Институт физической химии и электрохимии
им. А. Н. Фрумкина РАН

На правах рукописи

ФРОЛОВ ВЛАДИМИР АЛЕКСАНДРОВИЧ

БИОЭЛЕКТРОХИМИЯ НАНОДОМЕНОВ В МОДЕЛЬНЫХ И КЛЕТОЧНЫХ МЕМБРАНАХ: ТЕОРЕТИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Специальность 02.00.05 – Электрохимия

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата физико-математических наук

Москва 2008

Работа выполнена в Институте физической химии и электрохимии
им. А. Н. Фрумкина РАН

Научный руководитель:
член-корреспондент РАН, доктор химических наук
Юрий Александрович Чизмаджев

Официальные оппоненты:

доктор физико-математических наук
Игорь Георгиевич Медведев

доктор физико-математических наук
Сергей Иванович Мухин

Ведущая организация:
Институт биоорганической химии
им. М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН

Защита состоится 17 июня 2008 года в 11 час. 00 мин. на заседании диссертационного совета Д 002.259.03 при Институте физической химии и электрохимии им. А. Н. Фрумкина РАН по адресу:
119991, г. Москва, Ленинский проспект, д. 31.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института физической химии и электрохимии им. А. Н. Фрумкина РАН.

Автореферат разослан ____ мая 2008 года.

Ученый секретарь
диссертационного совета
кандидат химических наук Г. М. Корначева

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Введение. Актуальность проблемы. Известная модель Зингера-Никольсона, согласно которой белки «плавают» в однородном липидном море, за последние десятилетия претерпела значительные изменения. Сегодня общепринято, что клеточная мембрана крайне неоднородна: в ней присутствует целая иерархия различных липид-белковых структур, которые являются участниками всевозможных событий, протекающих в живой клетке. Простейшая из таких структур – это липид-белковые образования, обнаруженные лет 30 тому назад и названные «граничными липидами». Они подобны гидратным оболочкам, которые образуются в водных растворах электролитов вокруг ионов. Несколько лет назад была высказана гипотеза, согласно которой вокруг белков могут образовываться довольно протяженные липидные области постоянного состава, который отличен от среднего по мембране. Предполагается, что по своему фазовому состоянию они тождественны с окружающими липидами. Количественного оформления эта гипотеза до сих пор не получила. Значительно большее распространение приобрела модель липид-белковых нанодоменов (рафтов), согласно которой вокруг определенных белков возникают обогащенные сфинголипидами и холестерином области, где липиды находятся в новом фазовом состоянии, жидкоупорядоченном. Интерес к рафтам вызван тем, что появляется все больше экспериментальных данных, подтверждающих их участие в таких жизненно важных клеточных процессах, как сортировка белков, их доставка в мембраны, межклеточная сигнализация и многих других. Оценки размера рафтов в клеточных мембранах варьируются от нескольких единиц до сотен нанометров. Кроме того, с помощью электронной микроскопии недавно были обнаружены липид-белковые «острова» размером до 300 нм и было показано, что в их состав входят как рафтовые, так и нерафтовые липидные образования. Несмотря на большое число работ, посвященных исследованию рафтов, физические механизмы, определяющие их возникновение и динамику, до сих пор не выяснены. Это обуславливает актуальность теоретического биоэлектрохимического исследования данного явления.

Концепция рафтов в клеточных мембранах как островков новой фазы получила мощную поддержку со стороны экспериментов с модельными липидными мембранами – гигантскими липосомами и плоскими бислоями. В таких системах после понижения температуры в результате фазового перехода

образуются рафты диаметром 5–10 мкм, которые можно легко наблюдать методами флуоресцентной микроскопии. Было установлено, что такие рафты имеют практически круглую форму, бислойны, и липид в них находится в жидком состоянии. Круглая форма рафта довольно быстро (за секунды) восстанавливается после ее возмущения, что говорит о том, что на границе рафта имеется существенное линейное натяжение. Кроме того, толщина рафтов на 0,5–1 нм превышает толщину окружающей их мембраны. Кроме микронных рафтов, с помощью ЯМР в липидных мембранах были обнаружены рафты размера порядка десятков нанометров, следовательно, возникает вопрос о механизмах стабилизации столь малых рафтов. Таким образом, исследование фазового превращения в липидных мембранах является ключевым для объяснения этих экспериментальных данных.

В биологических системах при физиологических температурах, по-видимому, нет пересыщения по липиду, т.е. нет условий для глобального фазового перехода. Тем не менее, можно предположить, что образование рафтов в клеточных мембранах связано с локальным фазовым переходом вблизи белка, инициированным самим белком. Выяснение условий такого перехода и свойств образовавшегося домена несомненно важно для описания процессов кластеризации мембранных белков.

Цель и задачи исследования. Цель настоящей работы заключается в исследовании возникновения и динамики рафтов в липидных и клеточных мембранах. В ходе работы были поставлены следующие задачи:

1) количественно проанализировать кинетику фазового превращения в многокомпонентной липидной мембране, первоначально находящейся в метастабильном состоянии;
2) исходя из результатов анализа кинетики перехода, определить условия стабилизации нанорафтов в липидной мембране;
3) исследовать возникновение белок-липидных рафтов в клеточных мембранах по механизму смачивания в условиях недонасыщения.

Методы вычислений. При рассмотрении фазового перехода в липидной мембране использовалось обобщение классического описания фазового перехода в трехмерной однокомпонентной системе (Ландау, 1970) на случай двумерной многокомпонентной мембраны. Стабилизация нанодоменов рассматривалась с использованием классических методов статистической

физики, а именно, минимизации свободной энергии ансамбля нанодоменов, состоящей из граничной энергии и энтропийного члена. Минимизация осуществлялась с помощью метода неопределенных множителей Лагранжа. Исследование образования рафтовой пленки вокруг белка по механизму смачивания основывалось на приравнивании химических потенциалов липидных компонентов в пленке и в окружающей мембране. Необходимая для расчетов зависимость граничной энергии такой системы от ширины пленки рассчитывалась в предположении, что мембрана является жидкокристаллической средой, подверженной упругим деформациями и локально объемно несжимаемой. Необходимые численные расчеты производились на коммерческом программном обеспечении Maplesoft Maple 7.

Научная новизна. В настоящее время накоплен большой объем экспериментального материала о рафтах в самых различных системах. Адекватного теоретического описания существенных закономерностей данных систем разработано не было. В настоящей работе впервые количественно проанализированы все стадии фазового перехода в многокомпонентной липидной мембране. Кроме того, впервые получены условия стабилизации ансамбля нанорафтов, зависящие только от измеряемых или контролируемых экспериментально параметров: механических свойств и состава мембраны. Также удалось доказать роль рафтовой пленки в кластеризации белков в клеточных мембранах.

Практическое значение работы. Практическая ценность работы заключается в разработке физической теории образования и динамики рафтов как в липидных, так и в клеточных мембранах. Разработанный и примененный в диссертации подход может быть использован для описания и анализа широкого круга мембранных явлений. Например, рецептор липопротеинов низкой плотности, которые являются основным переносчиком холестерина в крови, существует только в кавеолах (рафтовый домен). В липидной оболочке вируса гриппа белки слияния гемагглютинины собираются вместе за счет того, что они существуют внутри рафтов. Такое их концентрирование, с последующей сборкой «розетки слияния», необходимо для вирус-индуцированного слияния. Мембранные белки в Т-лимфоцитах кластеризуются в «белковые острова» диаметром 30–300 нм. Разработанная теория позволяет систематизировать имеющиеся экспериментальные данные и обладает предсказательной силой.

Полученные в работе зависимости условий возникновения рафтов от измеряемых или контролируемых параметров позволяют планировать будущие эксперименты и прогнозировать их результаты как в искусственных, так и в биологических системах.

Апробация работы. Результаты работы докладывались на конференциях молодых ученых ИФХЭ РАН (Москва, 2006, 2007), на 8-м международном Фрумкинском симпозиуме «Кинетика электродных процессов» (Москва, 2005), на 50-м съезде американского биофизического общества (Солт-Лейк Сити, США, 2006), на 13-й международной конференции «Поверхностные силы» (Москва, 2006), на 61-м съезде американского физиологического общества (Вудсхол, США, 2007) и на научных семинарах лаборатории биоэлектрохимии ИФХЭ РАН (Москва, 2004–2007).

Публикации. За время работы над диссертацией опубликованы четыре статьи в международных и отечественных реферируемых журналах.

Объем и структура диссертации. Работа изложена на 108 страницах и иллюстрирована 31 рисунком. Диссертация состоит из введения, трех основных частей (десяти глав, включая обзор литературы) и заключения. Список цитированной литературы содержит 97 наименований.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Часть I. Обзор литературы.

Глава 1. Липидные и белок-липидные микродомены.

В этой главе рассматривается литература, посвященная экспериментальным исследованиям рафтов в биологических и искусственных системах. Показана функциональная роль рафтов в таких важных клеточных процессах, как передача сигналов, эндоцитоз, накопление, сортировка и доставка белков из аппарата Гольджи в плазматическую мембрану, вирус-индуцированное слияние и т.д. Особое внимание уделяется методам регистрации рафтов, в число которых входят: обработка мембран мягкими детергентами и выделение устойчивой к детергенту фракции; флуоресцентная микроскопия; атомная силовая микроскопия; ядерный магнитный резонанс. Проанализированы полученные этими методами физические свойства рафтов.

Глава 2. Кинетика фазового разделения.

Эта глава содержит описание теоретических исследований кинетики фазовых превращений в различных трехмерных и двумерных системах. Первоначально, фазовые переходы изучались на примере выпадения растворенного вещества из пересыщенного раствора (Ландау, 1970). Фазовое разделение включает три основные стадии: нуклеация, независимый рост и коалесценция. В ходе нуклеации происходит флуктуационное возникновение зародышей новой фазы. Затем, в течение стадии независимого роста эти зародыши растут, поглощая мономеры из окружающего раствора, а их число остается постоянным. После уменьшения пересыщения практически до нуля такой механизм роста становится неэффективным, и начинается последняя асимптотическая стадия перехода: коалесценция. Зародыши большего размера (надкритического) «поедают» зародыши меньшего размера (подкритического). А именно, подкритические зародыши растворяются, мономеры из них выходят в раствор и диффундируют в надкритические растущие зародыши. Этот подход был обобщен на трехмерные многокомпонентные системы в работах Слезова (Slezov, 2002). Кроме того, Маркузе, с использованием теории среднего поля, рассмотрел стадию коалесценции в двумерной однокомпонентной системе и получил закономерности, аналогичные трехмерному случаю (Marqusee, 1984). Следует отметить, что во всех перечисленных работах пренебрегают подвижностью образовавшихся доменов (предположение о «твердом растворе»). То обстоятельство, что мембрана является жидкой, приводит к необходимости рассматривать также их слияние и деление. Для трехмерных систем слияние доменов исследовано в классической работе Смолуховского (Smoluchowski, 1916). Их деление рассматривается в контексте известной теории капиллярных волн.

Глава 3. Теория смачивания.

Смачивание – это приповерхностное образование новой фазы в отсутствие условий для глобального фазового перехода. Это явление детально изучено, как экспериментально, так и теоретически для различных трехмерных систем. Теория Ван-дер-Ваальсовых взаимодействий позволяет вычислить химический потенциал жидкой пленки, образующейся на поверхности твердого тела, если известны комплексные диэлектрические проницаемости находящихся в контакте сред (Ландау, 1969). Такая теория дает отличное согласие с

экспериментальными данными для простых жидкостей. Однако она неприменима для описания биологических липидных пленок, образующихся вокруг белка, так как в ней не учитываются гидрофобные и структурные силы, которые во многом определяют свойства мембран.

Более адекватный подход для описания смачивания белка липидами основан на рассмотрении тепловых флуктуаций границы между липидной пленкой и окружающей мембраной (Gil, 1995). Капиллярные волны, имеющие место на этой границе, ограничены периметром белка, что приводит к появлению силы отталкивания (границы от белка) энтропийного происхождения. Эта сила достаточна для того, чтобы стабилизировать пленку, если линейное натяжение γ на границе пленки и окружающей мембраны достаточно мало. Если же γ относительно велико, то более адекватным является приближение среднего поля, широко используемое в науке о жидких кристаллах.

Часть II. Образование доменов в липидных мембранах.

Этот раздел содержит описание расчета характерных времен и скоростей всех стадий фазового превращения в липидных мембранах, не содержащих белков. Полученные результаты позволяют предложить механизм энтропийной стабилизации нанодоменов.

Глава 1. Постановка задачи.

В этой главе сформулирована базовая модель, применяющаяся в данном разделе, а также основные предположения, в которых выполнены вычисления. Общепринятой является точка зрения, что рафты в липидных мембранах возникают в результате фазового перехода. Это связано с тем, что процедура получения таких рафтов следующая: мембрана формируется при достаточно высокой температуре, затем следует резкое охлаждение, и появляются рафты. В связи с этим в диссертации рассматривается многокомпонентная липидная мембрана, первоначально латерально однородная и находящаяся в метастабильном состоянии. В ней происходит фазовое разделение, кинетика которого исследована в Главе 2. Результаты этой главы позволяют рассмотреть термодинамическую стабилизацию ансамбля нанодоменов, основанную на гипотезе «энтропийных ловушек». В рамках данной гипотезы исследуется конкуренция между двумя составляющими свободной энергии: граничной энергией, связанной с линейным натяжением на границе рафт/окружающая

мембрана, и энтропийным членом (конфигурационной энтропией). Очевидно, что слияние рафтов уменьшает граничную энергию в силу уменьшения общего периметра рафтового ансамбля. Тем не менее, такое слияние увеличивает энтропийный вклад в свободную энергию. Если линейное натяжение достаточно мало, то слияние будет приводить к увеличению свободной энергии, следовательно, система будет находиться в «энтропийной ловушке», стабилизирующей дисперсный ансамбль. Критическое значение линейного натяжения и его зависимость от параметров системы найдено в Главе 3, посвященной стабилизации нанодоменов. Глава 4 посвящена нахождению упругих модулей мембраны, исходя из экспериментальных данных по вытягиванию нанотрубок из бислойных мембран.

Глава 2. Кинетика перераспределения вещества.

В этой главе находятся характерные времена всех стадий фазового перехода в липидной мембране в предположениях, описанных в Главе 1. Как описывалось в предыдущем разделе, переход состоит из трех основных стадий. При рассмотрении первой стадии, нуклеации, использовалось обобщение классической теории Зельдовича на случай двумерной многокомпонентной мембраны. Для устранения расходимости решения уравнения стационарной диффузии в двумерном случае вводится характерный радиус системы, так называемый радиус обрезания. Для учета многокомпонентности вводится предположение о независимости состава зародыша от его размера. Из него следует, что изменение размера домена происходит только за счет присоединения или отщепления определенных структурных единиц – так называемых квазимолекул, состав которых совпадает с составом доменов. Это позволяет связать между собой потоки частиц различных компонентов и свести задачу к однокомпонентной. С использованием сделанных предположений находится характерное время нуклеации, которое составляет порядка 0,2 мс. Аналогичным образом показано, что продолжительность стадии независимого роста составляет порядка τ_{ig} = 1,5 мс, а средний радиус доменов в конце этой стадии равен 40 нм.

Для рассмотрения последней стадии фазового перехода – нуклеации – используется обобщение теории среднего поля в трактовке Маркузе на случай многокомпонентной мембраны. Для этого снова используется предположение о постоянстве состава домена. Средний радиус доменов зависит от времени следующим образом:

$$< r >= b_0\left(\frac{2Da^2\gamma\tilde{c}_\infty}{kT}t\right)^{1/3}, \quad \tilde{c}_\infty = \left(\sum_i \frac{v_i^2}{c_{i\infty}}\right)^{-1}, \tag{1}$$

где D – коэффициент диффузии липида; γ – линейное натяжение на границе домен/окружающая мембрана; a – площадь, приходящаяся на квазимолекулу; $c_{i\infty}$ – равновесная концентрация i-го компонента около прямой границы с доменом; $\tilde{c}_\infty$ – эффективная равновесная концентрация; b_0 – коэффициент порядка единицы, который находится численно. Характерным временем коалесценции считается время τ_r, за которое средний радиус уменьшается в $\sqrt{2}$ раз. Оно определяется как:

$$\tau_r = \left(2\sqrt{2}-1\right)\frac{kT\,b_0^{3/2}}{Da^2\gamma\tilde{c}_\infty} < r >^3, \tag{2}$$

где <r> – средний радиус доменов в момент начала коалесценции. Для полученного выше <r> = 40 нм τ_r составляет 1600 с.

Поскольку домены в мембране нельзя считать неподвижными, необходимо учесть еще один механизм перераспределения вещества: слияние и деление доменов. Скорость слияния доменов можно найти, обобщив теорию коагуляции Смолуховского на двумерный случай. Различают два типа коагуляции: быструю и замедленную. В первом случае предполагается, что при столкновении домены мгновенно сливаются. Во втором случае учитываются силы отталкивания, которые могут возникать при сближении доменов. Если назвать характерным временем слияния τ_m время, за которое число доменов уменьшается в два раза, то

$$\tau_m = W\ln(r_*/2r_0)/2\pi D_d N_0, \tag{3}$$

где W – коэффициент замедления слияния, r_* – радиус обрезания, D_d – коэффициент диффузии доменов, N_0 – число доменов радиуса r_0 в мембране в начале слияния. Коэффициент замедления определяется энергетическим барьером, возникающим при сближении двух доменов. Для жидкокристаллической модели мембраны, в которой причиной возникновения барьера является гидрофобное несоответствие, получены следующие значения W: при r_0 = 40 нм величина $W \sim 1$, а для r_0 = 1 мкм – $W \sim 10^4$. Таким образом, для радиуса r_0 = 40 нм характерное время τ_m составляет около 0,03 с, а для микронных рафтов – порядка часа.

Обратным процессом для слияния доменов является их деление. Характерное время τ_f деления домена радиуса R на два домена с радиусами r и $\sqrt{R^2-r^2}$ определяется разницей в граничных энергиях:

$$\tau_f = 1/\omega \exp\left(\frac{\Delta E}{kT}\right) = 1/\omega \exp\left(\gamma\left(2\pi r + 2\pi\sqrt{R^2 - r^2} - 2\pi R\right)/kT\right), \quad (4)$$

где ω – характеристическая частота осцилляций границы, которая может быть оценена, исходя из теории капиллярных волн. Очевидно, что вероятность деления микродомена пополам очень мала, тем не менее, отщепление нанодомена от домена микронного размера является достаточно вероятным. Для R = 1 мкм характерное время отщепления нанодомена радиуса r = 40 нм равно τ_f = 0,2 с (γ = 0,4 пН). Кроме того, для нанодоменов деление пополам вполне возможно: для r = 40 нм и $R = r\sqrt{2}$ значение τ_f составляет τ_f = 0,1 с, при линейном натяжении γ = 0,4 пН.

Подводя итоги, можно представить следующую картину фазового превращения: после окончания нуклеации и независимого роста в мембране есть только нанодомены с узким распределением около <r> ~ 40 нм. Для $t > \tau_{ig}$ пересыщение очень мало и асимптотически стремится к нулю. Коалесценция протекает очень медленно (характерное время порядка часа), так что ею можно пренебречь. Увеличение размера доменов происходит за счет процесса слияния (характерное время ~ 0,1 с). Тем не менее, этот процесс не является необратимым, так как характерное время деления того же порядка. Действительно, для деления на два нанодомена с радиусом r = 40 нм требуется около 0,1 с. Это позволяет предположить, что общая площадь доменной фазы сохраняется, по крайней мере, во временном интервале $\tau_{ig} < t < \tau_r$, где систему можно считать равновесной и применять стандартные методы статистической термодинамики для нахождения функции распределения доменов по размерам.

Глава 3. Стабилизация нанодоменов.

В этой главе исследуется термодинамическая стабилизация ансамбля нанодоменов в мембране с учетом результатов, полученных в Главе 2. Рассмотрен ансамбль доменов с радиусами $r_{min} \le r \le r_{max}$, где минимальный радиус $r_{min} = r_c = <r>(t = \tau_{ig})$, а r_{max} определяется законом сохранения вещества. Поскольку используется концепция структурных единиц, то радиус домена изменяется не непрерывно, а дискретно. А именно, домен радиуса r_m содержит на m структурных единиц больше, чем домен минимального радиуса r_{min}. Т.е. $r_m = \sqrt{r_{min}^2 + m\frac{a}{\pi}}$, где $m = 0...m_{max}$. Величина m_{max} определяется из закона сохранения вещества, как $m_{max} = (A_r - \pi r_{min}^2)/a$, где A_r – общая площадь доменной фазы. Свободная энергия системы имеет вид:

$$F = \sum_{m=0}^{m_{\max}} (n_{\mathrm{m}} kT \ln \frac{n_{\mathrm{m}}}{eN} + kTn_{\mathrm{m}} + 2\pi r_{\mathrm{m}} \gamma n_{\mathrm{m}}), \qquad (5)$$

где $N = A/a$ – общее число квазимолекул в расчете на монослой, n_{m} – число доменов радиуса r_{m}, A – общая площадь мембраны. Первое слагаемое в уравнении (5) соответствует конфигурационной энтропии, второе представляет собой кинетическую энергию домена, а последнее – граничную энергию домена. Уравнение (5) верно, только если $1 << n_{\mathrm{m}} << N$. Для нахождения распределения доменов по размерам следует минимизировать свободную энергию в виде (5) с учетом закона сохранения вещества. Метод неопределенных множителей Лагранжа приводит к:

$$n_{\mathrm{m}} = N \exp\left(- \frac{kT + 2\pi\gamma\, r_{\mathrm{m}} + \lambda(\gamma)\pi r_{\mathrm{m}}^2}{kT} \right), \quad m = 0...m_{\max}, \qquad (6)$$

где $\lambda(\gamma)$ – множитель Лагранжа, определяемый из закона сохранения вещества.

Для значения $A_{\mathrm{r}} = 10^{-5}$ см^2, соответствующего типичному размеру везикулы, оказывается, что при $\gamma < 0{,}18$ пН множитель λ положителен; следовательно, показатель экспоненты монотонно убывает при возрастании r_{m}. Примеры распределений доменов по размерам для различных значений линейного натяжения показаны на рис. 1.

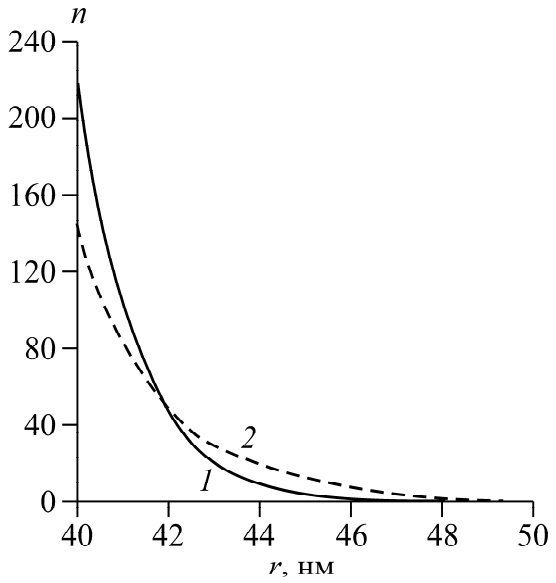

Рисунок 1. Распределения доменов по размерам, найденные из уравнения (6) для различных значений линейного натяжения: кривая *1* построена для $\gamma = 0{,}05$ пН; кривая *2* для $\gamma = 0{,}15$ пН.

По мере увеличения γ происходит незначительный сдвиг распределения в сторону бóльших радиусов (ср. кривые *1* и *2* на рис. 1). Это обусловлено

усилением влияния граничной энергии по сравнению с энтропийным членом в свободной энергии (5). Тем не менее, для всех $\gamma < 0{,}18$ пН распределение является достаточно узким (характерная ширина пика ~ 1 нм), а его максимум совпадает с минимальным радиусом $r_{\min}$. Для $\gamma > 0{,}18$ пН множитель Лагранжа отрицателен. Из формулы (6) следует, что в этом случае появляется второй пик распределения в области больших радиусов. Строго говоря, распределение (6) в этой области несправедливо. Это связано с тем, что в этом случае теряет силу предположение $1 << n_{\mathrm{m}} << N$. Поэтому для рассмотрения всех возможных значений γ используется упрощенная модель, описанная ниже.

Итак, показано, что при достаточно малом линейном натяжении в мембране существует практически монодисперсный ансамбль нанодоменов с радиусом $r_{\min}$. Кроме того, очевидно, что при достаточно большом натяжении распределение определяется граничной энергией, а не энтропией, поэтому выгодно существование одного огромного домена (глобальной фазы). Поэтому можно ограничиться рассмотрением следующей упрощенной модели: предполагается, что в мембране могут существовать только нанодомены минимального радиуса $r_{\min}$ и/или один огромный домен неизвестного радиуса R из всего остального вещества доменной фазы.

В зависимости от линейного натяжения реализуется один из трех вариантов: при малых γ выгодно диспергирование, при больших γ образуется один огромный домен, при промежуточных значениях γ сосуществует некоторое число нанодоменов с одним огромным доменом. Сосуществование имеет место только в достаточно малом диапазоне натяжений: $\gamma_{\min} \le \gamma \le \gamma_{\max}$. Его границы $\gamma_{\min}$ и $\gamma_{\max}$ приближенно определяются следующими формулами:

$$\gamma_{\min} \approx \frac{kT}{2\pi r_{\min}} \ln \frac{\pi r_{\min}^2}{\phi_\infty a}, \; \gamma_{\max} \approx \frac{kT}{2\pi r_{\min}} \ln \frac{A}{a}, \; \phi_\infty = A_{\mathrm{r}} / A. \qquad (7)$$

Для минимального радиуса $r_{\min} = 40$ нм критические натяжения составляют $\gamma_{\min} = 0{,}18$ пН и $\gamma_{\max} = 0{,}38$ пН. Натяжения $\gamma_{\min}$ и $\gamma_{\max}$ уменьшаются с увеличением $r_{\min}$.

Количественно перераспределение вещества между нанодоменами и большим доменом проиллюстрировано на рис. 2. При $\gamma < \gamma_{\min}$ в мембране существуют только нанодомены, и их число постоянно (область **А**). Для $\gamma_{\min} \le \gamma \le \gamma_{\max}$ нанодомены сосуществуют с огромным доменом. Чем больше линейное натяжение, тем меньше в мембране нанодоменов и тем больше радиус большого домена (область **Б**). При $\gamma > \gamma_{\max}$ в мембране остается только один огромный домен (область **В**).

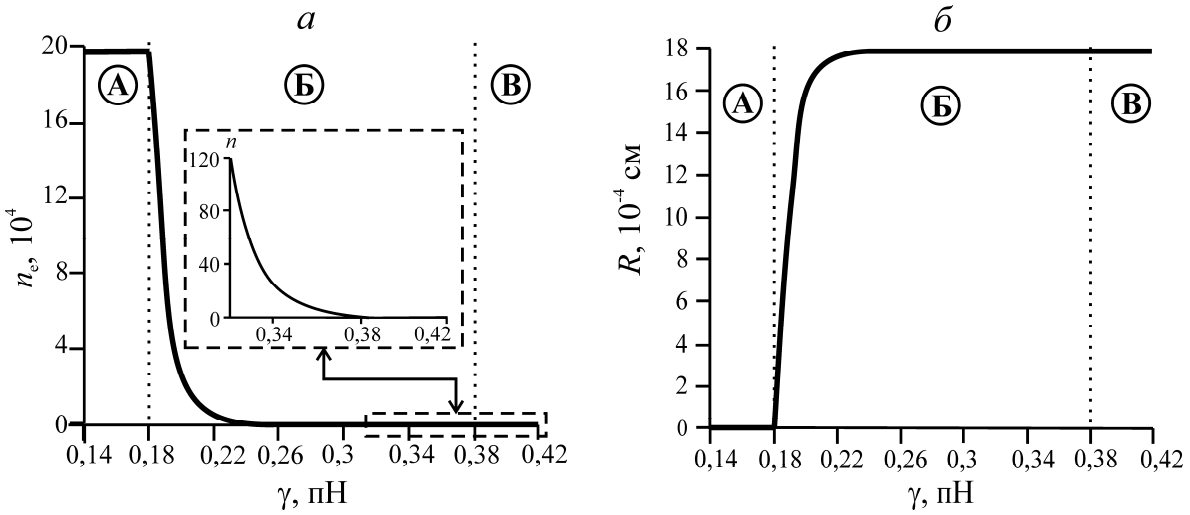

Рисунок 2. Перераспределение вещества между нанодоменами и большим доменом: *а* – зависимость равновесного числа нанодоменов n_e радиуса r_{min} от линейного натяжения γ; *б* – зависимость радиуса огромного домена R от γ. Вертикальные пунктирные линии разделяют рисунок на 3 области. Область **А**: $\gamma < \gamma_{min}$. Область **Б**: $\gamma_{min} \le \gamma \le \gamma_{max}$. Область **В**: $\gamma > \gamma_{max}$.

Глава 4. Определение упругих модулей мембраны электрохимическим методом.

Рафты отличаются от окружающей мембраны по своим упругим модулям. Для определения этих параметров в нашей лаборатории были поставлены опыты по вытягивания нанотрубок (НТ) из рафта и изучению свойств таких НТ электрохимическими методами. В этой главе предложен алгоритм определения упругих модулей липидной мембраны, который основан на экспериментальном измерении проводимости нанотрубки, вытянутой из этой мембраны, при различных значениях разности потенциалов, приложенной к концам этой трубки.

В нашей лаборатории разработана методика получения НТ, с помощью которой можно определить их эффективный радиус (Башкиров, 2007). Для этого при фиксированном значении разности потенциалов измеряется зависимость проводимости G от смещения пипетки L. Данная зависимость аппроксимируется гиперболической функцией следующего вида:

$$G = \frac{\pi r_{nt}^2}{\rho\left(L - L_{bg}\right)} + G_{bg}\,, \tag{8}$$

где r_{nt} – эффективный радиус НТ, ρ – удельное сопротивление раствора электролита (для 100 мМ раствора KCl оно равно 1 Ом·м), G_{bg} – фоновая

проводимость, связанная с электрической утечкой, L_{bg} – смещение пипетки, соответствующее нулевой длине НТ. Неизвестные параметры r_{nt}, G_{bg}, и L_{bg} находятся из экспериментальной зависимости $G(L)$ по методу наименьших квадратов в предположении, что форма НТ является цилиндрической. Это предположение справедливо только при отсутствии приложенной разности потенциалов.

Для нахождения формы НТ в случае ненулевой разности потенциалов следует минимизировать функционал $W[y(x)]$ свободной поверхностной энергии мембраны, связанной с резервуаром липида. Предполагается, что система имеет цилиндрическую симметрию, т.е. форма НТ определяется зависимостью радиуса $y(x)$ от координаты x вдоль оси НТ. Согласно уравнению Липпмана поверхностное натяжение мембраны зависит от трансмембранного потенциала как

$$\sigma = \sigma_0 - C_0 U^2(x)/2, \tag{9}$$

где C_0 – удельная емкость мембраны (Lippmann, 1875). Соответственно, энергия элемента мембраны с учетом упругих деформаций имеет вид:

$$dW = \left(\sigma_0 - C_0 U^2(x)/2\right)dA + BJ^2(x)dA/2, \tag{10}$$

где J – кривизна мембраны, B – модуль изгиба. Для достаточно малого напряжения ($C_0 U^2(x) << \sigma_0$, что верно вплоть до 200 мВ), отклонение $z(x)$ формы трубки от цилиндра будет малым, поэтому можно записать

$$y(x) = r_0 + z(x),\ z(x) << r_0. \tag{11}$$

Элемент площади dA и кривизна J выражаются через $z(x)$ следующим образом:

$$dA = 2\pi\left(r_0 + z(x)\right)\sqrt{1 + \left(z'(x)\right)^2}\,dx, \tag{12}$$

$$J = -\frac{z''(x)}{\left(1 + \left(z'(x)\right)^2\right)^{3/2}} + \frac{1}{\left(r_0 + z(x)\right)\sqrt{1 + \left(z'(x)\right)^2}}. \tag{13}$$

Распределение потенциала вдоль НТ выражается как:

$$U(x) = U_0 \left[\int_0^x \left(r_0 + z(q)\right)^{-2} dq\right] \Bigg/ \left[\int_0^l \left(r_0 + z(q)\right)^{-2} dq\right], \tag{14}$$

где U_0 – разность потенциалов, приложенная к концам НТ, $l = L - L_{bg}$ – длина НТ. Минимизация функционала (10) с учетом равенств (11)–(14) производится с помощью стандартного уравнения Эйлера-Лагранжа. Использование условия $z(x) << r_0$ приводит к следующему результату:

$$y(x) = \sqrt{\frac{B}{2\sigma_0}}\left(1 + \frac{C_0 U_0^2}{4l^2\sigma_0}x^2\right). \tag{15}$$

Из соотношения (15) находится полное сопротивление НТ, которое сравнивается с сопротивлением эффективного цилиндра:

$$R = \int_0^l \rho\, dx / \left(\pi y^2(x)\right) = \frac{2\sigma_0 \rho l}{\pi B}\left(1 - \frac{C_0 U_0^2}{6\sigma_0}\right) = \frac{\rho l}{\pi r_{\mathrm{nt}}^2}. \qquad (16)$$

Таким образом, окончательно получаем следующую зависимость эффективного радиуса от напряжения:

$$\frac{1}{r_{\mathrm{nt}}^2} = \frac{2\sigma_0}{B} - \frac{C_0 U_0^2}{3B}. \qquad (17)$$

Исходя из уравнения (17), по наклону прямой $r_{\mathrm{nt}}^{-2}(U_0^2)$ можно определить модуль изгиба B, а по отсечке поверхностное натяжение σ_0. В нашей лаборатории было получено экспериментально, что значения этих величин для жидкоупорядоченной и жидконеупорядоченной фаз отличаются не более чем на 10% ($B \sim 10$–$12\ kT$). Это согласуется с оценками, проделанными в ряде других экспериментальных работ (Baumgart, 2003).

Часть III. Образование доменов в клеточных мембранах.

В этом разделе предложен механизм образования доменов в клеточных мембранах, использующий модель смачивания. Рассматривается случай рафта произвольного размера, а также предельный случай рафта бесконечного радиуса.

Глава 1. Постановка задачи.

В этой главе сформулирована базовая модель, применяющаяся в данном разделе, а также основные предположения, в которых выполнены вычисления. Образование рафтов в клеточных мембранах связано с локальным фазовым переходом вблизи белка, инициированным самим белком. Рассматривается многокомпонентная белок-липидная мембрана, липиды которой могут образовать рафт при существенном понижении температуры. Однако при рассматриваемой температуре система недонасыщена и однородна. Тем не менее, возможно образование тонкой пленки рафтовой фазы вокруг трансмембранного домена белка по механизму смачивания. Пленка также может возникать вокруг крупного белок-липидного агрегата. Это дает возможность варьировать размер комплекса, вокруг которого образуется пленка, в достаточно широких пределах. Для сравнения также будет описан предельный случай, когда радиус комплекса стремится к бесконечности. При

нахождении граничной энергии мембрана считается сплошной локально объемно несжимаемая средой.

Глава 2. Смачивание в случае комплекса достаточно большого радиуса.

В этой главе описывается механизм образования рафтовой пленки вокруг комплекса достаточно большого размера в клеточной мембране по механизму смачивания. Рассматривается бислойная мембрана, содержащая белки и m видов липидов, которые могут образовать домен жидкоупорядоченной фазы при существенном понижении температуры (например, до 4°C). Однако, при более высокой температуре (37°C) мембрана недонасыщена, бислой однороден, и глобального фазового перехода не происходит. Считается, что комплекс достаточно велик, так, что его граница при взгляде на нее «сверху» может считаться прямой линией. В таком случае система обладает трансляционной симметрией вдоль границы белка, и задача эффективно становится одномерной. Будем предполагать, что на границе белка образовалась пленка жидкоупорядоченной фазы ширины l, с которой граничит окружающая мембрана.

Так же как и в Части II предполагается, что состав пленки не зависит от ее ширины. В этом случае можно считать, что изменение ширины пленки происходит за счет присоединения/отделения квазимолекул. Тогда в равновесии химические потенциалы квазимолекул в пленке и в окружающей мембране равны. Если квазимолекула содержит ν_i молекул каждого липида ($i = 1,\ 2,\ \ldots,\ m$), то данное условие равновесия может быть записано в следующем виде:

$$\mu(l_\mathrm{e}) = \sum_{i=1}^{m} \nu_\mathrm{i} \mu_\mathrm{i}\,, \tag{18}$$

где $\mu(l)$ – химический потенциал квазимолекулы в пленке, а μ_i – химический потенциал i-го липидного компонента в окружающей мембране. Окружающая мембрана рассматривается, как идеальный раствор вблизи точки фазового перехода. Тогда химические потенциалы компонентов запишутся как:

$$\mu_\mathrm{i} = kT\left(c_\mathrm{i} - c_\mathrm{i}^\mathrm{eq}\right)/\, c_\mathrm{i}^\mathrm{eq}\,, \tag{19}$$

где c_i – концентрация i-го компонента в окружающей мембране, c_i^eq – равновесная концентрация i-го компонента на границе с пленкой. Эффективное недонасыщение Δ записывается следующим образом:

$$\Delta = \sum_{i=1}^{m} \nu_\mathrm{i} \left(c_\mathrm{i}^\mathrm{eq} - c_\mathrm{i}\right)/\, c_\mathrm{i}^\mathrm{eq}\,. \tag{20}$$

Исходя из равенств (19) и (20) условие равновесия (18) можно переписать в виде:

$$\mu(l_e) = -kT\Delta . \qquad (21)$$

Химический потенциал квазимолекул в пленке можно связать с эффективным линейным натяжением пленки γ (Ландау, 1969). Величина γ зависит от ширины пленки l; при $l \to \infty$ она стремится к сумме линейных натяжений на границах белок/пленка и пленка/окружающая мембрана. Если n – число квазимолекул в пленке, отнесенное к единице длины ее границы, то

$$n = \frac{l}{a} = -\frac{\partial\gamma}{\partial\mu} . \qquad (22)$$

Окончательно получаем следующую зависимость химического потенциала μ от линейного натяжения:

$$\mu(l) = \int_{l}^{\infty} \frac{a}{x}\frac{\partial\gamma(x)}{\partial x}dx . \qquad (23)$$

Следовательно, условие равновесия (21) принимает вид:

$$\mu(l_e) = \int_{l_e}^{\infty} \frac{a}{x}\frac{\partial\gamma(x)}{\partial x}dx = -kT\Delta . \qquad (24)$$

Для вычисления химического потенциала $\mu(l_e)$ необходимо знать эффективное линейное натяжение, γ, как функцию ширины пленки. Эта задача решается с использованием жидкокристаллической модели мембраны. Очевидно, что длина трансмембранного домена белка в общем случае не совпадает с толщиной монослоя в мембране, в результате чего возникает гидрофобное несоответствие между белком и мембраной. Экспонирование гидрофобных поверхностей в полярную среду крайне невыгодно; для уменьшения площади такого контакта мембрана деформируется вблизи границы белка. Экспериментально показано, что жидкоупорядоченные домены обычно на 0,6–0,8 нм толще, чем окружающая мембрана, поэтому упругие деформации происходят также на границе пленка/окружающая мембрана. Граничная энергия вычисляется для следующей системы: белок, жидкоупорядоченная пленка и жидконеупорядоченная окружающая мембрана.

Сначала рассматривается случай отсутствия гидрофобного несоответствия между белком и пленкой $h_p = h_г$, при нулевой спонтанной кривизне монослоев пленки и окружающей мембраны, $J_г = J_s = 0$. Зависимость химического потенциала в пленке от ее ширины для этого случая приведена на рис. 3*а* при различных значениях $h_p = h_г$ (кривые *1–4*). Из этого рисунка следует, что при увеличении гидрофобного несоответствия между пленкой и окружающей

мембраной, равновесная ширина пленки возрастает. В случае, когда недонасыщение составляет ~ 1%, равновесная ширина пленки изменяется от ~1 нм для $h_p = h_r = 2{,}3$ нм (кривая *1*) до ~ 5 нм для $h_p = h_r = 2{,}6$ нм (кривая *4*). При бóльших значениях недонасыщения (> 2–3%) образуется адсорбционная пленка шириной порядка ~ 1 нм.

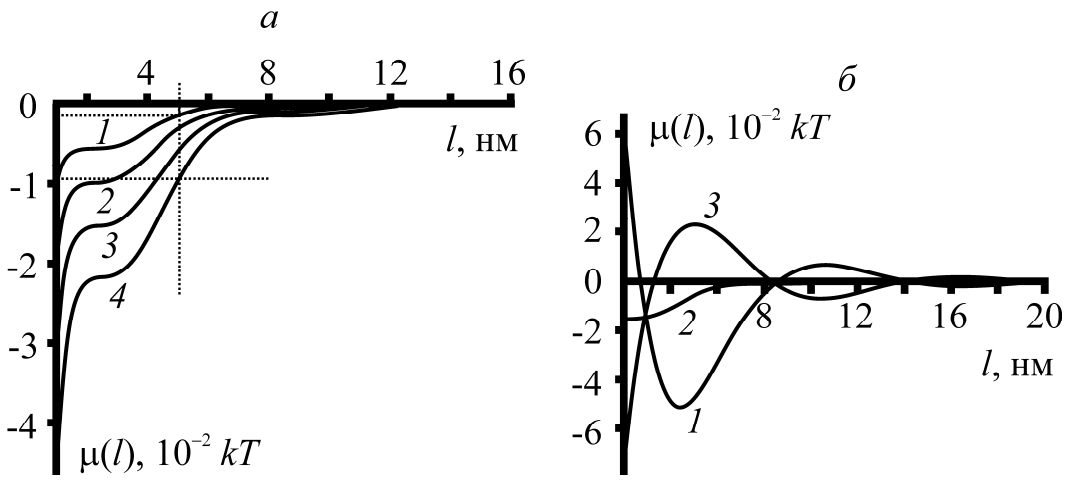

Рисунок 3. Зависимость химического потенциала квазимолекулы в пленке μ от ее ширины l ($h_s = 2{,}0$ нм). *а* – несоответствие между белком и пленкой отсутствует. Кривая *1*: $h_p = h_r = 2{,}3$ нм; кривая *2*: $h_p = h_r = 2{,}4$ нм; кривая *3*: $h_p = h_r = 2{,}5$ нм; кривая *4*: $h_p = h_r = 2{,}6$ нм. *б* – при наличии несоответствия между белком и пленкой. Значение $h_r = 2{,}5$ нм. Кривая *1*: $h_p = 2{,}0$ нм; кривая *2*: $h_p = 2{,}5$ нм; кривая *3*: $h_p = 2{,}9$ нм.

Далее рассмотрена зависимость ширины пленки от длины трансмембранного домена белка. В случае, когда $h_p \neq h_r$, характерный вид зависимости химического потенциала от ширины пленки изменяется – $\mu(l)$ становится осциллирующей с затуханием функцией l (рис. 3*б*). Возрастающие участки кривых соответствуют устойчивым состояниям, а падающие – неустойчивым. При небольшой величине недонасыщения (< 1%), таким образом, возможно образование пленки большой ширины ~ 12 нм в случае, когда длина трансмембранного домена белка больше толщины пленки, т.е. когда $h_p > h_r$ (возрастающий участок кривой *3* при l ~ 12 нм на рис. 3*б*). Эти пленки метастабильны, основному минимуму энергии системы соответствует возрастающий участок кривой при ширине пленки $l < 4$ нм. Переходы между метастабильным и основным состоянием системы с минимальной энергией требуют преодоления невысоких энергетических барьеров. Кажется неожиданной возможность появления пленки шириной 4–8 нм в случае, когда длина трансмембранного домена белка меньше толщины пленки, $h_s < h_p < h_r$

(кривая *1* на рис. 3*б*). Действительно, как показывают расчеты, основному минимуму энергии таких систем соответствует нулевая ширина пленки, т.е. ее отсутствие. Пленка шириной 4–8 нм является метастабильной; для ее образования требуется преодоление высокого энергетического барьера.

Глава 3. Смачивание в случае произвольного размера комплекса.

В этой главе алгоритм нахождения равновесной ширины пленки, предложенный в Главе 2 обобщается на случай произвольного радиуса комплекса. Предполагается, что белок содержит цилиндрически симметричный трансмембранный домен радиуса r_p. Также будет обсуждаться случай, когда у белка имеется несколько трансмембранных доменов, или в мембране имеются крупные белок-липидные агрегаты. Для этих систем радиус r_p – это радиус всего комплекса, обладающего, по предположению, цилиндрической симметрией. Приравнивание химических потенциалов квазимолекулы в пленке и в окружающей мембране, аналогично случаю прямой границы, приводит к:

$$\mu(r_\text{e}) = \int_{r_\text{e}}^{\infty} \frac{a}{\pi\left(x^2 - r_\text{p}^2\right)} \frac{\partial W(x)}{\partial x} dx = -kT\Delta, \qquad (25)$$

где Δ – эффективное недонасыщение, W – эффективная энергия границы между белком и окружающей мембраной, учитывающая наличие смачивающей пленки между ними, $r_\text{e} = l_\text{e} + r_\text{p}$ – равновесный внешний радиус пленки, l – ширина пленки. Если рассматривать предел большого комплекса $r_\text{p} \to \infty$, то можно ввести эффективное линейное натяжение $\gamma(r) = W(r)/(2\pi r)$; тогда уравнение (25) переходит в уравнение (24) из Главы 2.

Также как в Главе 2, рассматриваются случаи наличия и отсутствия гидрофобного несоответствия между белком и пленкой. Получено, что если длина трансмембранного домена белка меньше, чем толщина бислоя пленки, то стабильная пленка не образуется. Этот результат совпадает с полученным в Главе 2.

Гораздо больший интерес представляет зависимость равновесной ширины пленки от радиуса комплекса. На рис. 4 показано семейство кривых, иллюстрирующих зависимость химического потенциала в пленке, $\mu(l)$ (см. уравнение (25)), от ширины пленки l. Кривые построены для различных значений радиуса r_p. Из рис. 4 очевидно, что ширина пленки возрастает с ростом r_p. Например, $l_\text{e} \sim 1$ нм для $r_\text{p} = 5$ нм (кривая *1*) и $l_\text{e} \sim 5$ нм для $r_\text{p} = 20$ нм (кривая *4*). Сравнивая кривые *1* – *4*, можно прийти к выводу, что макроскопические неадсорбционные пленки можно получить только при

достаточно большом радиусе $r_p > 15$ нм. Такой радиус соответствует большим липид-белковым агрегатам. В то же время вокруг одиночных белков ($r_p \sim$ нескольких нм) может образовываться только адсорбционная пленка.

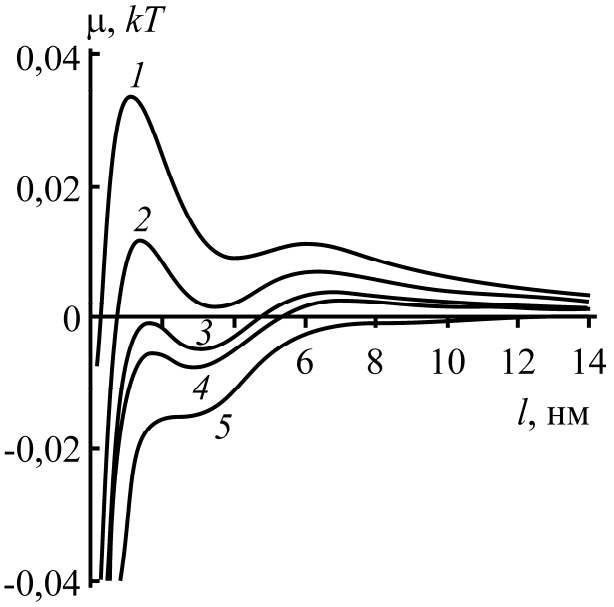

Рисунок 4. Зависимость химического потенциала квазимолекулы в пленке μ от ее ширины $l = r - r_p$ для различных значений радиуса r_p. Кривая *1*, $r_p = 5$ нм; кривая *2*, $r_p = 8$ нм; кривая *3*, $r_p = 15$ нм; кривая *4*, $r_p = 20$ нм; кривая *5*, $r_p \to \infty$. Спонтанные кривизны монослоев в пленке и окружающей мембране равны 0: $J_r = J_s = 0$, равновесные толщины монослоев $h_p = h_r = 2{,}5$ нм, $h_s = 2{,}0$ нм.

Исследован также вопрос о функции смачивающей пленки. Показано, что она удерживает белки внутри агрегата. Действительно, если белок выходит из агрегата, то его радиус уменьшается, соответственно, уменьшается и ширина пленки. Была найдена зависимость свободной энергии агрегата $E_{min}(r_p)$, окруженного пленкой равновесной ширины, от радиуса агрегата r_p. (см. рис. 5). Свободная энергия $E_{min}(r_p)$ убывает с возрастанием радиуса агрегата. Следовательно, если белок покидает агрегат, то свободная энергия агрегата возрастает. Таким образом, пленка предотвращает выход белка из агрегата. Более того, при присоединении белка или агрегата к другому агрегату E_{min} убывает, т.е. пленка облегчает рост агрегата.

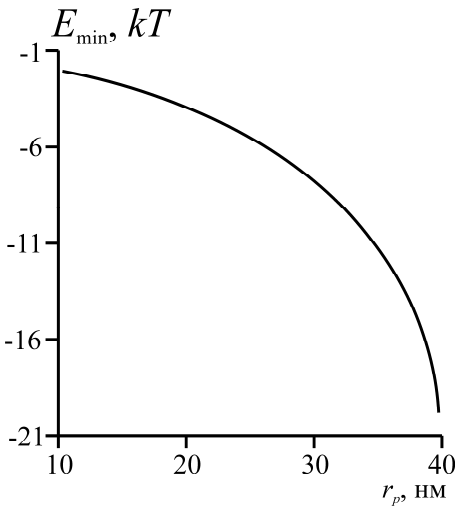

Рисунок 5. Зависимость свободной энергии агрегата E_{min}, окруженного пленкой равновесной ширины, от радиуса агрегата r_p. Недонасыщение $\Delta = 0{,}4\%$, значения остальных параметров такие же, как на рис. 4.

Заключение. В этом разделе обсуждаются предположения и ограничения, использованные в работе.

ВЫВОДЫ

1. Сделаны оценки характерных времен всех стадий фазового разделения в двумерной многокомпонентной липидной мембране. Первые две стадии (нуклеации и независимого роста) являются быстрыми: характерные времена равны $\tau_н$ = 0,2 мс и $\tau_{нр}$ = 1,5 мс соответственно. После их окончания перераспределение вещества определяется, в основном, процессами слияния доменов и отщепления нанодоменов (характерные времена $\tau_с \sim \tau_д \sim 0{,}1$ с).
2. Для ансамбля нанодоменов, образовавшегося в результате быстрых стадий фазового перехода, найдено распределение доменов по размерам в зависимости от линейного натяжения границы домена. Показано, что при достаточно малом линейном натяжении ансамбль нанодоменов стабилизируется за счет энтропийного члена в свободной энергии, при большем – образуется глобальная фаза.
3. Разработана теоретическая интерпретация электрохимического метода определения упругих модулей бислойной мембраны, основанного на измерении зависимости проводимости нанотрубки, вытянутой из мембраны, от приложенного напряжения.
4. Для клеточных мембран, находящихся в состоянии недонасыщения по липидной субфазе, на основе модели смачивания белков липидами получены

условия, при которых возникают устойчивые белок-липидные нанодомены. Принципиально новый вывод состоит в том, что подобные структуры реализуются только на основе крупных белковых агрегатов с радиусом r_p, превосходящим ~ 15 нм, вокруг которых формируется пленка шириной порядка 5 нм, которая состоит из липидов в жидкоупорядоченном состоянии.

5. Показано, что смачивающая пленка, окружающая белок-липидный агрегат, с одной стороны, препятствует выходу белков из агрегата, а с другой – облегчает слияние малых агрегатов.
6. Установлено, что одиночные белки с r_p порядка нескольких нанометров не способны инициировать локальный фазовый переход липидов и образование пленки. В этом случае имеет место адсорбция определенных липидов, порождающая шлейф переменного состава, что характерно для явлений сольватации.

ЦИТИРУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

Baumgart T., Hess S.T., Webb W.W. // *Nature.* 2003. V. 425. P. 821.

Gil T., Mikheev L.V. // *Phys. Rev. E.* 1995. V. 52. P. 772.

Lippmann G. // *Ann. Chim. Phys.* 1875. V. 5. P. 494.

Marqusee J.A. // *J. Chem. Phys.* 1984. V. 81. P. 976.

Slezov V.V., Schmelzer J. // *Phys. Rev. E.* 2002. V. 65. P. 031506.

Smoluchowski M. // *Phys. Z.* 1916. Bd. 17. S. 557.

Башкиров П.В. // *Биологические мембраны.* 2007. Т. 24. С. 183.

Ландау Л.Д., Лифшиц Е.М. Том 5. Статистическая физика. М.: ФизМатЛит, 1969. 535 с.

Ландау Л.Д., Лифшиц Е.М. Том 10. Физическая кинетика. М.: ФизМатЛит, 1970. 535 с.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ

1. V.A.J. Frolov, Yu.A. Chizmadzhev, F.S. Cohen, J. Zimmerberg. “Entropic Traps” in the Kinetics of Phase Separation in Multicomponent Membranes Stabilize Nanodomains. *Biophysical Journal.* 2006. Vol. 91, p. 189-205.

2. С.А. Акимов, Вл.А. Фролов, П.И. Кузьмин. Линейное натяжение и функция распределения нанорафтов по размерам в бислойных липидных мембранах. *Биологические мембраны.* 2005. Том 22, с. 413-426.

3. С.А. Акимов, Вл.А. Фролов, П.И. Кузьмин, Ф.С. Коэн, Дж. Циммерберг, Ю.А. Чизмаджев. Модель липид-белковых нанорафтов, возникающих в условиях неполного смачивания. *Биологические мембраны.* 2006. Том 23, с. 510-524.

4. S.A. Akimov, V.A.J. Frolov, P.I. Kuzmin, J. Zimmerberg, Yu.A. Chizmadzhev, F.S. Cohen. Domain formation in membranes caused by lipid wetting of protein. *Physical Review E.* 2008. Vol. 77, p. 051901-1 – 051901-17.