетов представлены на графиках. Мы использовали следующие значения для материальных характеристик системы: модуль изгиба DOPC $B = 10 k_B T$ [62]; модуль наклона $K = 10 k_B T/\text{nm}^2$ [60]; толщина гидрофобного участка монослоя $h_0 = 1.3 \text{ nm}$ [50]; спонтанная кривизна DOPC $= -0.07 \text{ nm}^{-1}$ [63]; спонтанная кривизна DOPE $= -0.27 \text{ nm}^{-1}$ [63]; поверхностное натяжение мембраны $\sigma = 0.025 k_B T/\text{nm}^2$ [64]. Радиус кривизны липидной капли R_d равен 100 nm ; R_d определяет только граничные условия (9) на проекцию директора в вертикальной области, и энергия слабо зависит от его конкретного значения. Мы рассчитали зависимость полной энергии W_{tot} , а также ее компоненты W_{elastic} и W_0 от размера системы R . Типичные результаты расчетов для разных значе-

ний спонтанной кривизны приведены на рис. 4. Полученные зависимости $W_{\text{tot}}(R)$ для разных значений спонтанной кривизны J_s приведены на рис. 5. Крайняя левая точка – это энергия столкнообразной структуры при $R = h_0$, полученная в результате отдельного расчета.

Разработанная модель позволяет получить равновесную форму мембраны как π -образной, так и столкнообразной структуры. В качестве примера мы приводим на рис. 6 рассчитанную форму этих структур для $J_s = -0.95 \text{ nm}^{-1}$ и $R = 1.3$ и 4 nm соответственно.

Зависимость энергии $W_{\text{tot}}(R)$ позволяет найти барьер E_B раскрытия π -образной структуры, как разность энергий в максимуме и в начале траектории ($R = h_0$). Используя формулу (11) для спонтанной кривизны, а также данные по барьеру E_B , мы получаем зависимость E_B от доли DOPE в составе мембраны. Эта зависимость показана на рис. 7.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Классическая теория слияния в качестве следующего за столкно устойчивого интермедиата рассматривает диафрагму полуслияния [15, 16, 21]. Рассмотренная в данной работе π -образная структура представляет собой аналог диафрагмы полуслияния в случае слияния липидного моно-

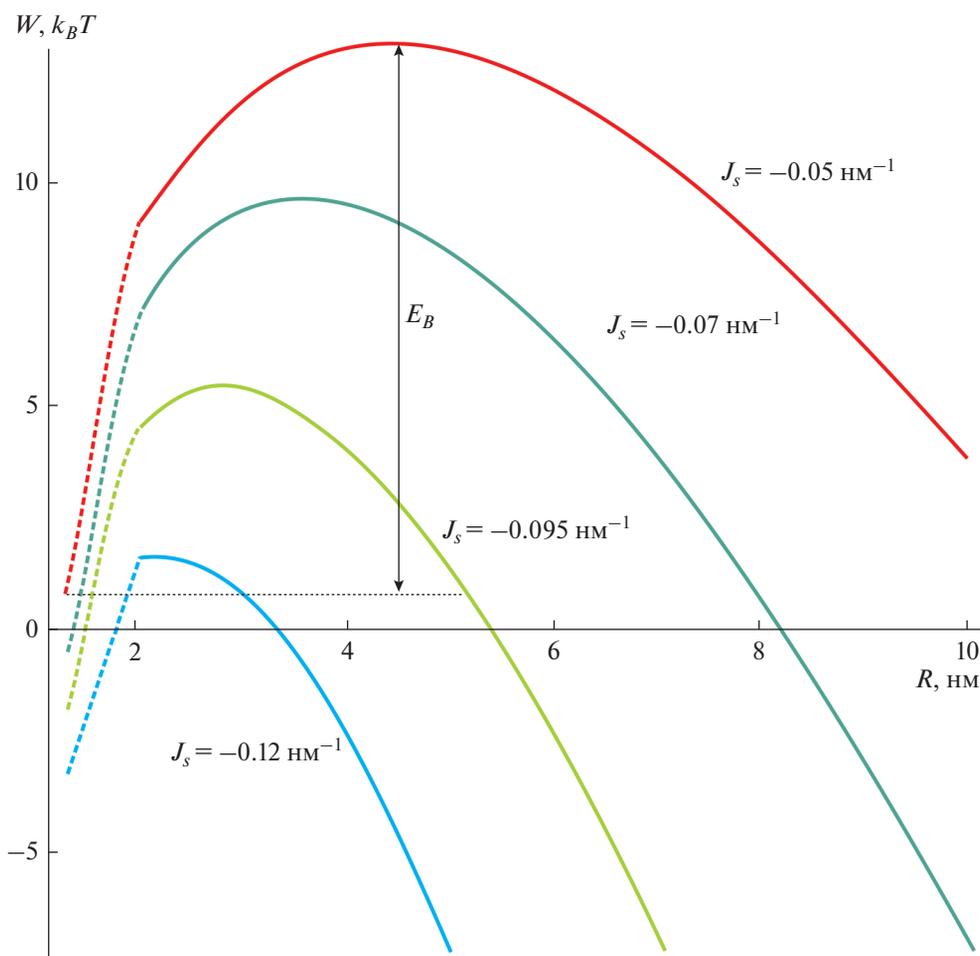


Рис. 5. Зависимости энергии W_{tot} от радиуса R π -образной структуры, дополненные энергией стальнообразной структуры, вычисленной при $R = h_0$. Зависимости W_{tot} показаны сплошными линиями, интерполяция энергии между $R = 2$ нм и $R = h_0$ показана пунктиром. В качестве параметра выбрана спонтанная кривизна мембраны; красная кривая соответствует $J_s = -0.05 \text{ нм}^{-1}$; зеленая кривая соответствует $J_s = -0.07 \text{ нм}^{-1}$; желто-зеленая кривая соответствует $J_s = -0.095 \text{ нм}^{-1}$; синяя кривая соответствует $J_s = -0.12 \text{ нм}^{-1}$. Спонтанная кривизна монослоя DOPC J_{DOPC} принята равной -0.07 нм^{-1} . Радиус липидной капли $R_d = 100 \text{ нм}$.

слоя и липидного бислоя. Полученные нами результаты позволяют сопоставить π -образную структуру и классическую диафрагму полуслияния и указывают на схожесть этих структур. В обоих случаях расширение образовавшейся структуры сопряжено с преодолением энергетического барьера, связанного с деформацией мембраны. Ключевое же отличие опосредовано асимметрией профиля деформаций, вызванной монослойностью одной из сливающихся мембран.

Расширение π -образной структуры приводит к образованию контактной области между липидной каплей и внутренним монослоем мембраны пероксисомы; предполагается, что именно через этот контакт происходит транспорт свободных жирных кислот в пероксисому [65]. Считается, что раскрытие π -образной структуры может про-

исходить без участия белков [31]. В этом случае барьер E_B на раскрытие должен по порядку величины составлять несколько единиц $k_B T$; в противном случае такое раскрытие не произойдет за физически разумное время. Наши расчеты показывают, что для этого необходимо присутствие в составе мембраны значительного количества DOPE, примерно 20% или более (рис. 7). Это примерно соответствует доле DOPE, имеющейся в липидных каплях в норме [66]. В то же время для мембраны, состоящей из чистого DOPC, барьер составляет $10 k_B T$, т.е. раскрытие маловероятно. Этот результат коррелирует с имеющимися данными по слиянию липидных капель друг с другом. Именно увеличение содержания DOPE – липида с отрицательной спонтанной кривизной – приводит к увеличению размеров липидных капель, что говорит об облег-

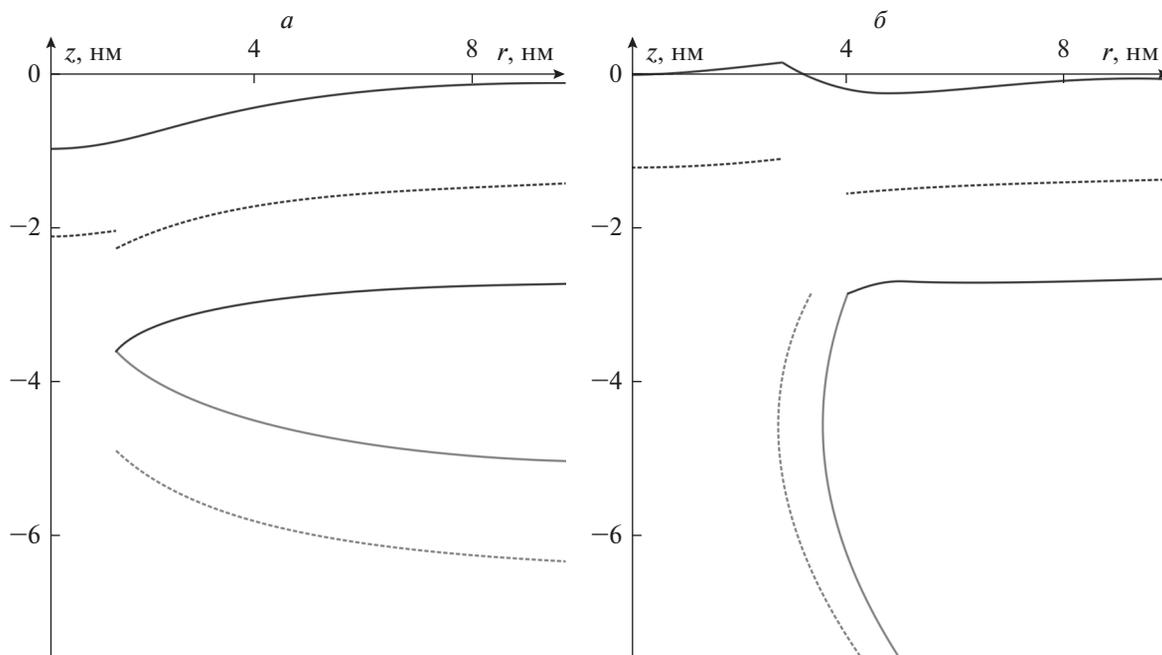


Рис. 6. Равновесная форма мембраны стalloкoобразной структуры (а) и π -образной структуры при $R = 4$ нм (б). Спонтанная кривизна всех участков мембраны, кроме бислойа стalloкoобразной структуры, равна -0.95 нм^{-1} ; спонтанная кривизна этого участка принимается равной -0.07 нм^{-1} .

чении их слияния [36]. Предполагается, что локальное повышение концентрации липидов с отрицательной спонтанной кривизной приводит к дестабилизации поверхностных слоев капель, что понижает энергетический барьер их слияния. На это же указывает увеличение вероятности безбелкового слияния капель в мутантах с отсутствием РС в поверхностном монослое [67].

Наблюдаемое понижение барьера E_B обусловлено зависимостью упругой энергии W_{elastic} от спонтанной кривизны, проиллюстрированной на рис. 4, поскольку энергия W_0 связана только с площадью мембраны и от спонтанной кривизны не зависит. Видно, что при отрицательной спонтанной кривизне облегчается расширение π -образной структуры, в то время как при нулевой спонтанной кривизне энергия π -образной структуры возрастает с ростом ее размера. Аналогичный результат был получен для случая диафрагмы полуслияния в работе [61]: расширение диафрагмы становилось возможным только при наличии во внешнем монослое мембраны липидного компонента с отрицательной спонтанной кривизной. Данную зависимость можно качественно объяснить, исходя из упрощенного анализа деформаций мембраны.

Наши расчеты показывают, что упругая составляющая энергии обусловлена в основном деформацией вертикального участка длины L (показан светло-серым на рис. 2). Это видно по рав-

новесной форме мембраны, которая показана на рис. 6: бислойная часть π -образной структуры практически не деформирована, в то время как максимально деформирована вертикальная часть. Таким

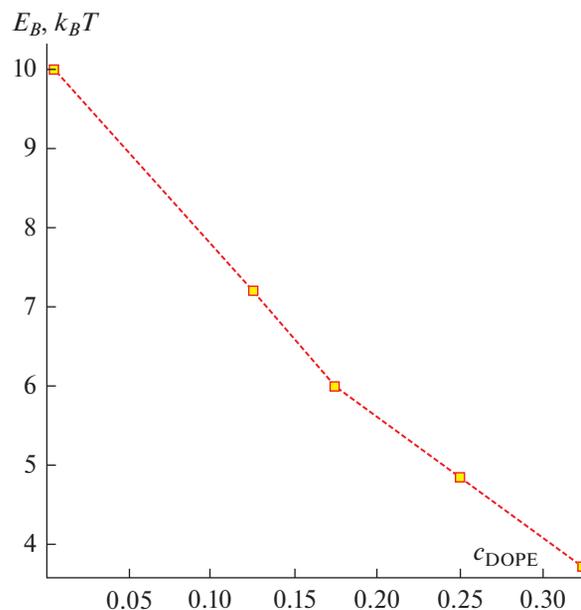


Рис. 7. Зависимость энергетического барьера E_B , который необходимо преодолеть для расширения π -образной структуры, от доли DOPE c_{DOPE} в составе мембраны липидной капли.

образом, энергию деформаций можно считать приближенно равной энергии вертикальной части мембраны. Наибольший вклад в энергию вертикальной части мы связываем с ее деформацией в области контакта с бислоем мембраной. Как видно из рис. 6, в этом месте мембрана локально сильно изогнута; в то же время остальная часть вертикального монослоя имеет полную кривизну, примерно равную нулю. Данный изгиб в области контакта обусловлен асимметрией системы: деформация вертикального монослоя, пусть и сильная, оказывается энергетически выгоднее, чем деформация горизонтального бислоя. Как было показано выше, в монослойном участке мембраны деформацией наклона можно пренебречь. Это означает, что директор мало отклоняется от нормали, что позволяет характеризовать деформации введением геометрической кривизны J согласно соотношению $\text{div}(\mathbf{n}) = \text{div}(\mathbf{N}) = -J$. Поскольку полная кривизна мембраны мало отличается от нуля, то и энергия в этой области тоже будет мала. Недалеко от области контакта с бислоем пероксисомы директор вертикальной части испытывает дополнительный скачок $\Delta n \sim 0.1$ в силу большего искривления мембраны. Этот скачок происходит на длине λ порядка 1–2 нм. В этом случае дивергенцию директора можно оценить, как

$$\text{div}(\mathbf{n}) = n' - \frac{1}{R} \approx \frac{\Delta n}{\lambda} - \frac{1}{R}. \quad (12)$$

Энергия, связанная с этим участком, оценивается нами по формуле:

$$W_{\Delta} = \pi R B \lambda \left\{ \left(\frac{\Delta n}{\lambda} - \frac{1}{R} + J_s \right)^2 - J_s^2 \right\}. \quad (13)$$

Отсюда видно, что энергия W_{elastic} имеет при больших значениях R линейную асимптотику с коэффициентом, равным $\pi B \frac{\Delta n}{\lambda} (2J_s \lambda + \Delta n)$. При соблюдении неравенства $2\lambda |J_s| > \Delta n$ этот коэффициент меняет свой знак (при отрицательной J_s), в силу чего производная энергии по радиусу R становится отрицательной. Мы видим, таким образом, что на больших радиусах при нулевой спонтанной кривизне энергия возрастает, а при отрицательной — убывает.

Еще одной особенностью задачи является практически полное отсутствие “провисания” монослоя пероксисомы в области между вертикальными монослоями (рис. 6б). Такое провисание на величину порядка 50 нм регистрировалось для раскрытых π -образных структур размерами порядка 200 нм [31]. Полученный нами результат можно было бы объяснить наличием слабого поверхностного натяжения в системе, однако дополнительное уменьшение его на два порядка не приводит к появлению провисания. Мы объясняем это упоминавшейся выше асимметрией систе-

мы: провисание мембраны в центре должно привести к деформации бислоя в области пероксисомы, окаймляющей горизонтальный монослой. Это энергетически менее выгодно, чем дополнительная деформация вертикальной части мембраны при отсутствии деформации горизонтальной части. В то же время провисание мембраны, описанное в работе [31], наблюдается на больших масштабах, порядка 100 нм, и скорее всего, объясняется поверхностными эффектами, выходящими за рамки рассматриваемой модели. Гипотетически, это может быть вызвано взаимодействием нейтральных жиров с углеводородными хвостами липидов в области контакта монослоя пероксисомы с ядром липидной капли. В том случае, если этот контакт окажется энергетически выгоднее, чем контакт липидных хвостов друг с другом, система будет стремиться увеличить площадь зоны такого контакта. Об этом, в частности, может свидетельствовать образование так называемых пексоподий — наблюдавшихся в ряде случаев тубул, направленных от места контакта в сторону центра липидных капель [31].

В процессе расчетов мы не учитывали ряд факторов, которые могут быть важны в контексте энергетики π -образной структуры. Во-первых, не учитывалось взаимодействие жирных кислот с липидами в области контакта; оно сводится к эффективному отрицательному натяжению и должно приводить к еще большему понижению энергии. К сожалению, величина этого натяжения неизвестна и принципиально может быть оценена только методами молекулярной динамики. Во-вторых, наличие двух липидных компонентов в области больших деформаций должно приводить к сложным эффектам, связанным с их латеральным перераспределением, в частности, к понижению модуля изгиба [68]. В данной работе нами не была построена полная траектория образования π -образной структуры от момента сближения сливающихся мембран до момента достижения системой глобального минимума. Мы ограничились рассмотрением системы при малых значениях радиуса R , когда размер зоны слияния много меньше размеров везикул. В этом случае поведение системы определяется в основном деформациями мембран. В то же время глобальный минимум достигается системой при больших (порядка 100 нм) радиусах; в этом случае кривизна мембраны становится незначительной, а поведение системы определяется в основном такими поверхностными явлениями, как баланс площадей монослоев и латеральное натяжение, что значительно усложняет анализ. Например, уже нельзя пренебрегать площадью зоны контакта по сравнению с площадями взаимодействующих объектов. Решение этой задачи актуально, поскольку могло бы позволить выявить факторы, влияющие на размер мембранного контакта пе-

роксисома—липидная капля и на вероятность его возникновения или исчезновения.

Авторы выражают глубокую признательность сотрудникам лаборатории биоэлектрохимии ИФХЭ РАН С.А. Акимову и Т.Р. Галимзянову за конструктивные замечания при выполнении расчетов и подготовке рукописи.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Источники финансирования. Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 22-23-00551).

Соответствие принципам этики. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Poste G., Allison A.C. 1973. Membrane fusion. *Biochim. Biophys. Acta – Rev. Biomembr.* **300**, 421–465.
2. Pinto da Silva P., Nogueira M.L. 1977. Membrane fusion during secretion. A hypothesis based on electron microscope observation of *Phytophthora Palmivora* zoospores during encystment. *J. Cell Biol.* **73**, 161–181.
3. LeNeveu D.M., Rand R.P. 1977. Measurement and modification of forces between lecithin bilayers. *Bio-phys. J.* **18**, 209–230.
4. Rand R.P. 1981. Interacting phospholipid bilayers: Measured forces and induced structural changes. *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.* **10**, 277–314.
5. Papahadjopoulos D., Poste G., Vail W.J. 1979. Studies on membrane fusion with natural and model membranes. In: *Methods in Membrane Biology*. Eds. Korn E.D. Boston, MA: Springer, p. 1–121.
6. Cullis P.R., Hope M.J. 1978. Effects of fusogenic agent on membrane structure of erythrocyte ghosts and the mechanism of membrane fusion. *Nature.* **271**, 672–674.
7. Козлов М.М., Маркин В.С. 1983. Возможный механизм слияния мембран. *Биофизика.* **28**, 242–247.
8. Markin V., Kozlov M., Borovjagin V. 1984. On the theory of membrane fusion. The stalk mechanism. *Gen. Physiol. Biophys.* **5**, 361–377.
9. Leikin S.L., Kozlov M.M., Chernomordik L.V., Markin V.S., Chizmadzhev Y.A. 1987. Membrane fusion: Overcoming of the hydration barrier and local restructuring. *J. Theor. Biol.* **129**, 411–425.
10. Chernomordik L.V., Kozlov M.M., Melikyan G.B., Abidor I.G., Markin V.S., Chizmadzhev Y.A. 1985. The shape of lipid molecules and monolayer membrane fusion. *Biochim. Biophys. Acta – Biomembr.* **812**, 643–655.
11. Chernomordik L.V., Kozlov M.M., Zimmerberg J. 1995. Lipids in biological membrane fusion. *J. Membr. Biol.* **146**, 1–14.
12. Yang L., Huang H.W. 2002. Observation of a membrane fusion intermediate structure. *Science.* **297**, 1877–1879.
13. Marrink S.J., de Vries A.H., Tieleman D.P. 2009. Lipids on the move: Simulations of membrane pores, domains, stalks and curves. *Biochim. Biophys. Acta – Biomembr.* **1788**, 149–168.
14. Aeffner S., Reusch T., Weinhausen B., Salditt T. 2012. Energetics of stalk intermediates in membrane fusion are controlled by lipid composition. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **109**, E1609–E1618.
15. Cohen F.S., Melikyan G.B. 2004. The energetics of membrane fusion from binding, through hemifusion, pore formation, and pore enlargement. *J. Membr. Biol.* **199**, 1–14.
16. Chernomordik L.V., Kozlov M.M. 2008. Mechanics of membrane fusion. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **15**, 675–683.
17. Hamm M., Kozlov M.M. 2000. Elastic energy of tilt and bending of fluid membranes. *Eur. Phys. J. E.* **3**, 323–335.
18. Kuzmin P.I., Zimmerberg J., Chizmadzhev Y.A., Cohen F.S. 2001. A quantitative model for membrane fusion based on low-energy intermediates. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **98**, 7235–7240.
19. Kozlov M.M., Chernomordik L.V. 1998. A mechanism of protein-mediated fusion: Coupling between refolding of the influenza hemagglutinin and lipid rearrangements. *Biophys. J.* **75**, 1384–1396.
20. Chernomordik L.V., Frolov V.A., Leikina E., Bronk P., Zimmerberg J. 1998. The pathway of membrane fusion catalyzed by influenza hemagglutinin: Restriction of lipids, hemifusion, and lipidic fusion pore formation. *J. Cell Biol.* **140**, 1369–1382.
21. Chizmadzhev Y.A. 2004. The mechanisms of lipid–protein rearrangements during viral infection. *Bioelectrochemistry.* **63**, 129–136.
22. Акимов С.А., Молотковский Р.Ю., Галимзянов Т.Р., Радаев А.В., Шилова Л.А., Кузьмин П.И., Батищев О.В., Воронина Г.Ф., Чизмаджев Ю.А. 2014. Модель слияния мембран: непрерывный переход в пору слияния с учетом гидрофобных и гидратационных взаимодействий. *Биол. мембраны.* **31**, 14–24.
23. Молотковский Р.Ю., Кузьмин П.И., Акимов С.А. 2015. Слияние мембран. Два возможных механизма понижения высоты энергетического барьера при участии белков слияния. *Биол. мембраны.* **32**, 79–79.
24. Molotkovsky R.J., Galimzyanov T.R., Jiménez-Mun- guía I., Pavlov K.V., Batishchev O.V., Akimov S.A. 2017. Switching between successful and dead-end intermediates in membrane fusion. *Int. J. Mol. Sci.* **18**, 2598.
25. Molotkovsky R.J., Alexandrova V.V., Galimzyanov T.R., Jiménez-Mun- guía I., Pavlov K.V., Batishchev O.V., Akimov S.A. 2018. Lateral membrane heterogeneity regulates viral-induced membrane fusion during HIV entry. *Int. J. Mol. Sci.* **19**, 1483.
26. Akimov S.A., Polynkin M.A., Jiménez-Mun- guía I., Pavlov K.V., Batishchev O.V. 2018. Phosphatidylcho- line membrane fusion is pH-dependent. *Int. J. Mol. Sci.* **19**, 1358.
27. Olzmann J.A., Carvalho P. 2019. Dynamics and functions of lipid droplets. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **20**, 137–155.
28. Gao Q., Goodman J.M. 2015. The lipid droplet—a well-connected organelle. *Front. Cell Dev. Biol.* **3**, 49.

29. Murphy S., Martin S., Parton R.G. 2009. Lipid droplet-organelle interactions; sharing the fats. *Biochim. Biophys. Acta – Mol. Cell Biol. Lipids* **1791**, 441–447.
30. Joshi A.S. 2021. Peroxisomal membrane contact sites in yeasts. *Front. Cell Dev. Biol.* **9**, 735031.
31. Binns D., Januszewski T., Chen Y., Hill J., Markin V.S., Zhao Y., Gilpin C., Chapman K.D., Anderson R.G.W., Goodman J.M. 2006. An intimate collaboration between peroxisomes and lipid bodies. *J. Cell Biol.* **173**, 719–731.
32. Hayashi Y., Hayashi M., Hayashi H., Hara-Nishimura I., Nishimura M. 2001. Direct interaction between glyoxysomes and lipid bodies in cotyledons of the *Arabidopsis thaliana* ped1 mutant. *Protoplasma*. **218**, 83–94.
33. Bascom R.A., Chan H., Rachubinski R.A. 2003. Peroxisome biogenesis occurs in an unsynchronized manner in close association with the endoplasmic reticulum in temperature-sensitive *yarrowia lipolytica* Pex3p mutants. *Mol. Biol. Cell.* **14**, 939–957.
34. Thazar-Poulot N., Miquel M., Fobis-Loisy I., Gaude T. 2015. Peroxisome extensions deliver the *Arabidopsis* SDP1 lipase to oil bodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **112**, 4158–4163.
35. Bartz R., Li W.H., Venables B., Zehmer J.K., Roth M.R., Welti R., Anderson R.G.W., Liu P., Chapman K.D. 2007. Lipidomics reveals that adiposomes store ether lipids and mediate phospholipid traffic. *J. Lipid Res.* **48**, 837–847.
36. Fei W., Shui G., Zhang Y., Krahmer N., Ferguson C., Kapterian T.S., Lin R.C., Dawes I.W., Brown A.J., Li P., Huang X., Parton R.G., Wenk M.R., Yang H. 2011. A role for phosphatidic acid in the formation of “super-sized” lipid droplets. *PLoS Genet.* **7**, e1002201.
37. Осипенко Д.С., Галимзянов Т.Р., Акимов С.А. 2016. Латеральное перераспределение трансмембранных белков и жидко-упорядоченных доменов в липидных мембранах с неоднородной кривизной. *Биол. мембраны* **33**, 176–186.
38. Kondrashov O.V., Galimzyanov T.R., Molotkovsky R.J., Batishchev O.V., Akimov S.A. 2020. Membrane-mediated lateral interactions regulate the lifetime of gramicidin channels. *Membranes*. **10**, 368.
39. Kondrashov O.V., Pinigin K.V., Akimov S.A. 2021. Characteristic lengths of transmembrane peptides controlling their tilt and lateral distribution between membrane domains. *Phys. Rev. E*. **104**, 044411.
40. Kondrashov O.V., Kuzmin P.I., Akimov S.A. 2022. Hydrophobic mismatch controls the mode of membrane-mediated interactions of transmembrane peptides. *Membranes*. **12**, 89.
41. Kuzmin P.I., Akimov S.A., Chizmadzhev Y.A., Zimmerberg J., Cohen F.S. 2005. Line tension and interaction energies of membrane rafts calculated from lipid splay and tilt. *Biophys. J.* **88**, 1120–1133.
42. Galimzyanov T.R., Molotkovsky R.J., Kheyfets B.B., Akimov S.A. 2013. Energy of the interaction between membrane lipid domains calculated from splay and tilt deformations. *JETP Lett.* **96**, 681–686.
43. Galimzyanov T.R., Molotkovsky R.J., Bozdaganyan M.E., Cohen F.S., Pohl P., Akimov S.A. 2015. Elastic membrane deformations govern interleaflet coupling of lipid-ordered domains. *Phys. Rev. Lett.* **115**, 088101.
44. Molotkovsky R.J., Galimzyanov T.R., Batishchev O.V., Akimov S.A. 2019. The effect of transmembrane protein shape on surrounding lipid domain formation by wetting. *Biomolecules*. **9**, 729.
45. Pinigin K.V., Kondrashov O.V., Jiménez-Munigua I., Alexandrova V.V., Batishchev O.V., Galimzyanov T.R., Akimov S.A. 2020. Elastic deformations mediate interaction of the raft boundary with membrane inclusions leading to their effective lateral sorting. *Sci. Rep.* **10**, 4087.
46. Молотковский Р.Ю., Акимов С.А. 2009. Расчет линейного натяжения в различных моделях кромки поры в липидном бислое. *Биол. мембраны*. **26**, 149–158.
47. Акимов С.А., Муковозов А.А., Воронина Г.Ф., Чизмаджев Ю.А., Батищев О.В. 2014. Линейное натяжение и структура кромки сквозной поры в липидном бислое. *Биол. мембраны*. **31**, 323–330.
48. Akimov S.A., Volynsky P.E., Galimzyanov T.R., Kuzmin P.I., Pavlov K.V., Batishchev O.V. 2017. Pore formation in lipid membrane I: Continuous reversible trajectory from intact bilayer through hydrophobic defect to transversal pore. *Sci. Rep.* **7**, 12152.
49. Akimov S.A., Volynsky P.E., Galimzyanov T.R., Kuzmin P.I., Pavlov K.V., Batishchev O.V. 2017. Pore formation in lipid membrane II: Energy landscape under external stress. *Sci. Rep.* **7**, 12509.
50. Пинигин К.В., Воловик М.В., Батищев О.В., Акимов С.А. 2020. Взаимодействие границ упорядоченных липидных доменов и амфипатических пептидов регулирует вероятность образования пор в мембранах. *Биол. мембраны*. **37**, 337–349.
51. Bashkirov P.V., Akimov S.A., Evseev A.I., Schmid S.L., Zimmerberg J., Frolov V.A. 2008. GTPase cycle of dynamin is coupled to membrane squeeze and release, leading to spontaneous fission. *Cell*. **135**, 1276–1286.
52. Frolov V.A., Escalada A., Akimov S.A., Shnyrova A.V. 2015. Geometry of membrane fission. *Chem. Phys. Lipids*. **185**, 129–140.
53. Shnyrova A.V., Bashkirov P.V., Akimov S.A., Pucadyil T.J., Zimmerberg J., Schmid S.L., Frolov V.A. 2013. Geometric catalysis of membrane fission driven by flexible dynamin rings. *Science*. **339**, 1433–1436.
54. Espadas J., Pendin D., Bocanegra R., Escalada A., Misticoni G., Trevisan T., del Olmo A.V., Montagna A., Bova S., Ibarra B., Kuzmin P.I., Bashkirov P.V., Shnyrova A.V., Frolov V.A., Daga A. 2019. Dynamic constriction and fission of endoplasmic reticulum membranes by reticulon. *Nat. Commun.* **10**, 5327.
55. Kondrashov O.V., Galimzyanov T.R., Jiménez-Munigua I., Batishchev O.V., Akimov S.A. 2019. Membrane-mediated interaction of amphipathic peptides can be described by a one-dimensional approach. *Phys. Rev. E*. **99**, 022401.
56. Pinigin K.V., Kuzmin P.I., Akimov S.A., Galimzyanov T.R. 2020. Additional contributions to elastic energy of lipid membranes: Tilt-curvature coupling and curvature gradient. *Phys. Rev. E*. **102**, 042406.
57. Akimov S.A., Molotkovsky R.J., Kuzmin P.I., Galimzyanov T.R., Batishchev O.V. 2020. Continuum models of membrane fusion: Evolution of the theory. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 3875.
58. Leikin S., Kozlov M.M., Fuller N.L., Rand R.P. 1996. Measured effects of diacylglycerol on structural and elas-

- tic properties of phospholipid membranes. *Biophys. J.* **71**, 2623–2632.
59. Nagle J.F., Tristram-Nagle S. 2000. Lipid bilayer structure. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **10**, 474–480.
60. Hamm M., Kozlov M.M. 1998. Tilt model of inverted amphiphilic mesophases. *Eur. Phys. J. B.* **6**, 519–528.
61. Ryham R.J., Klotz T.S., Yao L., Cohen F. S. 2016. Calculating transition energy barriers and characterizing activation states for steps of fusion. *Biophys. J.* **110**, 1110–1124.
62. Rawicz W., Olbrich K.C., McIntosh T., Needham D., Evans E. 2000. Effect of chain length and unsaturation on elasticity of lipid bilayers. *Biophys. J.* **79**, 328–339.
63. Hossein A., Deserno M. 2020. Spontaneous curvature, differential stress, and bending modulus of asymmetric lipid membranes. *Biophys. J.* **118**, 624–642.
64. Pinigin K.V., Galimzyanov T.R., Akimov, S.A. 2021. Amphipathic peptides impede lipid domain fusion in phase-separated membranes. *Membranes.* **11**, 797.
65. Rakotonirina-Ricquebourg R., Costa V., Teixeira V. 2022. Hello from the other side: Membrane contact of lipid droplets with other organelles and subsequent functional implications. *Prog. Lipid Res.* **85**, 101141.
66. Penno A., Hackenbroich G., Thiele C. 2013. Phospholipids and lipid droplets. *Biochim. Biophys. Acta – Mol. Cell Biol. Lipids* **1831**, 589–594.
67. Yang H., Galea A., Sytnyk V., Crossley M. 2012. Controlling the size of lipid droplets: lipid and protein factors. *Curr. Opin. Cell Biol.* **24**, 509–516.
68. Башкиров П.В., Чекашкина К.В., Акимов С.А., Кузьмин П.И., Фролов В.А. 2011. Изменение состава липидной мембраны при сильном изгибе. *Биол. мембраны.* **28**, 145–152.

Fusion of Peroxisome and Lipid Droplet Membranes: Expansion of a π -Shaped Structure

R. J. Molotkovsky¹, *, P. I. Kuzmin¹

¹*Frumkin Institute of Physical Chemistry and Electrochemistry,
Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia*

*e-mail: rodion.molotkovsky@gmail.com

The classical theory of fusion considers the fusion of bilayer membranes as the union of the material of the membranes themselves and the water volumes surrounded by them. It has been shown that membrane fusion is accompanied by significant deformation of lipid monolayers. The optimal trajectory of the process passes via several intermediate structures characterized by local minima of the free energy of the system; these minima are separated by energy barriers. The key fusion intermediates are the so-called stalk, with the contacting membrane monolayers already fused but the distal monolayers not yet fused, and the hemifusion diaphragm, a structure with an extended lipid bilayer formed by two distal monolayers of merging membranes, located in the center between the radially displaced fused contact monolayers. In this paper we consider the problem of the fusion of a bilayer membrane and a lipid monolayer located at the water-triolein interface from the standpoint of the classical theory of fusion. An intermediate π -shaped structure, formed as a result of the fusion of a lipid droplet monolayer and a peroxisome bilayer, was considered, and the dependence of its energy on the geometric and elastic parameters of the system was analyzed. In particular, it was shown that the π -shaped structure is similar to the hemifusion diaphragm of the classical theory of bilayer membrane fusion – an increase in the radial dimensions of both structures becomes more energetically favorable with a decrease in the spontaneous curvature of the membrane monolayers. This result is consistent with the available experimental data on the fusion of lipid droplets with peroxisomes.

Keywords: lipid membrane, elasticity theory, membrane fusion, lipid droplet, peroxisome, spontaneous curvature